

**EFFECTIVIDAD DE DIFERENTES TRATAMIENTOS
DESINFECTANTES SOBRE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM
Y LA PROBABILIDAD DE INFILTRACIÓN EN TOMATES
HIDROPÓNICOS DURANTE OPERACIONES DE LAVADO**

por

Maribel Alemany De Jesús

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
en
CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2009

Aprobado por:

Lynette E. Orellana, Ph.D.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Fernando Pérez Muñoz, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Mildred Zapata, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Coordinadora del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

ABSTRACT

The consumption of fruits and vegetables has increased over the past decades due to several reasons including: change in consumption patterns, healthy lifestyles and increased availability through the year. Today we understand the importance of a conventional commercial washing and sanitizing steps to remove microbial contamination from produce surface. However, the immersion of warm produce in cool water containing microorganisms can cause infiltration of cells that cannot be removed or inactivated by any later physical or chemical treatment. The overall objective of this research was to provide a new science-based intervention strategy to improve food safety and at the same time increase the quality and value of produce, thereby benefiting both public health and local agricultural development. We investigated the effectiveness of the following washing techniques: chlorinated water, peroxyacetic acid, hot water (55°C) and potable water at room temperature to reduce *Salmonella enterica* Typhimurium in hydroponically grown tomatoes and evaluated the probability of infiltration of this bacterium under the conditions tested. Analysis of aerobic plate count showed no significant differences between treatments ($P \leq 0.05$) in reducing microbial load. Nevertheless, peroxyacetic acid was more effective reducing *Salmonella enterica* Typhimurium and reducing the probability of infiltration.

RESUMEN

El consumo de frutas y vegetales ha aumentado durante las recientes décadas debido a cambios en hábitos dietéticos, tendencias de salud y al aumento en disponibilidad en todas las épocas del año. Hoy en día, se reconoce la importancia de un paso convencional de lavado e higiene en operaciones comerciales para remover la contaminación microbiana de la superficie de frutas y vegetales. Sin embargo, la inmersión de frutas y vegetales tibios en agua fría que contenga microorganismos puede causar infiltración de células que no podrán ser removidas o inactivadas por ningún tratamiento físico ó químico posterior. El objetivo principal de esta investigación fue proporcionar una nueva estrategia basada en la ciencia de la intervención para mejorar la inocuidad del alimento y al mismo tiempo aumentar la calidad y el valor del producto, de tal modo beneficiando salud pública y el desarrollo agrícola local. Investigamos la efectividad de las siguientes técnicas de lavado: agua clorada, ácido peroxiacético, agua caliente (55°C) y agua potable a temperatura ambiente para reducir *Salmonella entérica* Typhimurium en tomates hidropónicos y se evaluó la probabilidad de infiltración de esta bacteria bajo las condiciones examinadas. El análisis de recuento de bacterias aeróbicas totales no encontró diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tratamientos desinfectantes en la capacidad de reducir la carga microbiana. Sin embargo, el ácido peroxiacético resultó ser más efectivo eliminando el patógeno *Salmonella entérica* Typhimurium y reduciendo la probabilidad de infiltración.

**Derechos de Autor Reservados ©
Maribel Alemany De Jesús
2009**

Dedicatoria

Dedico mi tesis a mis padres, Juan B. Alemany y Clara de Jesús, por su incondicional apoyo en la realización de este trabajo. Sin su ayuda y comprensión no lo hubiera logrado. Gracias por el amor y la confianza que siempre me han brindado. También lo dedico a Dios; quien me dió la fortaleza y sabiduría para seguir adelante. Gracias Dios por haberme ayudado en los momentos más difíciles y frustrantes y por haberme dado ese ánimo que tanto necesitaba. Los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento es para Dios; quien me dió la fuerza para seguir adelante y nunca rendirme. De igual manera a mi familia y amistades que siempre estuvieron ahí dándome la ayuda y el apoyo que necesitaba. A mis hermanos, Edgardo Alemany y Juan C. Alemany, que de alguna manera me ayudaron en esta tesis. A mi novio, Waldemar Marrero quien me apoyó siempre en estos años de maestría. Gracias en especial a mi amiga Angélica Peluffo que muchas veces me acompañó de madrugada en el laboratorio para que nunca estuviera sola. Agradezco todo lo que me ayudaste en diferentes momentos.

También agradezco a la Dra. Lynette Orellana, presidenta del comité graduado quien me brindó la oportunidad de trabajar con ella. Su ayuda, apoyo e ideas fueron muy importantes para poder lograrlo. Gracias a la Dra. Edna Negrón, Coordinadora del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por la ayuda y confianza que siempre me brindó. A Ivette Vissepó, mejor conocida como “Bessie”, que siempre me ayudó incondicionalmente; gracias por la virtud de escuchar y de dar buenos consejos. Al Dr. Fernando Pérez Muñoz por siempre aclarar mis dudas y decir presente en los momentos que necesitaba de su ayuda. Un agradecimiento especial a Don Ruperto. Su sentido de humor alegraba mis días. Gracias a Magaly Zapata, del laboratorio de Microbiología, por nunca decirme “no” en lo que le pedía. Personas como ella hacen de este mundo un lugar mejor para vivir.

A mis compañeros de maestría que siempre me demostraron un gran cariño y me animaron. Sin ellos esta experiencia no hubiera sido la misma. Una amiga que merece

mención especial es Stephanie González Lara, amigas como ella son difíciles de encontrar. En mi corazón estará su huella por siempre. Fuiste mi “partner” de laboratorio en muchas clases de bachillerato y maestría. Sé que Dios te dará muchas bendiciones. También le doy mi agradecimiento a los técnicos del departamento, a la Agrónoma Jennifer Vélez, y al Agrónomo Jorge Santiago por ayudarme en las fincas. Su ayuda fue de gran beneficio.

Gracias a la USDA-CSREES que bajo el proyecto número 2006-51100-0365 que ofrecieron ayuda económica para sufragar los gastos relacionados con esta investigación. Gracias al Departamento de Química y de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez por brindarme la oportunidad de estar del otro lado del salón como ayudante de cátedra. A todos ellos, y a muchas otras personas que de alguna manera colaboraron conmigo para alcanzar esta meta, gracias.

Tabla de Contenido

ABSTRACT.....	II
RESUMEN	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	IVI
TABLA DE CONTENIDO	VIII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE GRÁFICAS	XI
LISTA DE APÉNDICES.....	XII
1 INTRODUCCIÓN	2
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3 MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Cultivo de la bacteria <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	31
3.2 Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium	31
3.3 Preparación del inóculo	32
3.4 Recolección de los tomates	33
3.5 Inoculación de los tomates.....	33
3.6 Preparación de las soluciones desinfectantes.....	34
3.7 Tratamiento con los desinfectantes.....	35
3.8 Análisis Microbiológicos.....	36
3.9 Análisis Estadístico.....	38
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
5 CONCLUSIONES	51
6 RECOMENDACIONES	53
7 REFERENCIAS.....	54
APÉNDICES.....	61

Lista de Tablas

Tablas	Página
Tabla 2.1 Criterio de clasificación por tamaño del tomate de invernadero utilizado por la USDA.....	7
Tabla 2.2 Criterio de Clasificación por color del tomate fresco utilizado por la USDA	7
Tabla 2.3 Ventajas del cultivo sin suelo frente al tradicional en suelo arable	10
Tabla 2.4 Algunos brotes de Salmonella spp. reportados en Estados Unidos asociados a diferentes alimentos entre 1990 hasta 2009.....	12
Tabla 2.5 Dosis infecciosa y periodo de incubación de patógenos comunes asociados alimentos.....	14
Tabla 2.6 Brotes bacterianos de Frutas y Hortalizas 1988-2006.....	16
Tabla 2.7 Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico reportada a la División de Epidemiología, Años 2004-2006.....	19

Lista de Figuras

Figuras	Página
Figura 2.1 Comparación de una planta de tomate de suelo versus una hidropónica	8
Figura 3.1 Espectrofotómetro: Thermo Spectronic, Genesys TM 8.....	32
Figura 3.2 Baño de María: Isotemp 220, Fisher Scientific©.....	35

Lista de Gráficas

Gráfica 2.1 Efectividad de PAA a diferentes temperaturas versus tiempo que le toma eliminar a <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	30
Gráfica 4.1 Temperaturas promedio de tomates hidropónicos	40
Gráfica 4.2 pH promedio de los tomates hidropónicos.....	41
Gráfica 4.3 Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium a 37°C.....	42
Gráfica 4.4 Curva de recuento para <i>Salmonella</i> Typhimurium a 37°C.....	43
Gráfica 4.5 Recuento de Bacterias Aeróbicas Totales en tomates hidropónicos antes y después de los tratamientos desinfectantes.....	44
Gráfica 4.6 Análisis microbiológico para detectar <i>Salmonella</i> spp. en la superficie de tomates hidropónicos.....	46
Gráfica 4.7 Análisis microbiológico para detectar <i>Salmonella</i> spp. en el interior de tomates hidropónicos.....	47

Lista de Apéndices

Apéndice A. Finca de tomates hidropónicos visitados.....	62
Apéndice B. Tomates hidropónicos antes de ser inoculados con <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	63
Apéndice C. Los tomates hidropónicos en el proceso de inoculación de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	64
Apéndice D. Tomates hidropónicos después de inocularlo con la bacteria.....	65
Apéndice E. Tomates en el proceso de secado después de los tratamientos desinfectantes...66	
Apéndice F. Los tratamientos desinfectantes: Hipoclorito de sodio (XY-12) y Ácido peroxiacético (PAA).....	67
Apéndice G. Colonias típicas en el agar “Xylose Lisyne Desoxycholate”, “Hektoen Enteric” y “Bismuth Sulfide”.....	68
Apéndice H. Resultados de Control positivo con <i>Salmonella</i> Typhimurium en medios con agar XLD, HE y BS.....	69
Apéndice I. Resultados de las pruebas bioquímicas “Triple Sugar Iron Agar” (TSIA) y “Lysine Iron Agar” (LIA).....	70
Apéndice J. Análisis Estadístico ANOVA.....	71
Apéndice K. Análisis Estadístico de Tabla de Contingencias y Chi Cuadrado.....	72

1 INTRODUCCIÓN

El tomate fresco y sus derivados se consideran beneficiosos para la salud debido a la capacidad antioxidante de sus componentes bioactivos como el licopeno y la vitamina C (Riso et al, 2003). En los Estados Unidos, el tomate es el segundo cultivo de hortalizas más importante en valor económico, después de la papa. El tomate se encuentra entre las cinco hortalizas más populares en el uso per cápita, contribuyendo significativamente a la nutrición general de los consumidores (Arias et al, 2000). El consumo de frutas y hortalizas ha aumentado en las recientes décadas debido al cambio de hábitos dietéticos, tendencias de salud y el aumento en la disponibilidad a través de todo el año (Vadlamudi, 2004). Según el ERS (2004), el consumo de frutas y hortalizas aumentó un 17% desde 1970 hasta 2002. Sin embargo, el consumo de estos productos frescos mal manejados puede ser potencialmente peligroso para la salud humana, ya que los tomates frescos han sido reconocidos como portadores de microorganismos patógenos asociados a alimentos como la *Salmonella* spp. (Yuk et al, 2005). Desde 1990, han sido reportados brotes de *Salmonella* asociados al consumo de tomates frescos (Hedberg et al, 1999; Cummings et al, 2001; CDC, 2002, 2005 & 2007). En Puerto Rico el número total de plantas de tomates hidropónicos sembrada en el 2005 fue de 22,620 con un valor de producción de 169,426 dólares. Hasta el presente no se han reportado brotes de *Salmonella* spp. asociados a los tomates locales.

En muchas ocasiones las fuentes de contaminación de *Salmonella* en tomates no han sido identificadas (CDC, 2008). Los tomates se cultivan en los hábitats de los portadores naturales de *Salmonella*, es decir, aves, anfibios y reptiles, que pueden llegar a contaminar el

tomate en la precosecha, o durante el empaque, a causa de una contaminación del agua de lavado (CDC, 2005). Se ha publicado que *Salmonella* se puede fijar en la superficie del tomate y sobrevivir al almacenamiento poscontaminación (Zhuang et al, 1995).

En un estudio con *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, un patógeno de plantas, y *Salmonella* Montevideo, se demostró que si los tomates son sumergidos por suficiente tiempo (3 -5min) en agua contaminada, y la temperatura de la fruta es mayor que la temperatura del agua, el agua y la bacteria pueden ser infiltrada al interior del tomate (Bartz y Showalter, 1981; Wei et al, 1995). Ese mismo proceso de infiltración puede ser impulsado por la presión hidrostática cuando los tomates son sumergidos en el agua contaminada dentro de un tanque profundo (Bartz, 1982). En este estado de internalización, la bacteria es protegida durante la exposición a desinfectantes de lavado (Ibarra-Sánchez et al, 2004).

Si los patógenos humanos son fijados dentro de los espacios protegidos del tallo o la cicatriz del tomate, la penetración del tratamiento desinfectante podría mostrar una mayor eficacia que un simple lavado. El agua caliente y tratamientos de radiación han sido utilizados para controlar la pudrición del tomate (Barkai-Golan et al, 1993). Aunque el tratamiento termal (inmersión de agua caliente) puede eliminar fácilmente microorganismos patógenos, las propiedades organolépticas, nutricionales y fisicoquímicas del alimento son extensamente afectadas (Elez-Martínez y Martín-Belloso, 2005).

El lavado de los tomates recién cosechados en el agua clorada es una práctica general en la industria de frutas y hortalizas, pero la inactivación completa de la *Salmonella* no es fácil de lograr (Zhuang et al, 1995). Estudios recientes muestran que tratamientos con compuestos clorados no son muy efectivos, resultando en menos de 2 log de reducción en el número de organismos bacterianos en frutas frescas y hortalizas (Beuchat, 1996 & 1999;

Brackett, 1999). En adición, las altas concentraciones de cloro libre pueden reaccionar con la materia orgánica resultando en la formación de trihalometanos que pueden tener acción cancerígena (Rodgers et al, 2004).

Investigaciones recientes muestran que oxidantes fuertes, como cloruro de sodio acidificado, ácido peroxiacético y gas dióxido de cloro son más efectivos que el cloro en eliminar patógenos asociados a alimentos en frutas frescas y hortalizas (Beuchat et al, 2004). Por estas razones, nuevos desinfectantes alternativos se deben desarrollar para aumentar la eficiencia en la descontaminación de frutas y hortalizas, y aumentar la inocuidad relacionada con el uso de agua clorada. Es imperativo asegurar que se elimina la presencia de patógenos que pueden causar daño al consumidor y así aumentar la calidad de estos productos frescos. Es, por tanto, el objetivo principal de esta investigación es proporcionar una nueva estrategia basada en la ciencia de la intervención para mejorar la seguridad del alimento y al mismo tiempo aumentar la calidad y el valor del producto beneficiando la salud pública y el desarrollo agrícola local. Se investigó la efectividad de los siguientes tratamientos desinfectantes: hipoclorito de sodio (NaClO), ácido peroxiacético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$, abreviación PAA), agua caliente (55°C) y agua potable a temperatura ambiente (25°C) para la eliminación, y prevención de infiltración, de *Salmonella* Typhimurium en tomates hidropónicos.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es una planta dicotiledónea, herbácea y perenne que pertenece a la familia botánica Solanaceae. La planta del tomate se cultiva por sus frutas comestibles. Estas son consumidas frescas, cocidas o procesadas. Se considera que las hojas, flores y frutas del tomate poseen propiedades medicinales. Aunque la fruta es alrededor de 90 a 94% agua, se considera una buena fuente de vitamina A y vitamina C. Los tomates tienen un valor de pH de aproximadamente 4.20 a 4.30 (Jay, 2005). Otros artículos científicos indican que el tomate tiene un pH entre 4.00 y 5.00 esto va a depender de la variedad del tomate. Uno de los pigmentos carotenoides que contiene la fruta madura del tomate es el licopeno, un pigmento rojo reconocido como antioxidante que puede ser beneficioso para la salud de los consumidores (Estación Experimental Agrícola, 2007).

