

Efecto de etiquetado láser en la supervivencia de *Salmonella* spp. en la superficie de tomate

Lenin Orlando Interiano Villeda

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2009

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de etiquetado láser en la supervivencia de *Salmonella* spp. en la superficie de tomate

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Lenin Orlando Interiano Villeda

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2009

Efecto de etiquetado láser en la supervivencia de *Salmonella* spp. en la superficie de tomate

Presentado por:

Lenin Orlando Interiano Villeda

Aprobado:

Edgar Ugarte, M.Sc.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria Alimentaria

Michelle Danyluk, Ph.D.
Asesora

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

Interiano, L. 2009. Efecto de etiquetado láser en la supervivencia de *Salmonella* spp. en la superficie de tomate. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 22 p.

Revisando los datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos de América se encontró que el número de brotes de enfermedades alimenticias asociados a frutos frescos se duplicó en un período de tres años, 1988 - 1991, a comparación de 14 años, 1973 - 1987; Asimismo el número de personas infectadas también se ha duplicado. Una de las enfermedades alimenticias más comunes es salmonelosis y es conocido que los tomates crudos han sido causantes de grandes brotes. En muchos de estos casos de enfermedades alimentarias la fuente exacta no se determina, se llega hasta empacadoras o procesadores. Una manera de reforzar el sistema de inocuidad de alimentos en frutos frescos y proveer rastreabilidad es con etiqueta individual en frutas y vegetales, esta etiqueta láser no puede ser retirada, dañada o intercambiada, por tanto asegura la inviolabilidad de los frutos. El estudio se llevo a cabo en la Universidad de Florida, las muestras fueron almacenadas a 25 y 4 °C, se determinaron 4 secuencias de etiquetado, tomando en cuenta el proceso de etiquetado, inoculación de *Salmonella* y la presencia o ausencia de aceite protector de la etiqueta. El estudio fue conducido durante 14 días, tomando muestras al día 0, 1, 4, 7, 10 y 14, todas por duplicado y con 3 repeticiones. Las poblaciones de *Salmonella* fueron distintas durante los 14 días de muestro (Pr <.0001), pero las secuencias de etiquetado no las afectaron (Pr 0.0792), a su vez la interacción de la temperatura-tiempo si afecto (Pr 0.0295); aunque la temperatura de almacenamiento, las cuatro secuencias de etiquetado y el tiempo no actuaron sobre las poblaciones de *Salmonella* (Pr 0.1448).

Palabras clave: bacteria patógena, frutas, inocuidad, nueva etiqueta, rastreabilidad, vegetales.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN LITERARIA	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
5. CONCLUSIONES.....	13
6. RECOMENDACIONES	14
7. BIBLIOGRAFÍA.....	15
8. ANEXOS.....	17

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro

1. Análisis de varianza medidas repetidas para el Entre factor.	9
2. Matriz Suma de Cuadrados y producto Crusado para el Estadístico Wilks' Lambda para el Co factor.	10

Figura

3. Diluciones seriadas.	6
4. Comportamiento de poblaciones de <i>Salmonella</i> a 4 °C.	10
5. Comportamiento de poblaciones de <i>Salmonella</i> a 25 °C.	11
6. Efecto de la interacción Tiempo-Temperatura.	11

Anexo

7. Calidad de etiqueta a 4°C, Control, sin etiqueta.....	17
8. Calidad de etiqueta a 4°C, etiqueta.	18
9. Calidad de etiqueta a 4°C, etiqueta con aceite.	19
10. Calidad de etiqueta a 25°C, Control, sin etiqueta.....	20
11. Calidad de etiqueta a 25°C, etiqueta.	21
12. Calidad de etiqueta y aceite a 25°C, etiqueta.	22

1. INTRODUCCIÓN

Durante las dos últimas décadas, en los Estados Unidos de América ha ocurrido un incremento en el consumo de frutos frescos. (Tauxe et. al. 1997). Revisando los datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos de América se encontró que el número de brotes de enfermedades alimenticias asociados a frutos frescos represento el doble en tres años, desde 1988 a 1991, que en 14 años desde 1973 a 1987, asimismo el número de personas infectadas también se duplico. (Tauxe et. al. 1997). En 2000, una investigación ejecutada por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos, (FDA) involucró frutos importados, 40 de las 1000 muestras (4%) resultaron positivas a bacterias patógenas, de las cuales 35 (80%) resultaron positivas a contaminación de *Salmonella* y 9 (20%) a *Shigella* (CFSAN-FDA. 2001).

Varios brotes de salmonelosis han sido causados por consumo de tomates crudos contaminados, tres grandes brotes se produjeron por el consumo de tomates crudos contaminados con *Salmonella* Javiana en 1992, *Salmonella* Montevideo en 1993, y *Salmonella* Baildon en 1999 en diferentes estados (CFSAN-FDA. 2001); Muchos de los brotes de *Salmonella