El tomate ocupa el primer lugar en importancia económica entre las hortalizas que se siembran comercialmente en Puerto Rico. Cifras de la Oficina de Estadísticas Agrícolas del Departamento de Agricultura de Puerto Rico, indican que en el año 2007 la producción del tomate representó el 45% del valor total de la producción de hortalizas. El tomate, la cebolla y el repollo son las hortalizas que más se importan en Puerto Rico (Estación Experimental Agrícola 2007). Sin embargo Puerto Rico es el tercer consumidor de tomates por habitantes en el mundo y, de los tomates que se consumen, solamente se producen el 50%, la otra parte se importan. Casi la totalidad de la producción de tomate hidropónico en Puerto Rico se concentra en la zona alrededor del pueblo de Lares (Departamento de Agricultura, 2008).

Para determinar el momento óptimo de recolección y evaluar la calidad en el tomate se han desarrollado diversos criterios que permiten estandarizar algunas características.

Generalmente incluyen factores de apariencia, como el estado de madurez (asociado al color de la epidermis), tamaño, forma, firmeza, ausencia de podredumbres, defectos fisiológicos, daños mecánicos y biológicos. La estandarización de productos frescos puede describirse como la aceptación común de la práctica de clasificar el producto y ofrecerlo para la venta, en términos de calidad que han sido definidos en forma precisa y que son constantes en el tiempo y la distancia.

2.1.1 Estándares de clasificación del USDA

La clasificación por grado, tamaño y color de las frutas comerciales provee un lenguaje común entre vendedores y compradores. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) tiene establecidos estándares para la clasificación en grados de las frutas de tomates frescos (“United States Standards for Grades of Greenhouse Tomatoes”). Estos estándares van dirigidos a los tomates de ensalada o de mesa producidos en invernaderos (“Greenhouse Tomatoes”).

Los grados de calidad en que actualmente se clasifican los tomates frescos producidos en invernaderos, establecidos por la USDA, y efectivo desde el 19 de abril de 1966, son “U.S. No.1”y “U.S. No. 2”. Por ejemplo, los requisitos básicos con los que las frutas deben cumplir bajo el grado “U.S. No.1” son: frutas con características varietales similares, ya hechas (fisiológicamente maduras), no sobre maduras o blandas, limpias, bien desarrolladas, firmes, bastante bien formadas, bastante lisas, libre de pudrición, daño por congelación y escaldadura de sol y libres de cualquier otro daño. Los siguientes defectos son otras de las posibles causas de daños en la frutas: cortaduras y roturas en la piel, lóbulos o celdas vacías “puffiness”, caras de gato “catfaces”, cicatrices, rajaduras de crecimientos (radiales o concéntricas, con respecto a la cicatriz del cáliz), daño por insectos y otros

La Tabla 2.1 presenta las designaciones del tamaño utilizada por el USDA en la clasificación de la fruta de tomate, basada en el peso en onzas. La Tabla 2.2 presenta la clasificación de color para tomates frescos, cuando los mismos son especificados en conexión con el grado de calidad ya asignado a las frutas. Ésta describe el color como indicador de la etapa de madurez ('ripeness') en que se encuentra un lote dado de frutas de tomates fisiológicamente hechas de una variedad de piel roja.

Tabla 2.1. Criterio de clasificación de tamaño del tomate de invernadero ("Greenhouse Tomatoes") utilizado por el USDA.

Designaciones de Tamaño	Peso (onzas)
Pequeño	< 3-1/2
Mediano	3-1/2 a 9
Grande	> 9

Fuente: **United States Standards of Greenhouse Tomatoes**, 1966.

Tabla 2.2. Criterios de clasificación por color del tomate fresco ("Fresh Tomatoes") utilizado por el USDA

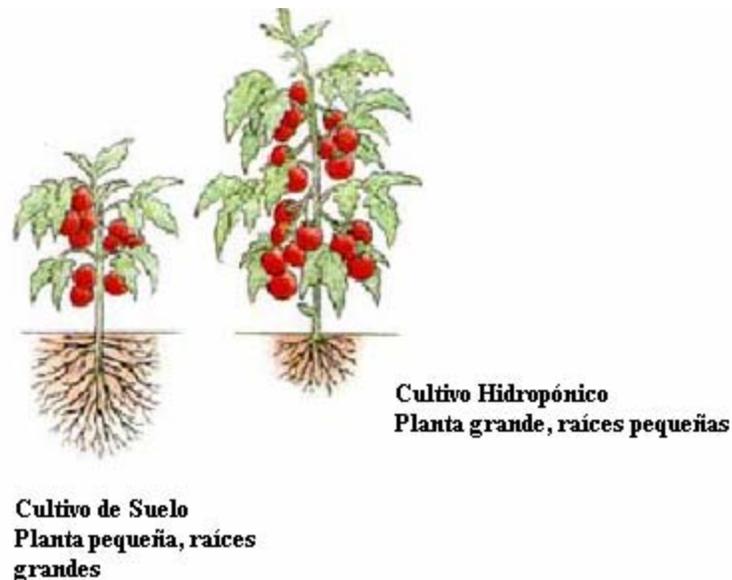
Color	Descripción
"Green" (Etapa 1)	La superficie del tomate está completamente verde en color. El matiz del color verde puede variar de claro a oscuro.
"Breakers" (Etapa 2)	Hay un rompimiento definitivo en color de verde a amarillo-bronceado, rosa o rojo, en no más de 10% de la superficie.
"Turning" (Etapa 3)	Más de 10% pero no más de 30% de la superficie, en el agregado, presenta un cambio definido en color de verde a amarillo marrón, rosa, rojo, o una combinación de ellos.
"Pink" (Etapa 4)	Más de 30% pero no más de 60% de la superficie, en el agregado, presenta un color rosa o rojo.
"Light Red" (Etapa 5)	Más de 60% de la superficie, en el agregado, presenta un color rojo-rosado o rojo: provisto de que no más de 90% de la superficie sea color rojo.
"Red" (Etapa 6)	Más de 90% de la superficie, en el agregado, presenta un color rojo.

Fuente: **United States Standards of Fresh Tomatoes**, 1991.

2.2 Cultivo Hidropónico

El cultivo hidropónico consiste en un sustrato (generalmente arcilla expandida, vermiculita o lana de roca) al que se suministra agua con los nutrientes incorporados y que puede ser regado continuamente siempre que el líquido sea drenado y no inunde el sustrato. La palabra Hidroponía deriva de las palabras griegas Hydro (agua) y Ponos (labor o trabajo) y significa literalmente “trabajo en agua”. La hidroponía es la ciencia que estudia los cultivos sin tierra. La ventaja principal de este método de cultivo es la rapidez en el crecimiento y maduración de la planta, pudiéndose acortar los ciclos en un 60% respecto a los de la misma planta en su entorno natural (Ver Figura 2.1).

Figura 2.1. Comparación de una planta de tomate de suelo versus una hidropónica



Fuente: Manchester Hydroponics LTD, 2007

En Estados Unidos de América, el consumo de tomates (y de productos derivados de la hidroponía) ha aumentado de forma considerable en los últimos 20 años. La ventaja de cultivar el tomate en un sistema hidropónico en ambiente controlado (como invernaderos) es la capacidad de modificar los factores relacionados con su desarrollo de forma más minuciosa. Estos factores incluyen el tipo de suelo, pérdidas excesivas de agua por evaporación, control estricto de la temperatura, riego más efectivo, control de los efectos del viento, la exposición directa a la luz solar y aislamiento de las posibles plagas. Este último no es totalmente controlado dado que algunas plagas logran ingresar a los invernaderos y requieren acciones más específicas. El beneficio mayor proviene de la capacidad de aislarlo del suelo; ya que puede aportar salinidad, concentraciones inadecuadas de nitratos y otros minerales, humedad inadecuada, oxigenación pobre de las raíces y enfermedades. La hidroponía, a diferencia de la agricultura convencional, se puede sembrar y producir todo el año. La Tabla 2.3 compara el cultivo hidropónico y la producción tradicional en el suelo.

Una de las desventajas de los cultivos hidropónicos estriba en el consumo de energía para el mantenimiento de la temperatura en los invernaderos y lo costoso de la primera inversión en implementos de riego. Además, es susceptible a enfermedades como *Fusarium* y *Verticillium* que pueden extenderse rápidamente a través del sistema. Esto se puede solucionar con el uso de variedades resistentes a las enfermedades (Resh, 2001).

Tabla 2.3. Ventajas del cultivo sin suelo frente al tradicional en suelo arable

<i>Prácticas de Cultivo</i>	<i>Suelo</i>	<i>No suelo</i>
1. Esterilización del medio de cultivo	Vapor, fumigantes químicos; trabajo intensivo, proceso muy largo.	Vapor, fumigantes químicos con algunos de los sistemas, el tiempo de esterilización es muy corto.
2. Nutrición Vegetal	Muy variable, a veces los nutrientes no son utilizados por las plantas debido al pH o la mala estructura del terreno, condición inestable, dificultad para el muestreo y ajuste.	Control completo, relativamente estable, homogénea para todas las plantas, fácilmente disponible en las cantidades que se precisen, buen control del pH, toma de muestras y ajuste.
3. Número de plantas	Limitado por la nutrición que puede proporcionar el suelo y por la disponibilidad de luz.	Limitado solamente por la iluminación; es posible una mayor densidad de plantación; lo cual dará como resultado una mayor cosecha por unidad de superficie.
4. Control de malas hierbas, labores	Siempre existen, hay que efectuar laboreo.	No existe, no hay laboreo.
5. Enfermedades y parásitos de suelo	Gran número de enfermedades de suelo, nemátodos, insectos y otros animales que puedan dañar las cosechas, es frecuente la necesidad de rotar las cosechas para evitar estos daños.	Hay pocas enfermedades, insectos y animales en el medio de cultivo, no es preciso la rotación de cosechas.
6. Agua	Las plantas están sujetas a menudo a trastornos debido a una pobre relación agua-suelo, a la estructura de este, y a una capacidad de retención muy baja. Las agua salinas no pueden ser utilizadas. El uso del agua es poco eficiente, tanto por la percolación como por una alta evaporación en la superficie del suelo.	No existe estrés hídrico. La automatización es completa, con el uso de un detector de humedad y un control electrónico de riego; puede utilizarse agua con un contenido de sales relativamente alto; hay un alto grado de eficiencia en el uso del agua; con un uso apropiado pueden reducirse las pérdidas por evaporación y evitarse las de percolación.
7. Calidad del fruto	El fruto a menudo es blando debido a las deficiencias en calcio y potasio, dando lugar a una escasa conservación.	El fruto es firme, con buena conservación. Algunos ensayos han demostrado un mayor contenido de vitamina A en los tomates cultivados con sistema hidropónicos, frente a los cultivados en suelo.
8. Fertilizantes	Se aplican a voleo sobre el suelo, utilizando grandes cantidades, sin ser uniformes su distribución y teniendo grandes pérdidas por lavado.	Se utilizan pequeñas cantidades que, al estar distribuidas uniformemente, permiten una utilización uniforme por las raíces, con muy pocas pérdidas por lavado.
9. Estado sanitario	Los restos orgánicos que se utilizan frecuentemente como fertilizantes suelen ser causa de enfermedades en los consumidores.	Al no añadir agentes biológicos a las plantas la existencia de agentes patógenos en ellas es mínima.

Cont. Tabla 2.3. Ventajas del cultivo sin suelo frente al tradicional en suelo arable

<i>Prácticas de Cultivo</i>	<i>Suelo</i>	<i>No suelo</i>
10. Transplante	Es preciso preparar el suelo. Es difícil controlar la temperatura del suelo, así como los organismos patógenos que motiven el retardo del crecimiento o incluso la muerte de las plantas.	No se necesita una preparación especial del suelo para el transplante. La temperatura se puede controlar por medio de la circulación de la solución nutritiva.
11. Maduración	-----	Con unas condiciones adecuadas de iluminación se puede conseguir un adelanto en la maduración.
12. Cosecha	Los tomates producen alrededor de 8-15 lb/año/planta.	Cosecha en tomates es aprox. de 18-20 lb/año/planta.

Fuente: **Cultivos hidropónicos: nuevas técnicas de producción. Una guía completa de los métodos actuales de cultivo sin suelo** (Resh, 2001).

2.3 *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, no formadora de esporas, que no requiere condiciones estrictas de crecimiento. Las bacterias de *Salmonella* spp. son mótils (excepto *Salmonella entérica* Pullorum y *Salmonella entérica* Gallinarum) y desarrolla flagelos periferales. Pueden crecer en un rango de temperatura de 5-45°C con una temperatura óptima entre 35-37°C. Pueden crecer a pH bajos y son generalmente sensitivos a altas concentraciones de sal. Son capaces de proliferar y sobrevivir en diversos ecosistemas tal como la producción de alimentos e instalaciones de procesamiento. Existen más de 2,400 serotipos de la bacteria *Salmonella*, siendo las más comunes *Salmonella entérica* serovariedad Typhimurium y *Salmonella entérica* serovariedad Enteritidis (Jay, 2005). Según el CDC (2009) desde 1990 hasta 2009 se han reportado aproximadamente 14 brotes de *Salmonella* asociados a diferentes alimentos en Estados Unidos (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Algunos brotes de *Salmonella* spp. reportados en Estados Unidos asociados a diferentes alimentos entre 1990 hasta 2009.

<i>Salmonella</i> Typhimurium	Mantequilla de maní	2009
<i>Salmonella</i> Saintpaul	Tomates, jalapeños	2008
<i>Salmonella</i> Agona	cereales	2008
<i>Salmonella</i> Typhimurium	tomates	2006
<i>Salmonella</i> Javiana	tomates	1990

Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2009)

La bacteria *Salmonella* es la primera causa de muerte por enfermedad transmitida por alimentos. A pesar de que muchas personas se recuperan sin tratamientos, en otras, la diarrea es tan aguda que se necesita hospitalización y antibióticos. Las personas susceptibles son más propensas a enfermarse gravemente y la infección puede propagarse a través de los intestinos a la corriente sanguínea y luego pasar a otras partes del cuerpo; pudiendo causar la

muerte si no se recibe el tratamiento adecuado con antibióticos (Departamento de Salud de Puerto Rico, 2006).

Salmonella es un patógeno que causa infección en humanos caracterizada por gastroenteritis la cual se manifiesta en diarrea, vómitos, fiebre, calambre abdominal y dolores de cabeza. *Salmonella* Typhimurium causa serias enfermedades en niños e individuos inmunocomprometidos, a menudo resultando en infecciones sistémicas. La dosis infecciosa de *Salmonella* es bastante amplia y puede variar desde 10 hasta 10^9 cfu/g (Bhunja, 2008). La dosis infecciosa de patógenos o toxinas depende del estatus inmunológico del hospedero y la inefectividad natural del organismo (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Dosis infecciosa y periodo de incubación de patógenos comunes asociados a los alimentos

Patógeno	Dosis Infecciosa	Periodo de Incubación
Bacteria		
<i>Salmonella entérica</i>	10-10 ⁹ cfu/g	6-24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	10 ² -10 ³ cfu	7-14 días o incluso más
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	50-100 cfu	3-9 días
<i>Shigella spp.</i>	10-100 cfu	12 h – 7 días, pero generalmente 1-3 días
<i>Vibrio cholerae hemolyticus/vulnificus</i>	10 ⁴ -10 ¹⁰ cfu/g	6 h – 5 días
<i>Staphylococcus aureus cells</i>	10 ⁵ -10 ⁸ cfu/g	--
<i>Staphylococcal enterotoxin</i>	1 ng/g de alimento	1-6 h
<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁵ -10 ⁸ cfu/g o esporas	1-6 h (vomitando) 8-12 h (diarrea)
<i>Bacillus anthracis (inhalation anthrax)</i>	8 x 10 ³ -10 ⁴ esporas	2 -5 días
<i>Clostridium botulinum Neurotoxin</i>	0.9-0.15 µg (ruta intravenosa) y 70 µg (ruta oral)	12-36 h; 2h cuando grandes cantidades fueron ingeridas
<i>Clostridium perfringens</i>	10 ⁷ -10 ⁹ cfu	8-12 h
<i>Campylobacter jejuni</i>	5 x 10 ² -10 ⁴ cfu	1-7 días (24-48 h)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10 ⁷ -10 ⁹ cfu	24-30 h y dura 2-3 días
Virus		
Norovirus	~10 partículas	24-48 h
Hepatitis A	10 -100 partículas	15-45 días, promedio 28-30 días
Protozoo		
<i>Giardia duodenalis</i>	10-100 esporas	1-2 semanas
<i>Cryptosporidium parvum</i>	10 esporas	2-10 días

Fuente: **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis** (Bhunia, 2008).

2.4 Incidencias de brotes de *Salmonella* spp en alimentos.

Según el CDC, seis patógenos son responsables del 90% de las muertes por consumo de alimentos; éstos son *Salmonella* (31%), *Listeria* (28%), *Toxoplasma* (21%), virus Norwalk (7%), *Campylobacter* (5%) y *E. coli* O157:H7 (3%) (Mead et al, 1999). En años recientes, un gran número de brotes relacionados a *Salmonella* se han asociado al consumo de frutas y vegetales contaminados, especialmente en tomates, melones, jugo de china, jugo de manzana y germinados (Burnett et al, 2000).

En una investigación realizada entre 1998 y 1999 se reportaron más 86 de casos de salmonellosis asociados con el consumo de tomates frescos en múltiples estados de Estados Unidos. El brote fue causado por *Salmonella entérica* serotipo Baildon y afectó alrededor de 3,300 personas en Estados Unidos (Cummings et al, 2001). Se estima que *Salmonella* spp. causa aproximadamente 1.5 millones de casos de infecciones por alimentos cada año en Estados Unidos, con 15,000 hospitalizaciones y 500 muertes (Guo et al, 2001)(Tabla 2.5). Alimentos de origen animal, como el pollo, huevos, carnes rojas y productos lácteos, han sido históricamente reconocidos como vehículos de *Salmonella*. Sin embargo, salmonellosis también se ha asociado con el consumo de tomates (CDC, 1993). El consumo de tomates crudos se vinculó epidemiológicamente a 176 casos de infecciones de *Salmonella entérica* serotipo Javiana en los estados de Illinois, Michigan, Minnesota y Wisconsin en 1990 (Guo et al, 2001). En 1993, los tomates fueron identificados como vehículo del brote infeccioso de *Salmonella enterica* serotipo Montevideo en Estados Unidos (CDC, 1993).

Tabla 2.6. Brotes bacteriano de Frutas y Hortalizas 1988-2006

Alimento	Brotes
Lechuga y vegetales de hoja	30%
Tomates	17%
Cantaloupe	13%
Hierbas (perejil, albahaca)	11%
Cebollines verdes	5%

Fuente: **Good Agricultural Practices. Resource Manual** (Cornell University, 2000).

En junio de 2008 el CDC y la FDA estuvieron colaborando en la investigación de los brotes infecciosos de *Salmonella* serotipo Saintpaul en personas de múltiples estados de la nación americana. La investigación epidemiológica en la que se compararon alimentos consumidos por las personas que se enfermaron y las que estaban sanas, identificó que la posible causa de las infecciones fue relacionada con el consumo de tomates frescos. Un estudio similar, pero mucho más amplio, realizado a nivel nacional, en el cual se compararon las personas que se enfermaron en junio con las que estaban sanas, descubrió que había más probabilidad de que las personas enfermas hubieran consumido recientemente tomates crudos, ajíes o chiles jalapeños frescos (“*jalapeño peppers*”) y cilantro fresco. Por lo general, aunque no siempre, estos productos se consumieron juntos, por lo cual el estudio no pudo determinar cuál de ellos causó las enfermedades.

Después de realizado el primer estudio de casos y controles, se detectaron conglomerados de infección que se relacionaban con restaurantes específicos. La mayoría de los conglomerados tenía menos de 5 personas enfermas. Hasta el 1 de julio, se habían

investigado tres grandes conglomerados. En uno, las enfermedades fueron relacionadas con el consumo de un producto que contenía tomates y chiles jalapeños frescos. En los otros dos, las enfermedades se relacionaron con un producto que contenía chiles jalapeños frescos y que no contenía ninguno de los otros productos en investigación. Más recientemente, se investigaron otros tres grandes conglomerados. Investigaciones exhaustivas realizadas en estos conglomerados, indican que los chiles jalapeños no se pueden vincular a todas las enfermedades. En dos de estas investigaciones, las enfermedades fueron relacionadas con un producto que contenía chiles serranos (*serrano peppers*) y tomates frescos, pero que no tenía chiles jalapeños. En la tercera, las enfermedades fueron relacionadas con un producto que contenía chiles jalapeños y tomates frescos. Otros conglomerados todavía están siendo investigados en forma activa.

Parece probable que hay más de un tipo de alimento involucrado en la transmisión de este brote. Este brote no puede ser atribuido enteramente a un solo producto alimenticio. Los tomates por sí solos no pueden explicar todo el brote, ni los chiles jalapeños pueden explicar todos los conglomerados. Es probable que haya más de un tipo de alimento involucrado. Aunque no es frecuente, más de un producto alimenticio ha sido vinculado a brotes transmitidos por los alimentos en el pasado. Desde abril, se han identificado 1319 personas infectadas por *Salmonella saintpaul* con la misma huella genética del brote en 43 estados, el Distrito de Columbia y Canadá. (CDC, 2008).

Desde septiembre del 2008, casi 500 personas en Estados Unidos y Canadá se han enfermado a raíz de un brote infeccioso de la cepa *Salmonella* Typhimurium. Los estudios llevados a cabo por la CDC en colaboración con sus socios de salud pública estatales y locales muestran que los causantes de este brote infeccioso fueron la mantequilla de maní

King Nut®, que se sirve en instituciones como escuelas y asilos de ancianos, y los productos que contienen mantequilla de maní, como las galletas pre-empacadas Austin® y Keebler®, que se venden directamente al público. El Departamento de Salud Comunitaria de Michigan aisló la *Salmonella* de un envase no abierto de 5 libras de mantequilla de maní King Nut. Ellos identificaron que la cepa de *Salmonella* que se encontró en este envase corresponde a la del brote infeccioso. Diferentes laboratorios de Estados Unidos han identificado la cepa de *Salmonella* Typhimurium a la mantequilla de maní y productos que contienen maní (CDC, 2009).

En Puerto Rico, durante el 2005 se registraron 692 casos de Salmonelosis, aunque no todos están asociados al consumo de alimentos. Según el Departamento de Salud de Puerto Rico (2006), los casos principales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) confirmados en Puerto Rico en el 2006 fueron: 774 casos de Salmonelosis, 85 casos de Hepatitis A, 43 casos de Shigelosis y 18 casos de Campylobacteriosis (Tabla 2.6).

Tabla 2.7. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico reportada a la División de Epidemiología, Años 2004-2006.

Enfermedad	Números de caso		
	2004	2005	2006
Amebiasis	2	0	1
Campylobacteriosis	37	26	18
Ciguatera	12	12	20
Cólera	0	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	2	2	0
Giardiasis	302	275	276
Hepatitis A	67	68	85
Listeriosis	0	1	0
Salmonelosis	536	692	774
Shiguelosis	36	9	43
Yersiniosis	0	0	3

Fuente: Sistema de Vigilancia Enfermedades de Notificación Obligatoria (Departamento de Salud de Puerto Rico, 2006).

2.5 Lavado de Frutas y Hortalizas

En años recientes, la preocupación de productores, agencias reguladoras, y el público ha aumentado acerca de la inocuidad microbiológica de frutas y vegetales. Los brotes de enfermedades relacionados a los alimentos son numerosos. La atención a dicho aumento ha evidenciado la necesidad de mejores métodos de desinfectar frutas y vegetales que puedan contener microorganismos patógenos a humanos (Beuchat, 1996).

En el desarrollo de nuevos o mejores tratamientos de lavado y desinfectantes para frutas y vegetales se debe considerar la compatibilidad de los tratamientos con prácticas comerciales, costo del tratamiento, ausencia de efectos nocivos inducidos por el tratamiento sobre la calidad del producto y la necesidad de la aprobación de agencias reguladoras.

La contaminación superficial de frutas y hortalizas varía en número y tipo, dependiendo del producto y del manejo, previo y posterior de la cosecha, que dichos productos hayan recibido. Muchos microorganismos están asociados a partículas de tierras u otro tipo de suciedad adherida a la fruta, en cuyo caso la remoción es sencilla. Sin embargo existe flora asociada cuya remoción es difícil ya que se encuentra formando biopelículas superficiales o están ocupando lugares poco accesibles como aberturas naturales o heridas (Vero, 2004).

Para asegurar la calidad e inocuidad de las frutas y hortalizas es necesario minimizar la contaminación de los productos con microorganismos patógenos que pueden afectar la salud del consumidor. A su vez, es de suma importancia, reducir al máximo el inóculo de patógenos vegetales que pueden afectar la calidad del producto durante el almacenamiento poscosecha y la necesidad de la aceptación del consumidor (Sapers, 2001).

Para convertirse en un peligro para la salud pública (FDA, 1999), un patógeno o un microorganismo que se ha internado en una fruta o vegetal debe poder sobrevivir en el producto hasta alcanzar al consumidor.

Varios estudios han demostrado que los tratamientos de superficie podrían ser eficaces en la reducción de cargas microbianas en la superficie pero es necesario tomar la precaución para prevenir patógenos internados en el producto. A la vez que el patógeno se internalice en la fruta o vegetal el desinfectante no tendrá ningún efecto sobre dicho microorganismo. Zhuang y Beuchat (1996), por ejemplo, demostraron que una solución de 15 por ciento de fosfato trisódico hará inactivo totalmente a *Salmonella* en la superficie de tomates pero dará lugar solamente a una reducción de 2 log de poblaciones internas.

Factores limitantes de la eficiencia del lavado

Condiciones de contaminación

La contaminación de frutas y vegetales con patógenos humanos puede ocurrir en cualquier punto durante la producción, cosecha, empaque, proceso o distribución que se exponga al producto a heces de animales o humanos. Como consecuencia aumenta la probabilidad que bacterias contaminantes se unan firmemente en localizaciones inaccesibles, incorporado dentro de biopelículas en el interior de la fruta o vegetal. La internalización y la formación de biopelículas impiden la desinfección efectiva del producto contaminado por la aplicación de lavado y agentes desinfectantes (Sapers, 2001).

Intervalos entre contaminación y lavado

Se ha encontrado que la efectividad del lavado puede depender del intervalo de tiempo entre el evento de contaminación y el lavado. Según estudios científicos obtenidos con manzanas inoculadas artificialmente con *E. coli* y lavados con agua un tiempo después,

intervalos de 30 minutos entre la inoculación y el lavado reducen 1 ciclo log de la población. Sin embargo, después de 24 horas, esencialmente todas las bacterias estaban firmemente unidas y no pudieron ser removidas con el lavado (Sapers, 2001). En otro estudio realizado con cantaloupe se inoculó bacteria no patogénica de *E. coli* y *Salmonella* Stanley. Estos fueron lavados con 1000 ppm de hipoclorito de sodio y 5% de peróxido de hidrógeno inmediatamente después de la inoculación. Bajo estas condiciones se obtuvo una reducción excediendo los 3 ciclos log. Sin embargo, el lavado con agentes antimicrobiales 72 horas después de la inoculación fue mucho menos efectivo reduciendo la población bacteriana (Ukuku et al, 2000; Ukuku y Sapers, 2000).

Fijación en sitios inaccesibles

Cuando las bacterias se fijan en la superficie de frutas y vegetales, ellas tienden a localizarse en poros, indentaciones u otras irregularidades naturales en la superficie intacta (Seo y Frank, 1999). Las bacterias también se unen en superficie cortadas o punturas y grietas en la superficie (Burnett et al, 2000). En un estudio realizado con *Salmonella* Chester, se encontró que dicha bacteria sobrevivió el proceso de lavado a un grado mucho mayor cuando ésta se fija a superficie cortada de manzanas y pimientos verdes (Liao y Sapers, 2000). Estos resultados son una cuestión que concierne a la industria de cortes frescos puesto que sus productos proporcionan extensas superficies cortadas para la fijación bacteriana; haciéndolas especialmente vulnerables a la contaminación.

Internalización de bacteria dentro de vegetales y frutas

La internalización de bacterias dentro de ciertas frutas y vegetales puede ocurrir durante el empaque o proceso (Bartz y Showalter, 1981). Cuando la fruta o vegetal viene caliente del campo y se coloca en agua a menor temperatura, el gas interno de la fruta o

vegetal se refresca y se contrae. Esto crea un vacío parcial que permite que el agua y cualquier microorganismo presente puedan infiltrarse dentro de la fruta o vegetal. Este mecanismo se conoce como infiltración (Buchanan et al, 1999). La internalización también puede ocurrir naturalmente debido a la contaminación durante el florecimiento o desarrollo de la fruta (Samish et al, 1963). Se ha reportado internalización de *E. coli O157:H7* en lechuga (Seo y Frank, 1999; Takeuchi y Frank, 2000), mientras que otras especies bacterianas se han detectado dentro de pepinillos y tomates (Meneley y Stanghellini, 1974). La internalización de patógenos humanos dentro de frutas y vegetales imposibilita la desinfección eficaz de tratamientos de lavado y sanitización.

Existen varios métodos para reducir la flora superficial de frutas y hortalizas. Cada método tiene sus ventajas y desventajas y su aplicación depende del proceso y tipo de producto. En general, los métodos utilizados se basan en procesos físicos y/o químicos. Entre los métodos físicos podemos mencionar la remoción mecánica, los tratamientos térmicos, y la irradiación. Los métodos químicos involucran el uso de agentes químicos como desinfectantes superficiales. La mayoría se utilizan en soluciones acuosas y en algunos casos se pueden encontrar desinfectantes en forma gaseosa.

Cuando se evalúa la acción de un método desinfectante en general se determina la reducción de la carga microbiana alcanzada con el tratamiento. Esta reducción se puede expresar en porcentaje, en órdenes o unidades logarítmicas (Log). Por ejemplo, si la carga inicial de una fruta se expresa como 10^6 microorganismos/ml, una reducción de dos órdenes o logaritmos significa que, luego del tratamiento, la carga remanente es de 10^4 microorganismos/ml, lo cual corresponde a 99% de reducción de la carga. Si la reducción es de 99.9% significa que la flora microbiana superficial bajó tres logaritmos y, por lo tanto, la

carga microbiana remanente es de 10^3 microorganismos/ml. Es importante tener esto en cuenta a la hora de elegir un desinfectante.

2.6 Agentes desinfectantes

Los tratamientos con agentes desinfectantes se hacen en solución acuosa por inmersión o aspersión. El alcance del tratamiento depende del compuesto desinfectante y de los microorganismos que se quieran eliminar. Su eficacia varía con la concentración del agente, y en mayor o menor medida con la temperatura, el pH, el tiempo de contacto y el contenido de la materia orgánica (Vero, 2004).

Se debe tener en cuenta que la mejor forma de lograr un producto con baja carga microbiana es evitar que el mismo se contamine siguiendo las Buenas Prácticas Agrícolas (GAP's) previo y posterior a la cosecha, no se debe depender de medidas correctivas de descontaminación. Sin embargo, es de suma importancia el uso de agentes desinfectantes en el agua de lavado de las frutas y hortalizas ya que, además de conseguir una reducción de la carga superficial, puede evitar la contaminación cruzada. Los agentes desinfectantes tienen gran efectividad en reducir la carga microbiana en suspensión en agua. Sin embargo, en algunos casos, estos desinfectantes no son tan efectivos eliminando patógenos de la superficie del producto o el agua.

La baja efectividad de los agentes desinfectantes sobre frutas y hortalizas, se debe en gran parte a la inaccesibilidad del agente al sitio donde se encuentran los microorganismos. Los microorganismos contaminantes pueden estar en la superficie de la fruta o también puede alojarse en heridas o aberturas naturales de difícil acceso. En algunos casos puede acceder al interior de la fruta debido a la infiltración producida por el gradiente de temperatura en un primer lavado. La inmersión de un producto en una solución cuya

temperatura sea unos 10 a 15°C menor, provoca infiltración de la solución, incluyendo microorganismos presentes en el producto. Por ello es de suma importancia que el agua utilizada en el enfriado de frutas y hortalizas sea potable.

Otra causa de la baja efectividad de los agentes desinfectantes puede ser la formación de biopelículas por parte de los microorganismos contaminantes. Estas biopelículas están constituidas por polisacáridos en los cuales están inmersos los microorganismos que los produjeron, lo cual dificulta la acción de los desinfectantes. Dentro de los agentes desinfectantes utilizados para tratar frutas y hortalizas se encuentran: compuestos halogenados, ácidos, compuestos de amonio cuaternario y compuestos de oxígeno activo.

2.6.1 Tratamientos térmicos

El tratamiento térmico por inmersión en agua caliente es un método físico utilizado para lograr una sanitización superficial en vegetales. En general se trata de procesos cortos en que los productos son tratados con agua caliente a temperatura entre 50-70°C, dependiendo del producto a tratar. Yohoshua (2003) demostró que una inmersión durante dos minutos en agua caliente a 53°C prevenía la aparición de síntomas en frutas cítricas inoculadas con *Penicillium digitatum*. Pao y Davis (1999), utilizaron un tratamiento de inmersión en agua a 70°C por dos minutos que disminuyó la carga superficial de *E. coli* en naranjas por cinco logaritmos/ml.

Fallik y colaboradores (1996) diseñaron y patentaron un sistema en Israel que conjuga dos métodos físicos: la remoción mecánica y el tratamiento con agua caliente. El sistema involucra el uso de cepillos que actúan en la superficie de manzanas mientras el mismo es tratado con una lluvia de agua caliente durante 10 a 30 segundos. Según sus resultados este

sistema logra una disminución de hasta 4 logaritmos en la flora superficial del producto (Schirra et al., 2000).

Estudios con cantaloupe realizados para determinar si la inmersión con agua caliente podría pasteurizar la superficie del producto sin causar lesión han demostrado que los cantaloupe toleraron una exposición al agua a 80°C por tres minutos sin presentar lesión alguna inicialmente y después del almacenamiento a 4°C por 26 días (Ukuku, 2004).

Otro factor a considerar es la calidad de agua utilizada. Si bien el gradiente de temperatura entre el agua de tratamiento y el producto a tratar es tal que no se produce infiltración de contaminantes presentes en el agua de lavado dentro del producto, es importante que el tratamiento se realice con agua que cumpla con los requisitos de potabilidad.

2.6.2 Compuestos clorados (cloro, sales de hipocloritos y dióxido de cloro)

El cloro es el agente desinfectante más utilizado en la industria de alimentos (Beuchat, 1998; Brackett, 1999). Debido a su bajo costo, se ha utilizado ampliamente para la desinfección de superficies en contacto con alimentos y reducir la carga microbiana del agua utilizada en diferentes operaciones. En general se utilizan soluciones acuosas de hipocloritos o cloro gaseoso. Cuando el cloro se disuelve en el agua se forma ácido hipocloroso y ácido clorhídrico estableciéndose un equilibrio entre las distintas sustancias (1). A su vez el ácido hipocloroso (2) está en equilibrio con su forma disociada. Es así que las soluciones de cloro contienen moléculas de HOCl (ácido hipocloroso) y sus iones $H^+ + OCl^-$ en equilibrio. De ellos, la forma no disociada del ácido (HOCl) es la forma activa frente a los microorganismos.



Cuando se disuelve el hipoclorito en agua la reacción que ocurre es la (2) a la inversa, es decir, el ión hipoclorito formado en la disolución de la sal forma ácido hipocloroso, estableciéndose el mismo equilibrio.

El equilibrio de estas sustancias depende del pH. Al descender el pH, el equilibrio (2) se desplaza hacia la forma no disociada, o sea, el ácido hipocloroso predomina, por lo que la acción antimicrobiana es mayor. Los porcentajes de ácido hipocloroso a pH 6.00 y 8.00 son de 97 y 23%, respectivamente. Sin embargo, a pH más bajo el equilibrio de la reacción (1) se desplaza a la formación de cloro gas el cual se libera pudiendo producir intoxicaciones en los aplicadores. Por lo tanto, el pH es un factor de suma importancia en la preparación de soluciones de cloro. Utilizando soluciones de pH 6.00 se logra conseguir alta efectividad y estabilidad.

El modo de acción del ácido hipocloroso se basa en su capacidad oxidante. Es altamente reactivo en presencia de materia orgánica, reaccionando con muchos grupos funcionales y oxidándolos. Su capacidad de destruir microorganismos depende de la cantidad de cloro residual libre, es decir el ácido hipocloroso restante después de reaccionar con la materia orgánica e inorgánica presente en el agua. Como resultado de la reacción con la materia orgánica, el ácido hipocloroso forma cloro gas pero también trihalometanos, como el cloroformo, de posible acción cancerígena. La reacción del cloro con residuos orgánicos puede resultar en la formación de reacciones potencialmente mutagénica o carcinogénica de frutas y vegetales (Hidaka et al, 1992). Es por eso que existe una preocupación por los operarios que utilizan estos desinfectantes. Esto es un tema de inquietud puesto que algunas restricciones en el uso del cloro se pudieron implementar por las agencias reguladoras. Por

lo tanto, un número de alternativas al cloro se han examinado, y algunos están en uso comercial (Sapers, 2001).

La exposición a vapores de cloro por tiempos prolongados puede causar irritación de la piel y tracto respiratorio. Según la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA), el límite de exposición para trabajadores es de 1 ppm en el aire y se recomienda no más de 0.5ppm en aire en jornadas de 10 horas durante semanas de trabajo de 40 horas (OSHA, 2006).

El efecto de soluciones de hipocloritos sobre microorganismos en la superficie de frutas y hortalizas está bien documentado. En general se utilizan concentraciones entre 50-200 ppm durante uno ó dos minutos (FDA, 2001). Las máximas reducciones alcanzadas son de aproximadamente dos logaritmos, siendo en muchos casos similares a las alcanzadas por tratamientos con agua. Por ejemplo, Pao y Davis (1999) demostraron que la cantidad de *Escherichia coli* inoculadas en la superficie de naranjas se reducía dos Log/ml luego de la inmersión en solución de 200 ppm de cloro por ocho minutos, siendo esta reducción apenas superior a la alcanzada por inmersión en agua. En esta misma línea, Winniczuk (1994) demostró que la inmersión de naranjas en 1000 ppm de ácido hipocloroso por 15 segundos lograba una reducción del 90% de la flora superficial en comparación con el 60% lograda por la inmersión en agua. Sin embargo existen trabajos que muestran reducciones mayores, tales como el de Wu y colaboradores (2000). En dicho trabajo se documenta la reducción de siete log en la carga de *Shigella sonnei* sobre hojas enteras de perejil por inmersión en una solución de 250 ppm de cloro libre durante cinco minutos.

2.6.3 Ácido peroxiacético

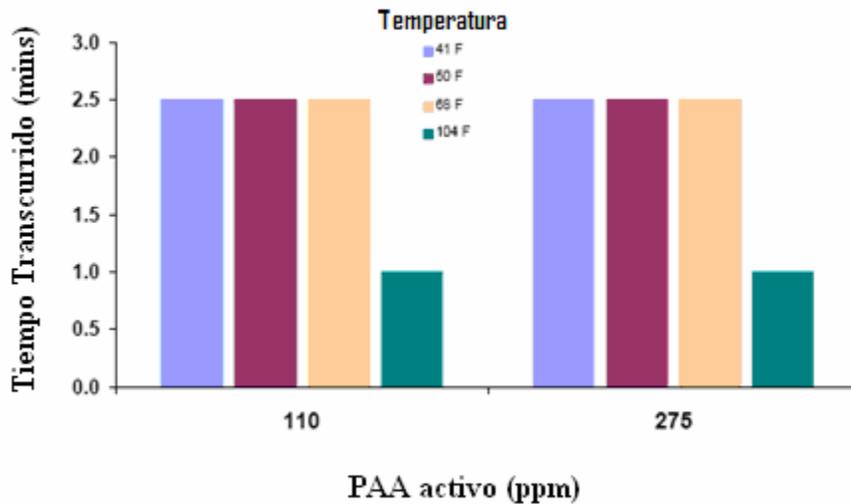
El ácido peroxiacético es un fuerte agente oxidante. Comercialmente se consigue como mezcla de ácido peroxiacético, ácido acético y peróxido de hidrógeno. Los productos de reacción con materia orgánica son ácido acético y oxígeno, los cuales no son tóxicos. Su actividad depende del pH, siendo más activos a pH más bajo. Sin embargo su actividad se mantiene en un amplio rango de pH, disminuyendo en forma marcada por encima de pH 9.00. Su acción antimicrobiana se basa en su capacidad oxidante. Se plantea que los grupos sulfhidrilos en proteínas, enzimas y otros metabolitos son oxidados. De esta forma se pierde la funcionalidad de muchas de estas macromoléculas, lo cual trae como consecuencia la ruptura celular por pérdida de funcionalidad de la membrana citoplasmática.

Rodgers y colaboradores (2004) determinaron la eficacia *in vitro* de ácido peroxiacético (80 ppm) sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. En las condiciones del ensayo ambos patógenos fueron disminuidos en aproximadamente cinco log, en 70 a 75 seg. Su uso como desinfectante en frutas y hortalizas está documentado en varios trabajos. Por ejemplo, Wright y colaboradores (2000) encontraron que la carga de manzanas inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 bajaba dos log cuando se trataba con ácido peroxiacético de 80 ppm. Según los trabajos de Winniczuk (1994) la microflora superficial de naranja se reducía un 85% después de un cepillado en agua seguido de un baño de 15 segundos en ácido peroxiacético 200 ppm, comparado con una reducción de 60% cuando el baño se realizaba solo con agua.

La FDA (2001) recomienda su uso para la desinfección directa de frutas y hortalizas en base a las regulaciones de la Agencia de Protección Ambiental (EPA). La concentración recomendada es de 40-80 ppm. La Gráfica 2.1 muestra que a una temperatura de 104°F

(40°C) se logra eliminar a *Salmonella* Typhimurium en un tiempo de un minuto comparado con temperaturas más bajas donde el tiempo requerido es mayor. Esto tiene la ventaja que podría calentar el agua de lavado para evitar infiltración y aún así el ácido peroxiacético continua siendo efectivo versus el cloro. Al aumentar la temperatura del agua disminuye la solubilidad del cloro y esto afecta su efectividad como agente desinfectante.

Gráfica 2.1 Efectividad de PAA a diferentes temperaturas versus tiempo que le toma eliminar a *Salmonella* Typhimurium



Fuente: Envirotech Company, 2008

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de la bacteria *Salmonella* Typhimurium

Se utilizó una cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 provista por la Administración Federal de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y almacenada a -80°C en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico del Recinto Universitario de Mayagüez. La bacteria se transfirió a un caldo nutritivo y se almacenó en refrigeración a una temperatura de 4-5°C.

3.2 Curva de crecimiento de la bacteria

Se realizó una curva de crecimiento de la bacteria para saber la cantidad de la bacteria *Salmonella* Typhimurium que se encontraba en el inóculo utilizado para contaminar los tomates luego de 18 horas de incubación. Se determinó la densidad óptica (DO) de la bacteria con un espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys^{IM}8) (Figura 3.1) utilizando un cultivo puro y fresco de la bacteria en 50 ml de caldo nutritivo. El experimento se realizó por duplicado. El inóculo fue incubado a una temperatura de 37°C en una incubadora con agitación. El crecimiento de la bacteria fue medido cada treinta minutos en un periodo de 24 horas por duplicado. Cada 30 minutos se removía 1 ml de cada matraz para leer su absorbancia y simultáneamente se realizó un recuento en plato de la bacteria. El número de colonias (UFC, unidades formadores de colonia) fue determinado realizando diluciones seriadas de 0.1% agua peptona hasta la dilución 10⁻⁹. Luego se transfirió 0.1 ml de cada

dilución a platos Petri con agar nutritivo utilizando la técnica de esparcido en plato. Estos platos fueron incubados a 37°C por 24 horas.

Figura 3.1. Espectrofotómetro: Thermo Spectronic, Genesys^{IM}8



3.3 Preparación del Inóculo

La cepa de *Salmonella* Typhimurium se transfirió a caldo nutritivo y fue incubada a 37°C por 18-24 horas. La bacteria luego fue almacenada a una temperatura entre 4-5°C hasta ser utilizada en el experimento. El día antes de los experimentos se transfirieron 4.7 ml de la bacteria a un matraz que contenía 50 ml de caldo nutritivo. El matraz se incubó a 37°C por 18-24 horas en una incubadora con agitación. Luego el inóculo fue transferido a un envase de acero inoxidable previamente esterilizado que contenía cuatro litros de agua destilada. La concentración del inóculo fue de $9 \log_{10}$ CFU/ml según determinado por la técnica de esparcido en platos Petri con agar nutritivo.

3.4 Recolección de los tomates

Se recolectaron y analizaron tomates frescos, sin lavar, de diez fincas de tomate hidropónico (Ver Apéndice A y B). Las fincas estaban localizadas en los pueblos de Lares, Cidra y Sabana Grande. Se recolectó tomates frescos en cultivo de suelo, sin lavar, en una sola finca localizada en el pueblo de Jayuya. Durante la visita se recolectaron aproximadamente 25 libras de tomates de cada finca mayormente en la época de abril a mayo. Las últimas tres fincas muestreadas fueron de septiembre a noviembre. Los tomates se obtuvieron libres de defectos ó cortadas y de similar madurez. Además se midió la temperatura y pH de los tomates de cada finca analizada. Para medir la temperatura se utilizó termómetro (Bi-Therm[®] Thermometer) que media directamente la temperatura del interior del tomate en la finca. Para medir el pH se utilizó como instrumento de medición un potenciómetro (pH meter AB 15 Accumen Basic[®]) previamente calibrado con soluciones amortiguadoras pH 4.00, 7.00 y 10.00. Se tomaron 20 gramos de muestra la cual fue homogenizada con 20 mililitros de agua destilada en un mortero de porcelana y luego filtrada. Se realizó esta medición por triplicado.

3.5 Inoculación de los tomates

Los tomates fueron inoculados sumergiéndolos en el envase con el inóculo por un tiempo de contacto de tres minutos, excepto la muestra control negativo sin inocular. Se inoculó un control positivo estos fueron tomates sin los tratamientos desinfectantes. El control positivo solo se realizó en las últimas cuatro fincas muestreadas. Luego se removieron los tomates del inóculo y se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 minutos.

En el Apéndice C y D muestran fotografías de los tomates antes y después de la inoculación con *Salmonella entérica* Typhimurium.

3.6 Preparación de las soluciones desinfectantes

3.6.1 Hipoclorito de sodio

El agua clorada se preparó diluyendo 7.0 mL de hipoclorito de sodio (XY-12[®], Ecolab, Inc., 8.4% w/w de hipoclorito de sodio) (Apéndice F) en 10 litros de agua destilada hasta obtener una concentración de 200 ppm de cloro libre, a una temperatura de 35°C y un pH de 6.50 en un baño de María (Isotemp 220, Fisher Scientific©). La concentración de cloro libre presente en la solución se determinó utilizando Chlorine Test Strips[®] (Ecolab, Inc.); mientras que el pH de la solución fue ajustado utilizando ácido clorhídrico al 1% (HCl) y se verificó con un metro de pH (pH meter AB 15 Accumen Basic[®]).

3.6.2 Ácido Peroxiacético

El ácido peroxiacético (PAA) (Tsunami 100[®], Ecolab, Inc.) está compuesto de 15.2% de ingrediente activo (Ver Apéndice F). El mismo fue preparado añadiendo 1.5 mL del Tsunami 100 en 10 litros de agua destilada en un baño de María. La concentración del Tsunami 100 fue de 40 ppm, a una temperatura de 35°C y un pH de 6.50. La concentración del Tsunami 100 se verificó utilizando “Paracetic Acid Test Strips” (Ecolab, Inc.) mientras que el pH de la solución fue ajustada utilizando ácido clorhídrico al 1% (HCl) y se verificó con el metro de pH.

3.6.3 Inmersión en agua caliente

En el baño de María se añadieron 10 litros de agua destilada hasta alcanzar una temperatura de 55°C (HW) y un pH neutral (pH=7.00). El pH de la solución fue ajustado utilizando ácido clorhídrico al 1% (HCl) y se verificó con el metro de pH.

3.6.4 Inmersión en agua a temperatura ambiente

En el baño de María se añadieron 10 litros de agua potable hasta alcanzar una temperatura aproximadamente de 25°C (LP) y un pH neutral (pH=7.00).

3.7 Tratamientos con los desinfectantes

Los diferentes tratamientos desinfectantes mencionados anteriormente se realizaron en el laboratorio utilizando el baño de María (Figura 3.2). Doce tomates hidropónicos por cada finca fueron utilizados por cada tratamiento durante 60 y 120 segundos de tiempo de contacto, incluyendo las muestras de tomates de control negativo sin inocular y el control positivo de tomate inoculado sin realizarle ningunos de los tratamientos. En el Apéndice E muestra una fotografía de los tomates después del proceso de los diferentes tratamientos desinfectantes.

Figura 3.2. Baño de María: Isotemp 220, Fisher Scientific©.



3.8 Análisis Microbiológico de los tomates

3.8.1 Recuento de Bacterias Aeróbicas Totales (APC)

Para este procedimiento se utilizó el método convencional de recuento total de aerobios en plato, según explicado en el capítulo tres del “Bacteriological Analytical Manual” (BAM, 2007). Se utilizó un homogenizado de la muestra para el recuento total de aerobios.

3.8.2 *Salmonella spp.*

Para determinar la presencia de *Salmonella spp.* en la superficie e interior de los tomates se utilizó el método convencional según explicado en el capítulo cinco del BAM. El análisis para detectar *Salmonella spp.* requiere varios pasos antes del cultivo de las muestras. El primero de estos pasos es el pre-enriquecimiento, el cual consiste en mezclar 25.0g del interior del tomate con 225.0 mL de agua peptona. Y para analizar la superficie de los

tomates se le realizó un enjuague con caldo de Preenriquecimiento Universal (UP). Dicha mezcla fue incubada a 35.0 °C por 24 horas. Luego del periodo de incubación, 0.1mL de la mezcla fue transferido a 10.0 mL de “Rappaport Vassiliadis” (RV, por sus siglas en inglés) y 10.0mL de caldo de Tretationato (TT, por sus siglas en inglés) e incubadas en baño de agua por 24 horas a 42.0°C en RV y a 43.0 °C para TT.

Una alícuota de 1.0mL procedente de cada caldo (RV y TT) fue cultivado en agar “Bismuth Sulfite” (BS, por sus siglas en inglés), “Hektoen Enteric” (HE, por sus siglas en inglés) y Xylose Lysine Desoxycholate (XLD, por sus siglas en inglés). Las placas de BS, HE y XLD fueron incubadas a 35.0°C por 24 horas.

Pruebas bioquímicas de confirmación fueron realizadas transfiriendo una colonia típica y una atípica a tubos con “Lysine Iron Agar” (LIA) y “Triple Sugar Iron Agar” (TSI). Los tubos de TSI y LIA fueron incubados a 35.0 °C por 24 horas. El medio TSI contiene rojo fenol como indicador, que junto con sulfato de hierro (FeSO_4), produce sulfuro de hidrógeno (H_2S). Si el microorganismo es fermentador de glucosa, el fondo y el estriado tendrán un color amarillo mientras que, si el microorganismo fermenta lactosa y/o sacarosa, el estriado únicamente tendrá una coloración amarilla. En LIA el indicador del medio es el púrpura bromocresol, por lo que, si el microorganismo decarboxila lisina a cadaverina, el medio tendrá una coloración violeta. Debido a la fermentación de glucosa la reacción ocurre en un medio ácido. Los microorganismos que no decarboxilan lisina pero sí fermentan glucosa producen una coloración amarilla en todo el medio de cultivo.

Salmonella típicamente produce una superficie roja (alcalina) en el tubo y un fondo amarillo (ácido) con o sin formación de H₂S (tubo negro) en TSI. En LIA lo típico para *Salmonella* es el fondo violeta (alcalino) con o sin formación de H₂S.

3.9 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos de recuento de bacterias aeróbicas totales (APC) fueron analizados basado en el estadístico F obtenido de la tabla de análisis de varianza ANOVA (Infostat, 2006) de la partición de la variabilidad total entre fincas y tratamientos para poder determinar si existen o no diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las muestras de tomates hidropónicos (Ver Apéndice J).

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos para detectar presencia o ausencia de *Salmonella* spp. fueron analizados basado en el estadístico de Tabla de Contingencias y el estadístico de la prueba Chi Cuadrado (X^2) para determinar la susceptibilidad de los tratamientos desinfectantes (Infostat, 2006) (Ver Apéndice K).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

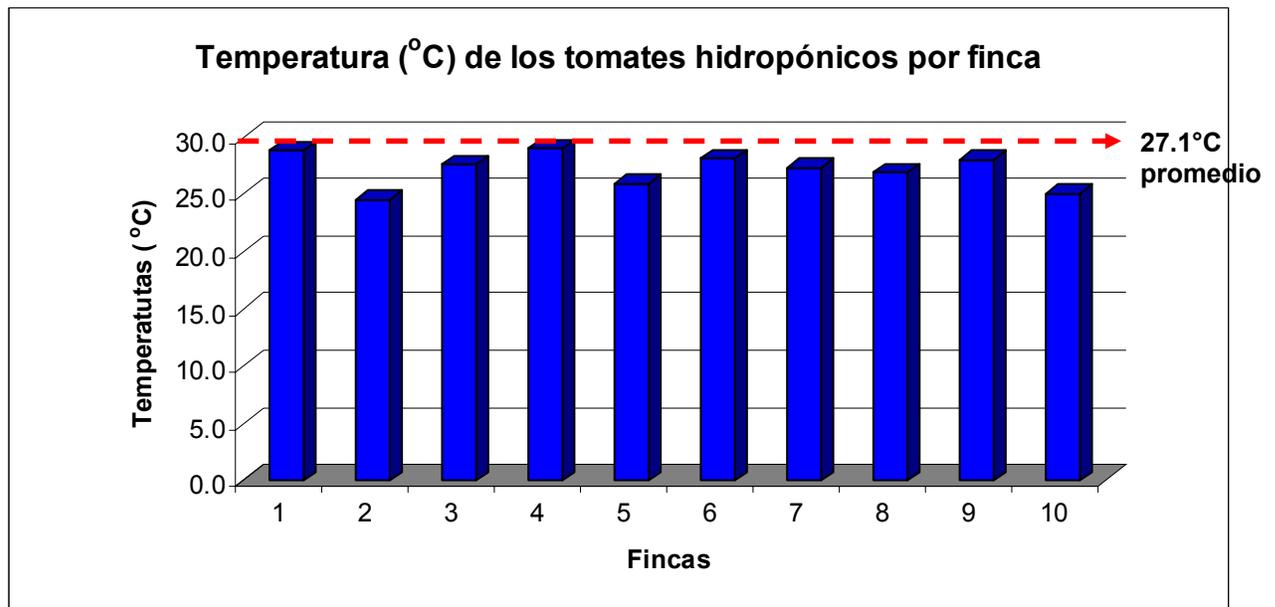
La mayoría de las frutas frescas y hortalizas consumidas en los Estados Unidos y Puerto Rico se mantienen en buen estado y libres de microorganismos que podrían causar alguna enfermedad debido al manejo, prácticas de preparación de alimentos u operaciones de lavado. Además, muchas frutas y hortalizas tienen barreras naturales que minimizan las posibilidades de cualquier contaminación de la superficie que pueda ser transferida al interior del alimento. Aunque no es una barrera impenetrable, la superficie lisa y cerosa del tomate ha demostrado que aumenta la eficacia de eliminar la contaminación durante el lavado. Diferentes investigaciones han demostrado que utilizar un leve cepillado en combinación con algún desinfectante reduce enormemente la contaminación superficial. Sin embargo, las investigaciones han determinado que la remoción microbiana de la zona de la cicatriz del tallo es particularmente difícil de lograr. La contaminación de la superficie exterior del tomate o los tejidos internos por patógenos microbianos sólo puede resultar, en última instancia, de una fuente externa del medio ambiente ya sea en la calidad del agua de lavado ó de riego y la higiene de los trabajadores (Tapia et al, 2005).

4.1 Características fisicoquímicas de los tomates hidropónicos analizados

La Gráfica 4.1 presenta las diferentes temperaturas promedio de los tomates hidropónicos para las fincas visitadas. Las temperaturas fluctuaban entre 24.5°C a 29.0°C. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las temperaturas de las diferentes fincas. Los tomates eran recogidos en el horario de 8:00 AM a 10:00 AM, esta temperatura por lo general, no es tan elevada en comparación con la temperatura registrada después del

mediodía. Todas las fincas analizadas se encontraban en la zona de Lares y la mayoría se muestreó en la misma época de abril a mayo. Es importante monitorear este factor para poder prevenir, controlar y/o evitar la infiltración bacteriana. Se recomienda una diferencia menor de 10°C para evitar dicha fenómeno.

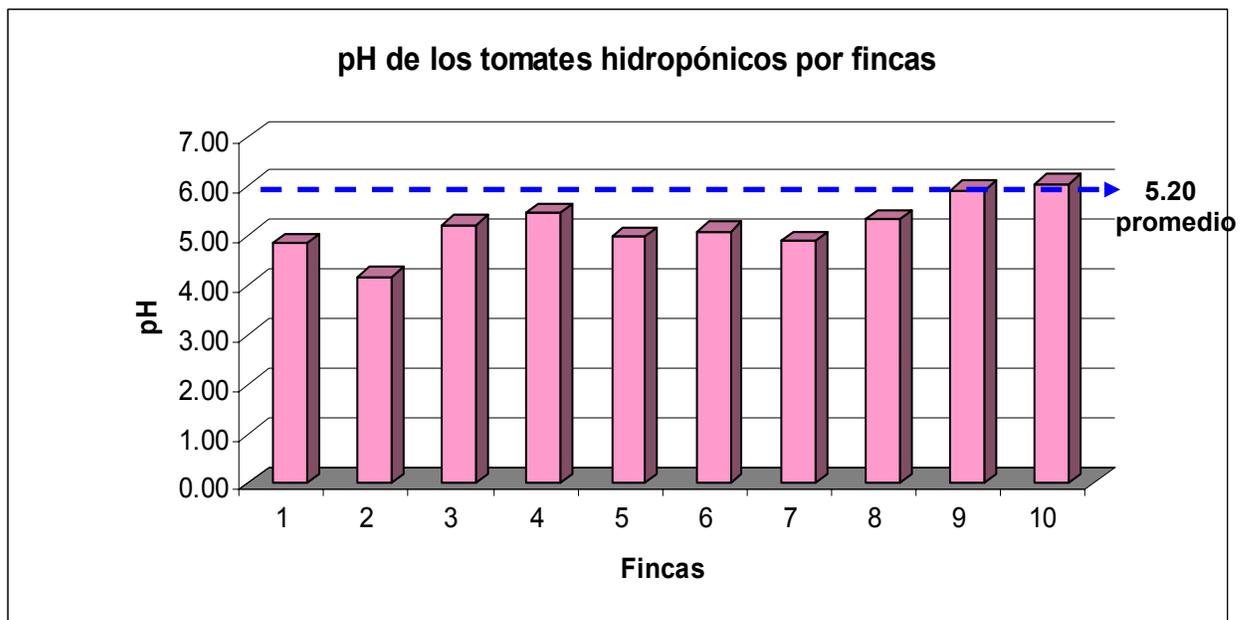
Gráfica 4.1. Temperaturas promedio (°C) de tomates hidropónicos.



La Gráfica 4.2 presenta las diferentes medidas de pH promedio de los tomates hidropónicos en las fincas visitadas. Los valores de pH fluctuaron entre 4.17 a 6.05. No hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las medidas de pH reportada en las diez fincas analizadas. Sin embargo, los diferentes valores observados pueden estar relacionados a variaciones relacionadas a la variedad de tomate utilizada en las fincas. La mayoría de las fincas utilizaban la variedad de tomates conocido como Pink Ripe, Tiranus y Match. La mayoría de los agricultores opinaban que dichas variedades eran resistentes al calor y algunas enfermedades por hongo e insectos. El control del pH es muy importante en la elaboración de

los productos alimentarios, tanto como indicador de las condiciones higiénicas como para el control de bacterias patogénicas. El pH, como la temperatura y la actividad de agua son importantes para la conservación de los alimentos. Un valor de pH entre 2.5 y 5.5 prolonga la conservación de la fruta fresca e inhibe la reproducción de microorganismos. Lo mismo ocurre con los vegetales en un intervalo entre 4.6 y 6.4. Sin embargo *Salmonella* spp. puede crecer a un pH entre 3.7 a 9.5 (FDA, 1998). Por lo tanto, bajo las condiciones estudiadas el valor de pH no sería un factor limitante para el crecimiento de *Salmonella* spp.

Gráfica 4.2. pH promedio de los tomates hidropónicos.

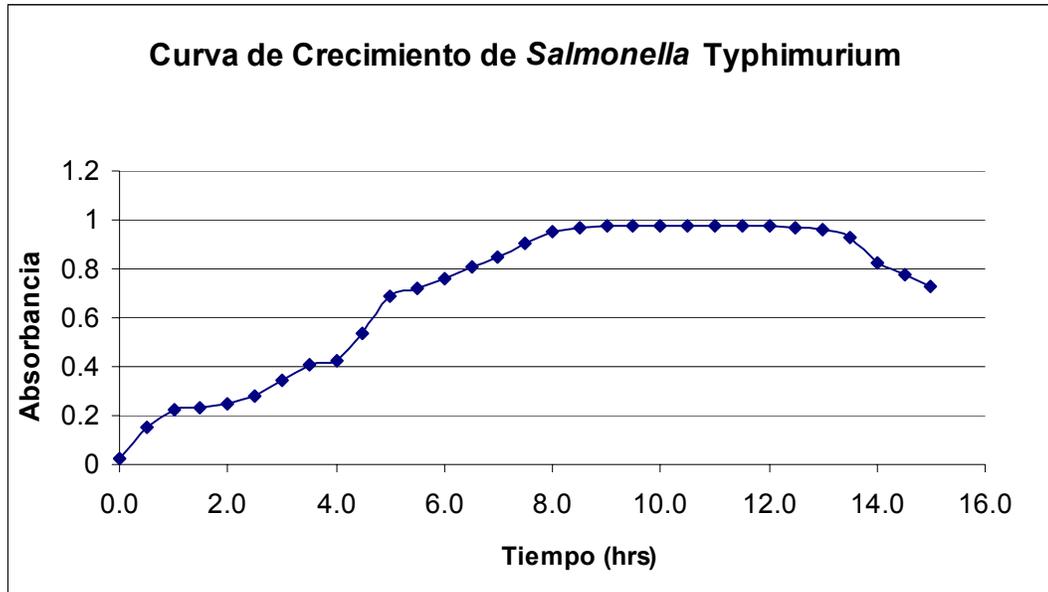


4.2. Datos del inóculo usado para contaminar tomates hidropónicos

La Gráfica 4.3 muestra la curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium incubada a 37°C. *Salmonella* Typhimurium tuvo un tiempo de generación de 30 minutos que fue determinado buscando los puntos donde se duplica la absorbancia en la fase logarítmica y

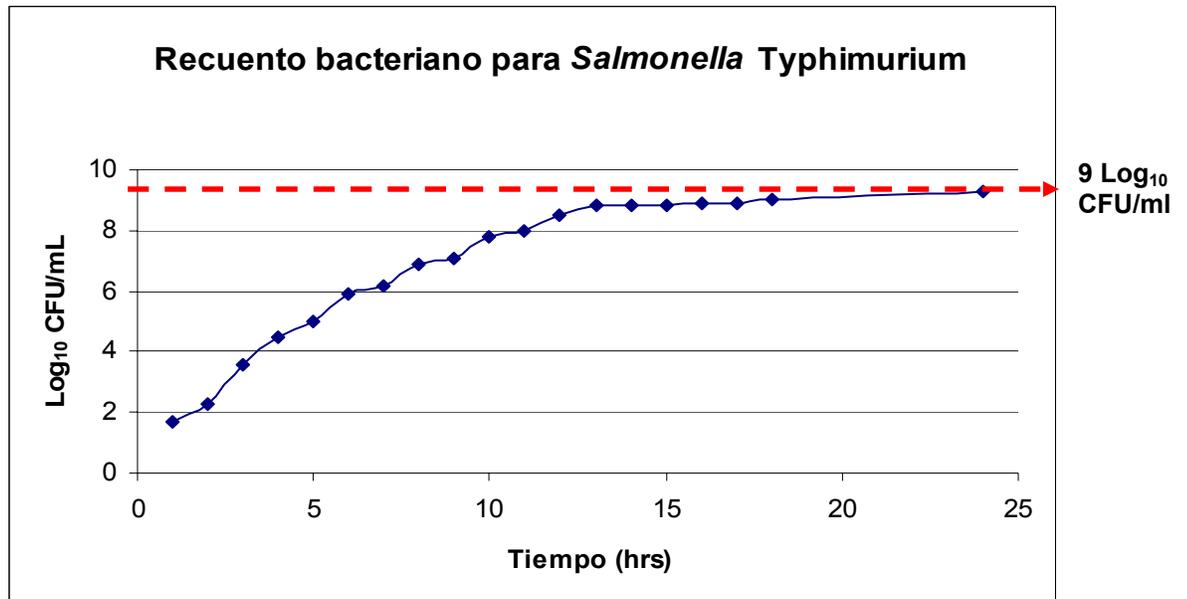
luego se restan los tiempos. La fase estacionaria empezó después de las 8 horas de incubación a 37°C en caldo nutritivo. Después de las 12 horas de incubación se observa una rápida disminución en la población bacteriana.

Gráfica 4.3 Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium a 37°C



La Gráfica 4.4 muestra la curva de recuento microbiano para *Salmonella* Typhimurium durante el mismo periodo. Luego de 15 horas de incubación la bacteria mantuvo una población bacteriana de 9 Log₁₀ CFU/ml hasta concluido el experimento. De esta forma nos aseguramos tener una población bacteriana en números adecuados para observar el efecto de los agentes desinfectantes sobre la bacteria.

Gráfica 4.4 Curva de recuento para *Salmonella* Typhimurium a 37°C



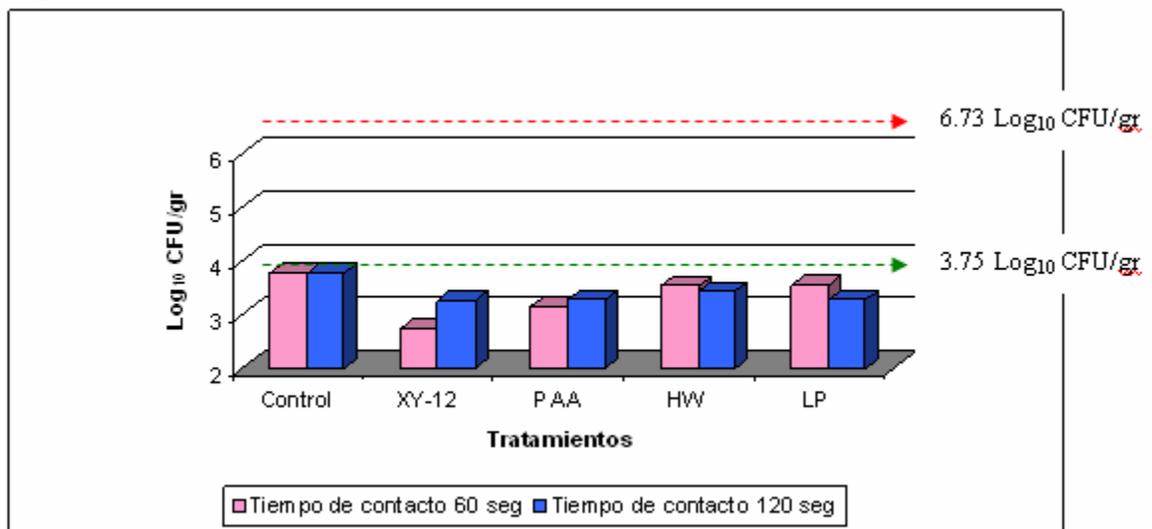
Efecto de los agentes desinfectantes

4.3 Recuento de bacterias aeróbicas totales

La Gráfica 4.5 muestra el recuento de bacterias aeróbicas totales antes de realizarle los tratamientos desinfectantes, o sea, la muestra control, y luego de los tratamientos desinfectantes. Estadísticamente no hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre todos los tratamientos desinfectantes a un tiempo de contacto de 60 ó 120 segundos. Tampoco hubo diferencias significativas entre las diez fincas analizadas (Ver Apéndice J). Ninguno de los tratamientos desinfectantes presentó una reducción de la carga microbiana al menos de un ciclo log, por lo tanto, no hubo diferencia entre los tratamientos. En la mayoría de las fincas el recuento de bacterias aeróbicas totales en tomates hidropónicos fue menor a lo reportado en la literatura de tomate de suelo. Yuk y colaboradores (2005) reportan un recuento de bacteria aeróbicas totales de 6.37 Log₁₀ CFU/gr en tomates de suelo. Esto es debido a que los

tomates hidropónicos son cultivados con el menor contacto del suelo y materia orgánica. Sin embargo, al realizarle un recuento de bacterias aeróbicas totales a tomates de suelo locales obtuvimos un recuento de 3.75 Log₁₀ CFU/gr. No hay diferencia significativa entre los recuentos de bacterias aeróbicas totales en tomates de suelo y tomates hidropónicos locales. Se esperaba que el recuento de bacterias fuera mayor en los tomates de suelo al estar expuesto a mayor materia orgánica e inorgánica. Aunque no se puede discutir estadísticamente esta diferencia ya que solo se analizó una sola finca de tomates de suelo y no es representativa a la población de estos cultivos. Estos recuentos de bacterias dependen de la variedad de tomate, del tipo de suelo y de las Buenas Prácticas Agrícolas (GAP's) que tenga la finca de donde proviene los tomates.

Gráfica 4.5. Recuento de Bacterias Aeróbicas Totales (Log₁₀ CFU/ml) en tomates hidropónicos antes y después de los tratamientos desinfectantes.



- - - - - ➔ Recuento de acuerdo a Yuk y otros, 2005
 - - - - - ➔ Recuento de tomates de suelo locales Jayuya

XY-12 = Hipoclorito de sodio a 35°C (200 ppm)
 PAA = Ácido peroxiacético 35°C (40 ppm)
 HW = Agua caliente a 55°C
 LP = Agua potable a 25°C

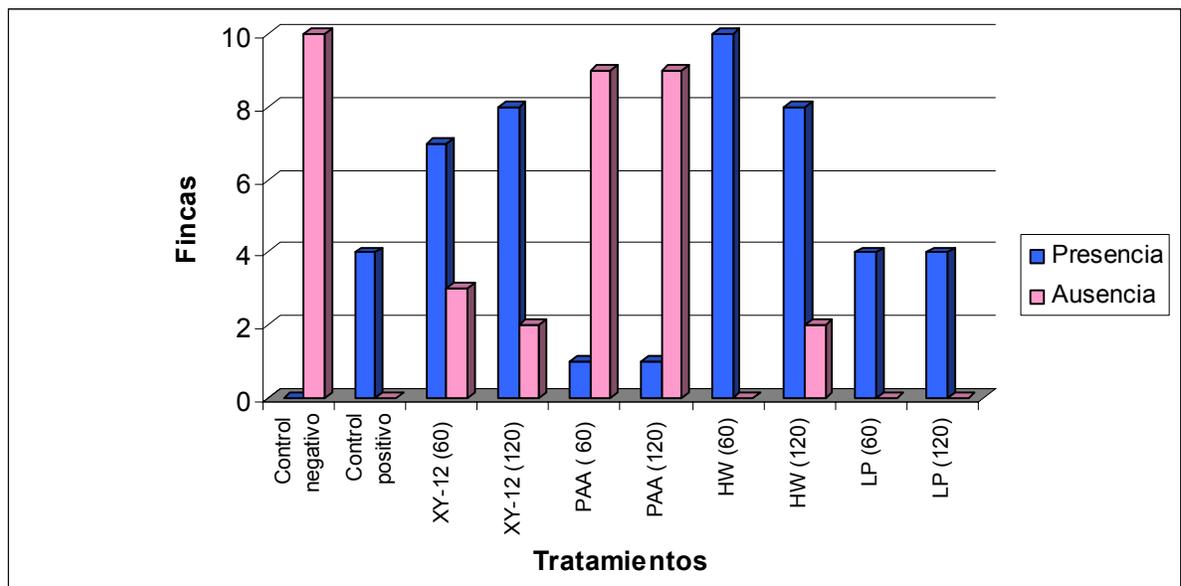
El cloro (hipoclorito) se ha utilizado por décadas como desinfectante en la industria de alimentos. Los químicos que son basados en cloro han demostrado ser eficaces en reducir poblaciones microbianas en el uso de agua durante operaciones de lavado y empaque. Generalmente se utiliza una concentración de 50 a 200 ppm de hipoclorito (XY-12) que es el cloro libre en un tiempo de contacto de 1 a 2 minutos para desinfectar superficies de frutas, vegetales y equipo de proceso. La concentración de cloro libre puede ser afectada significativamente por la temperatura, presencia de materia orgánica, la luz, el aire y metales (Vero, 2004).

El tratamiento térmico por inmersión en agua caliente (55°C) es un método físico utilizado para lograr una sanitización superficial en vegetales. Generalmente se utiliza una temperatura entre 50-70°C, dependiendo del producto a tratar. Yohoshua (2003) demostró que una inmersión durante 2 minutos en agua caliente a 53°C prevenía la aparición de síntomas en frutas cítricas inoculadas con *Penicillium digitatum*. El problema del tratamiento en agua caliente es que le causa lesión al tomate y afecta las propiedades organolépticas. Sin embargo, el tratamiento con ácido peroxiacético ha demostrado ser efectivo reduciendo carga microbiana. Según los trabajos de Winniczuk (1994) la microflora superficial de naranja se reducía un 85% después de un cepillado en agua seguido de un baño de 15 segundos en ácido peroxiacético 200 ppm.

4.4 Efecto de agentes desinfectantes sobre *Salmonella* spp.

La Gráfica 4.6 presenta los resultados de los análisis microbiológicos para detectar presencia o ausencia de *Salmonella* Typhimurium en la superficie de los tomates hidropónicos de las diez fincas analizadas.

Gráfica 4.6 Resultados del análisis microbiológico para detectar *Salmonella* spp. en la superficie de tomates hidropónicos.

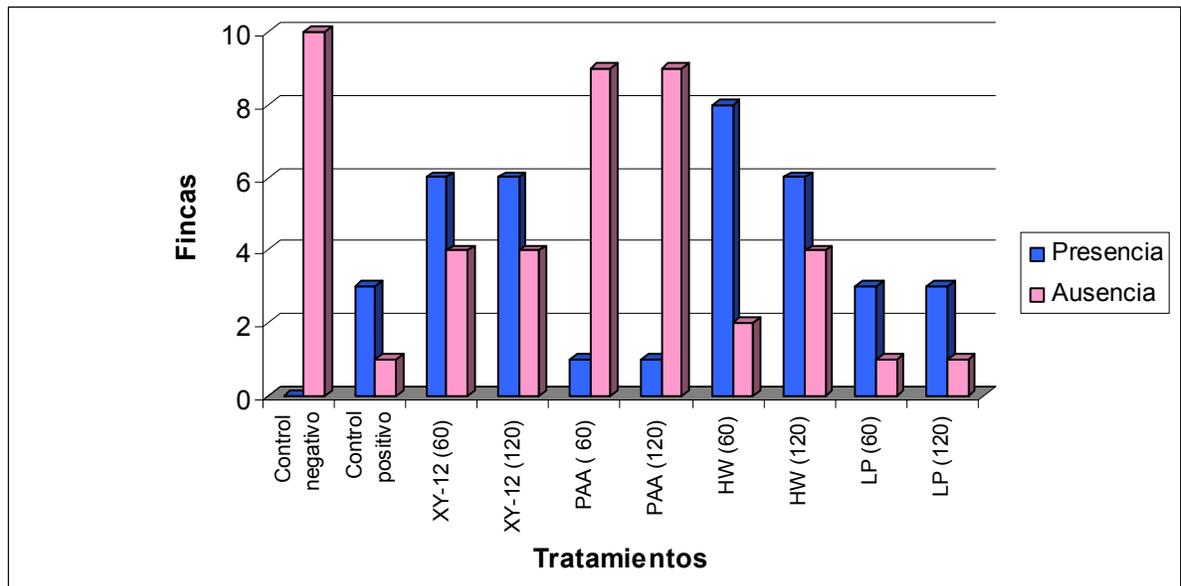


XY-12 = Hipoclorito de sodio a 35°C (200 ppm)
PAA = Ácido peroxiacético 35°C (40 ppm)
HW = Agua caliente a 55°C
LP = Agua potable a 25°C

60 = 60 segundos de tiempo de contacto
120 = 120 segundos de tiempo de contacto

La Gráfica 4.7 presenta los resultados de los análisis microbiológicos para detectar presencia y/o ausencia de *Salmonella* Typhimurium en el interior de los tomates hidropónicos de las fincas analizadas.

Gráfica 4.7. Resultados del análisis microbiológico para detectar *Salmonella* spp. en el interior de los tomates hidropónicos.



XY-12 = Hipoclorito de sodio a 35°C (200 ppm)
 PAA = Ácido peroxiacético 35°C (40 ppm)
 HW = Agua caliente a 55°C
 LP = Agua potable a 25°C

60 = 60 segundos de tiempo de contacto
 120 = 120 segundos de tiempo de contacto

Estadísticamente ($P \leq 0.05$) se encontró que el tratamiento con ácido peroxiacético (PAA) tuvo una susceptibilidad diferente al compararlo con los demás tratamientos desinfectantes en la eliminación de *Salmonella* Typhimurium en la superficie e interior de los tomates. Podemos decir que el PAA fue el desinfectante con mayor efectividad eliminando la bacteria patógena de *Salmonella* Typhimurium en los tomates hidropónicos. Los tratamientos con hipoclorito de sodio, agua caliente (55°C) y agua potable a temperatura

ambiente mostró resultados positivos para *Salmonella* spp. en la mayoría de los tomates analizados. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos para el tiempo de contacto de 60 y 120 segundos del agente desinfectante con el tomate.

La mayoría del crecimiento registrado fue el típico para *Salmonella* spp. En todas las muestras de tomates lavados con los desinfectantes hipoclorito de sodio, agua caliente y agua a temperatura ambiente se observaron colonias sospechosas de *Salmonella* spp. con crecimiento típico y atípico. Las colonias típicas o atípicas para *Salmonella* spp. fueron subcultivadas en los medios bioquímicos TSIA y LIA. *Salmonella* spp. puede tener o no tener la producción de H₂S debido a que depende de si la bacteria puede fermentar carbohidratos y producir el sulfuro de hidrógeno. Las muestras sospechosas de *Salmonella* spp. en los tubos TSIA mostraron un color negro con producción de H₂S esto es debido a que el tiosulfato de sodio que contiene el medio se reduce a sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con la sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Las muestras sospechosas de *Salmonella* spp. en los tubos LIA mostraron un color negro debido a la producción de sulfuro de hidrógeno el cual se visualiza un ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro. El Apéndice G y H muestran los resultados de colonias típicas de *Salmonella* spp. en los platos XLD, HE y BS y el Apéndice I muestran resultados de las pruebas bioquímicas TSIA y LIA.

Las investigaciones científicas han demostrado que el tratamiento de PAA tiene un impacto dramático sobre la bacteria *Salmonella* en lavado en fase acuosa, detectando cero colonias sobrevivientes. Sin embargo hipoclorito de sodio tiene relativamente menor impacto

en la bacteria de *Salmonella* en un tiempo de contacto de un minuto (Howarth y Rodrigues, 2008). Vadlamudi (2004) encontró que el lavado con agua solamente ó el lavado con agua seguido de un lavado con 200mg/L de cloro no causa diferencia significativa ($P < 0.05$) en la reducción de *Salmonella* cuando se compara con el recuento de la bacteria del control en las áreas de la superficie y cicatriz del tomate.

El agua clorada es generalmente utilizada para tratar frutas y vegetales frescos en procesadoras de alimentos para minimizar los riesgos microbiológicos. Sin embargo el tratamiento con agua clorada no siempre es exitoso (Brackett, 1999). En estudios previos se ha notado que el tratamiento con agua clorada a 35°C comparado con 25°C o 45°C es más efectivo contra *Salmonella* spp (Felkey, 2002). Aunque en este estudio el hipoclorito de sodio no fue tan efectivo como esperábamos utilizando la temperatura y el pH recomendado por el manufacturero e investigaciones previas. Wei y otros (1995) también mostraron que el tratamiento de cloro a 100 ppm a temperatura ambiente fracasó completamente en matar a *Salmonella* Montevideo en la superficie lisa y la cicatriz del tallo del tomate. Estas diferencias pueden ser debido a la temperatura y pH de la solución del cloro ó el lugar utilizado para el tratamiento. Liao y Sapers (2000) muestra que la eficacia del tratamiento con cloro es afectada por el tipo de fruta ó vegetal, el microorganismo, el tiempo de exposición, temperatura y pH. Felkey (2002) reportó que el tratamiento con cloro a 35°C y un pH de 6.5 fue óptimo matando la *Salmonella* en la superficie del tomate. En adición, el baño de agua circulando utilizado en ese estudio se esperaba que tuviese un efecto en la bacteria sobre la superficie, haciendo más susceptible al tratamiento.

La infiltración pudo haber ocurrido por la cicatriz del tallo aunque en algunos tratamientos la diferencia de temperatura del tomate y la temperatura del agua de lavado era menor de 10°C. Este fenómeno podría entonces explicar la presencia de *Salmonella* en el interior de los tomates.

Este mismo efecto se observó con los tomates de suelo tratado con los mismos desinfectantes. El tratamiento con agua caliente dañaba la piel de la superficie del tomate resultando en una posible infiltración de la bacteria al interior del tomate por la diferencia tan grande en las temperaturas de los tomates y el agua de lavado. Se pudo observar sin embargo que los tomates tratados con los diferentes desinfectantes y agua caliente duraron dos semanas más con una buena apariencia física que los que no tuvieron ningún tipo de lavado almacenado en refrigeración a 5°C.

5 CONCLUSIÓN

La demanda de frutas y vegetales frescos de alta calidad, listas para ser consumidas y vida útil prolongada se ha incrementado a nivel mundial. Los alimentos consumidos crudos son potencialmente más peligrosos que los alimentos que se cocinan previamente al consumo, ya que el tratamiento de cocción destruye muchas de las toxinas producidas por algunos microorganismos y causa la muerte de patógenos infecciosos como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. En muchos estudios indican que *Salmonella* es el patógeno más frecuentemente encontrado en el melón y el tomate. Estrategias de control como la aplicación de buenas prácticas de agricultura, manufactura, así como la implementación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP) y de trazabilidad, están siendo de utilidad para que la industria pueda garantizar al consumidor frutas y vegetales inocuos y de alta calidad.

En este estudio se evaluó la efectividad de diferentes tratamientos desinfectantes sobre *Salmonella* Typhimurium y la probabilidad de infiltración en tomates hidropónicos de diferentes áreas de Puerto Rico durante operaciones de lavado. Hubo presencia de *Salmonella* Typhimurium inoculada en los tomates después de realizarle los diferentes tratamientos desinfectantes en las diez fincas de hidropónicos analizadas. El ácido peroxiacético (PAA) fue el desinfectante de mayor efectividad eliminando *Salmonella* Typhimurium. Los tratamientos de hipoclorito de sodio (XY-12), agua caliente (55°C) y agua

a temperatura ambiente (25°C) fueron menos efectivos eliminando el patógeno. Durante los tratamientos realizados se pudo observar el fenómeno de infiltración.

En el análisis microbiológico del recuento de bacterias aeróbicas totales no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos desinfectantes y el control. Los tomates hidropónicos locales tuvieron un recuento de bacterias aeróbicas totales parecidos a los tomates de suelo locales aunque no se puede comparar estadísticamente por que la finca de tomate de suelo no es una muestra representativa. Esto es debido a las Buenas Prácticas de Agricultura (GAP's) en las diferentes fincas de tomates. Es importante que las fincas analicen la calidad del agua de riego y de lavado. El recuento de bacterias aeróbicas totales va influenciar el largo de vida y la rapidez de deterioro de los tomates. Los tomates hidropónicos lavados con los diferentes desinfectantes tuvieron un largo de vida mayor que los tomates sin lavar. Recuentos altos de bacterias aeróbicas totales significa que las buenas prácticas de higiene no están siendo llevadas a cabo. Para evitar la infiltración de patógenos como *Salmonella* se debe tener en cuenta las temperaturas del agua de lavado y del tomate, además se debe considerar el desinfectante a utilizar y el tiempo de contacto del tomate con este.

6 RECOMENDACIONES

- Realizar estudio comparativo con tomates de suelo.
- Determinar la razón de destrucción para cada agente desinfectante.
- Elaborar manuales informativos a industrias involucradas de manera que se puedan desarrollar estrategias de intervención uniformes para esta industria a nivel local.
- Determinar factores a nivel molecular que puedan estar favoreciendo la adhesión de *Salmonella* spp. en estructuras biológicas de frutas y vegetales y adaptaciones de crecimiento en ambientes extremos.

7 REFERENCIAS

Arias R., Lee T.C., Specca D. y Janes H. 2000. Quality Comparison of Hydroponic Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) Ripened On and Off Vine. J. Food Sci. 65(3):545-548.

Bacteriological Analytical Manual (BAM), 2007.
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>

Barkai-Golan R., Padova R., Ross I., Lapidot M., Davidson H. y Copel A. 1993. Combined hot water and radiation treatments to control decay of tomato fruits. Sci Hortic 56:101-105.

Bartz J.A. 1982. Infiltration of tomatoes immersed at different temperatures to different depths in suspensions of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Plant Dis 66:302-306.

Bartz J.A. y Showalter R.K. 1981. Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. Phytopathol 71:515-518.

Beuchat L.R. 1996. 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. World Health Organization, Food Safety Unit WHO/FSF/FOS/98.2.

Beuchat L.R. 1999. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. J. Food Prot 62:845-849.

Beuchat L.R., Adler B.B. y Lang M.M. 2004. Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. J. Food Prot 67:1238-1242.

Bhunja A.K. 2008. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. P 93-212.

Brackett R.E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. Postharvest Biol Technol 15:305-311.

Buchanan R.L., Edelson S.G., Miller R.L. y Sapers G.M. 1999. Contamination of intact apple after immersion in an aqueous environment containing *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Prot 62(5):444-450.

Burnett S.L., Chen J. y Beuchat L.R. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surface and internal structure of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* 66:4679-4687.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. 1993. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Montevideo infections. Publication EPI-AID 93-97. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. 2002. Outbreak of *Salmonella* serotype Javiana infections-Orlando, Florida, June. *MMWR* 51(31):683-684.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. 2005. Outbreak of *Salmonella* infections associated with eating Roma tomatoes-United States and Canada, 2004. *MMWR* 54(13):325-328.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. 2007. Annual listing of foodborne disease outbreaks, United States, 1990-2004. Disponible en: http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak_data.htm.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. 2008. Investigación de los brotes infecciosos causados por *Salmonella* saintpaul. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/SalmonellaSaintpaul/>.

[CDC] Center for Disease Control and Prevention. 2009. Actualización de las investigaciones: Brotes infecciosos causado por *Salmonella* Typhimurium, 2008-2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/es/typhimurium/>

Cornell University. 2000. Brotes bacteriano de frutas y hortalizas 1988-2006. *Good Agricultural Practices. Resource Manual*.

Cummings K., Barrett E., Mohle-Boetani J.C., Brooks J.T., Farrar J., Hunt T., Fiore A., Komatsu K., Werner S.B. y Slutsker L. 2001. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. *Emerg Infect Dis* 7(6):1046-1048

Departamento de Salud de Puerto Rico. 2006. Enfermedades Entéricas de Notificación obligatoria Puerto Rico 2004-2006. División de Epidemiología.

Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2008. National Agricultural Statistics Service. Table 12. Census 2005 of Agriculture Puerto Rico.

Elez-Martínez P. y Martín-Belloso O. 2005. Food safety aspects of pulsed electric fields. In: Sun DW, editor. Emerging technologies for food processing. Boston, Mass.: Academic Press. P 183-218.

Envirotech Company. 2008. Disponible en: <http://envirotech.com/peraceticacid/index.asp>

ERS-USDA. 2004. The Economics of Food, Farming and Natural Resources and Rural America. The Food Consumption data system. Economic Research Service. Available from: <http://www.ers.usda.gov/Data/foodConsumption/datasystem.asp>.

Estación Experimental Agrícola de PR. 2007. Conjunto tecnológico para la producción de tomate de ensalada.

Fallik E.; Grinberg S.; Gambourg M.; Klein J.D. y Lurie S. 1996. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit Plant Pathology. 45(1): 92-97.

Felkey K.D. 2002. Optimization of chlorine treatments and the effects on survival of *Salmonella* spp. on tomatoes surfaces. MSci thesis. Gainesville, Fla.: Univ of Florida.

[FDA] Food and Drug Administration. 1998. Food Microbiological Control Manual. Division of Human Resource Development, Training and Development Branch

[FDA] Food and Drug Administration. 1999. Guide to minimizing microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. Disponible en: <http://www.foodsafety.gov/~dms/prodguid.html>.

[FDA] Food and Drug Administration. 2001. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh –Cut Produce En: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-5.html>

Guo X., Chen J., Beuchat L.R. y Brackett R.E., 2001. PCR detection of *Salmonella* enterica serotype Montevideo in and on tomatoes using primers derived from *hlyA*. Appl. Environ. Microbiol. 66:5248-5252.

Hedberg C.W., Angulo F.J., White K.E., Langkop C.W., Schell W.L., Stobierski M.G., Schuchat A., Besser J.M., Dietrich S., Helsen L., Griffin P.M., MacFarland J.W. y Osterholm M.T. 1999. Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. Epidemiol Infect 122(3):385-393.

Hidaka T., Kirigaya T., Kamijo M., Kawamura T. y Kawauchi S. 1992. Disappearance of residual chlorine and formation of chloroform in vegetables treated with sodium hypochlorite. J. Food Hyg. Soc. Japan. 33:267-273.

Howarth J. y Rodrigues T. 2008. The effectiveness of water, sodium hypochlorite bleach, and peroxyacetic acid (PAA) in eradicating *Salmonella* Typhimurium from the surface of tomatoes. Enviro Tech Chemical Services.

Ibarra-Sánchez L.S., Alvarado-Casillas S., Rodríguez-García M.O., Martínez-González N.E. y Castillo A. 2004. Internalization of bacterial pathogens and their control by selected chemicals. J. Food Prot 67:1353-1358.

Infostat. 2006. Software Estadístico. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>

Jay J.M., 2005. Modern Food Microbiology. 7th ed. P 125-143.

Liao, C.H. y Sapers, G.M. 2000. Attachment and growth of *Salmonella* Chester on apple fruits and in vivo response of attached bacteria to sanitizer treatments. J. of Food Prot 63(7):876-883.

Manchester Hydroponics LTD. 2007. Disponible en: <http://www.manchesterhydroponics.co.uk/80415/info.php?p=6>

Maneley J.C. y Stanghellini M.E. 1974. Detection of enteric bacteria within locular tissue of healthy cucumbers J Food Sci. 39: 1267-1268

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S. y Shapiro C. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 5:607-625.

[OSHA] Occupational Safety & Health Administration. 2006. U.S. Department of Labor Occupational Safety and Health Standards. Disponible en: <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/chlorinedioxide/recognition.html>.

Pao S. y Davis C.L. 1999. Enhancing microbiological safety of fresh orange juice by fruit immersion in hot water and chemical sanitizers. J. Food Prot. 62:756-760

Resh H.M. 2001. Cultivos hidropónicos. 5^{ta} ed. P 36-37

Riso P., Brusamolino A. y Porrini M. 2003. Tomato and cancer. In: Watson RR, editor. Functional foods & nutraceuticals in cancer prevention. Iowa State Press. P 133-152.

- Rodgers S.L., Cash J.N., Siddiq M. y Ryser E.T. 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J Food Prot.* 67:721-731.
- Takeuchi K. y Frank J.F. 2000. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce leaves as affected by inoculum size and temperature, and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J. Food Prot.* 63: 434-440
- Tapia M.S., Raybaudi R.M. y Martin O. 2005. Patógenos asociados a frutas frescas cortadas. Incidencia, supervivencia y crecimiento, brotes y control. Instituto de Ciencia y Tecnología de la Universidad Central de Venezuela.
- Samish Z., Etinger-Tulczynska R. y Bick M. 1963. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 28:259-266.
- Sapers G.M. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods. *Food Technology and Biotechnology.* 39(4), 305-311.
- Schirra M., D'hallewin G., Ben-Yehoshua S. y Fallik E. 2000. Host-pathogen interaction modulated by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology.* 21: 71-85
- Seo K.H. y Frank J.F. 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.* 62: 3-9
- Ukuku D.O. 2004. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. *International J. Food Microbiology.* 95(2) 137-146.
- Ukuku D.O.; Pilizota V. y Sapers G.M. 2000. Influence of washing treatment on native microflora and *Escherichia coli* population of inoculated cantaloupes. *J. Food Safety.* 21: 31-47
- Ukuku D.O. y Sapers G.M. 2000. Effect of Sanitizer Treatments on *Salmonella* Stanley Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-cut Tissues During Cutting Practices. *J. Food Prot.* 64: 1286-1291

United States Standards for Grades of Fresh Tomatoes. 1991. AGENCY: Agricultural Marketing Service, USDA. Disponible en:

<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5050331>.

United States Standards for Grades of Greenhouse Tomatoes. 1966. AGENCY: Agricultural Marketing Service, USDA. Disponible en:

<http://www.hort.purdue.edu/fruitveg/veg/vegstds/tomatogr.pdf>.

Vadlamudi S. 2004. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella Enterica* serotype Poona on the surface of cantaloupe and cell transfer to the internal tissue during cutting practice. Thesis submitted to Texas A&M University.

Vero Silvana. 2004. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Facultad de Química de UDELAR.

Yohoshua B.S. 2003. Effect of High Temperature Treatments on Growth of *Penicillium* spp. and their Development on 'Valencia' Oranges. Food Science and Technology International. Vol. 13, No. 1, 63-68

Yuk H.G., Bartz J.A. y Schneider K.R. 2005. Effectiveness of individual or combined sanitizer treatments for inactivating *Salmonella* spp. On smooth surface, stem scar, and wounds tomatoes. J. Food Sci 70(9):M409-414

Wei C.I., Huang T.S., Kim J.M., Lin W.F., Tamplin M.L. y Bartz J.A. 1995. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfection with chlorinated water. J. Food Prot 58:829-836.

Winniczuk, P.P. 1994. Effects of sanitizing compounds on the microflora of orange fruit surfaces and orange juice [M.S.]. Gainesville (FL): Univ of Florida Graduate School.

Wright J.R., Summer S.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D. y Zoecklein, B.W. 2000. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on apples using wash and chemical sanitizer treatments. Dairy Food Environment Sanitization 20:120-126.

Wu F.M., Doyle, M.P., Beuchat L.R., Wells J.G., Mintz E.D. y Swaminathan B. 2000. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. J. Food Prot. 63:568-572.

Zhuang R.Y., Beuchat L.R. y Angulo F.J. 1995. Fate of *Salmonella* Montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl Environ Microbiol* 61:2127-2131.

Zhuang R.Y. y Beuchat L.R., 1996. Effectiveness of trisodium phosphate for killing *Salmonella* Montevideo on tomatoes. *Letters in Applied Microbiology*. 22(2):97-100.

APÉNDICES

Apéndice A. Finca 9 de tomates hidropónicos visitada



Tomates Hidropónicos

Apéndice B. Tomates hidropónicos antes de ser inoculados con *Salmonella* Typhimurium.



Tomates Hidropónicos en el “fume hood”.

Apéndice C. Los tomates hidropónicos en el proceso de inoculación de $9 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/ml}$ de *Salmonella entérica* Typhimurium..



Apéndice D. Tomates hidropónicos después de inocularlo con la bacteria. Se dejaron secar por 30 minutos en temperatura ambiente.



Apéndice E. Tomates en el proceso de secado después de los tratamientos desinfectantes.



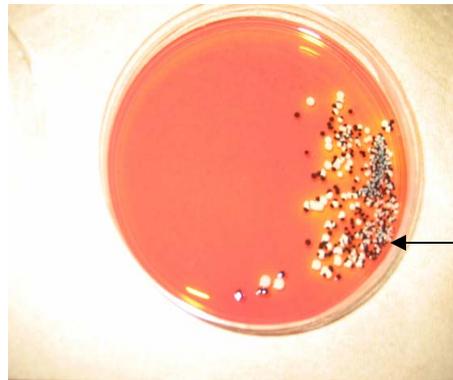
Apéndice F. Los tratamientos desinfectantes. A. Hipoclorito de sodio (XY-12) y B. Acido peroxiacético (PAA).



A

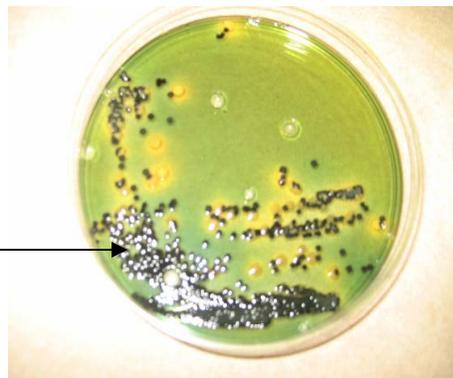
B

Apéndice G. Colonias típicas de *Salmonella* spp. en el agar “Xylose Lisyne Desoxycholate”, “Hektoen Enteric” y “Bismuth Sulfide”.



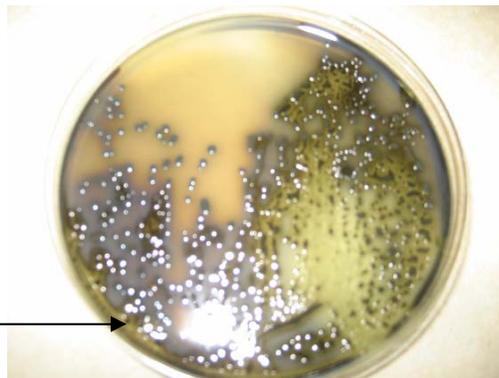
**Colonias típicas
negras**

Muestra de tomates tratados con hipoclorito de sodio (XY-12) a 60 segundos de contacto en XLD



**Colonias típicas
negras**

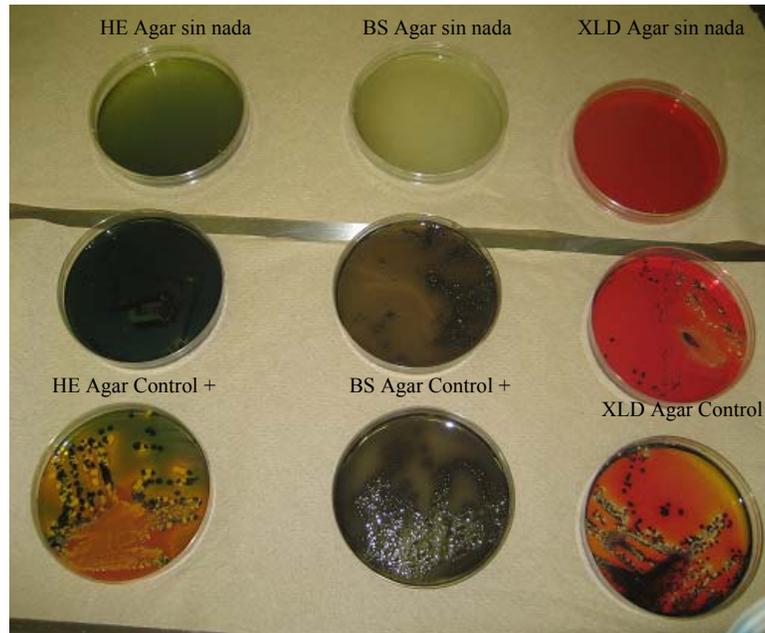
Muestra de tomates tratados con hipoclorito de sodio (XY-12) a 1 min de contacto en medio HE



**Colonias típicas
negras con brillo
metálicos**

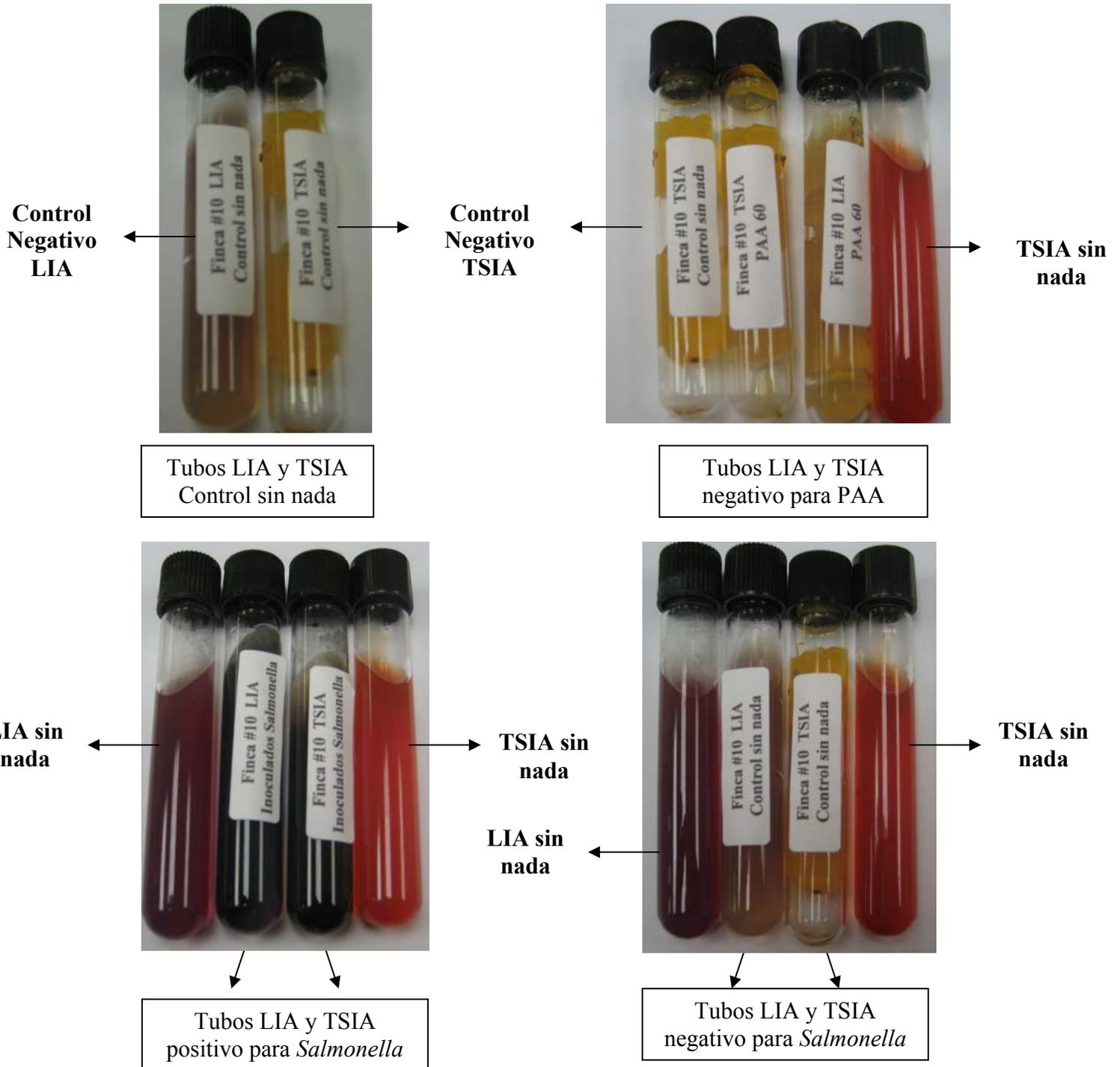
Muestra de tomates tratados con hipoclorito de sodio (XY-12) a 1 min. de contacto en medio BS

Apéndice H. Resultados de Control positivo con *Salmonella* Typhimurium en medios con agar “Xylose Lisyne Desoxycholate”, “Hektoen Enteric” y “Bismuth Sulfide”.



Platos Petri con medio HE, BS y XLD inoculados con *Salmonella* Typhimurium (Control Positivo)

Apéndice I. Resultados de las pruebas bioquímicas “Triple Sugar Iron Agar” (TSIA) y “Lysine Iron Agar” (LIA).



Apéndice J. Análisis Estadístico (ANOVA) para el Recuento de Bacterias Aeróbicas Totales (APC) en los tomates hidropónicos en las diez fincas muestreadas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
APC Log	78	0.18	0.00	43.02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	25.01	17	1.47	0.75	0.7365
Fincas	17.01	9	1.89	0.97	0.4759
Tratamientos	8.00	8	1.00	0.51	0.8428
Error	117.22	60	1.95		
Total	142.22	77			

$\alpha = 0.05$

F_{α} Fincas = 2.04

F_{α} Tratamientos = 2.10

Fincas

$F < F_{\alpha}$; $0.97 < 2.04$

Tratamientos

$F < F_{\alpha}$; $0.51 < 2.10$

Apéndice K. Análisis Estadístico de Tabla de Contingencias y Chi Cuadrado para la detección de *Salmonella* spp. en los tomates hidropónicos utilizando diferentes tratamientos desinfectantes.

Superficie

Tablas de contingencia

Frecuencias: Frecuencias

Frecuencias absolutas

En columnas: Resultados

Tratamientos	ausencia	presencia	Total
Control Negativo	10	0	10
Control Positivo	0	4	4
HW 120 sec	2	8	10
HW 60 sec	0	10	10
LP 120 sec	0	4	4
LP 60 sec	0	4	4
PAA 120 sec	9	1	10
PAA 60 sec	9	1	10
XY-12 120 sec	2	8	10
XY-12 60 sec	3	7	10
Total	35	47	82

Frecuencias esperadas

En columnas: Resultados

Tratamientos	ausencia	presencia	Total
Control Negativo	4.27	5.73	10.00
Control Positivo	1.71	2.29	4.00
HW 120 sec	4.27	5.73	10.00
HW 60 sec	4.27	5.73	10.00
LP 120 sec	1.71	2.29	4.00
LP 60 sec	1.71	2.29	4.00
PAA 120 sec	4.27	5.73	10.00
PAA 60 sec	4.27	5.73	10.00
XY-12 120 sec	4.27	5.73	10.00
XY-12 60 sec	4.27	5.73	10.00
Total	35.00	47.00	82.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	52.98	9	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	66.68	9	<0.0001
Coef. Conting. Cramer	0.57		
Coef. Conting. Pearson	0.63		

$\alpha = 0.05$

$X^2_{\alpha} = 16.9$

$X^2 > X^2_{\alpha}; 52.98 > 16.9$

Interno

Tablas de contingencia

Frecuencias: Frecuencias

Frecuencias absolutas

En columnas: Resultados

Tratamientos	ausencia	presencia	Total
Control Negativo	10	0	10
Control Positivo	1	3	4
HW 120 sec	4	6	10
HW 60 sec	2	8	10
LP 120 sec	1	3	4
LP 60 sec	1	3	4
PAA 120 sec	9	1	10
PAA 60 sec	9	1	10
XY-12 120 sec	4	6	10
XY-12 60 sec	4	6	10
Total	45	37	82

Frecuencias esperadas

En columnas: Resultados

Tratamientos	ausencia	presencia	Total
Control Negativo	5.49	4.51	10.00
Control Positivo	2.20	1.80	4.00
HW 120 sec	5.49	4.51	10.00
HW 60 sec	5.49	4.51	10.00
LP 120 sec	2.20	1.80	4.00
LP 60 sec	2.20	1.80	4.00
PAA 120 sec	5.49	4.51	10.00
PAA 60 sec	5.49	4.51	10.00
XY-12 120 sec	5.49	4.51	10.00
XY-12 60 sec	5.49	4.51	10.00
Total	45.00	37.00	82.00

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	30.11	9	0.0004
Chi Cuadrado MV-G2	36.01	9	<0.0001
Coef. Conting. Cramer	0.43		
Coef. Conting. Pearson	0.52		

$$\alpha = 0.05$$

$$X^2_{\alpha} = 16.9$$

$$X^2 > X^2_{\alpha}; 30.11 > 16.9$$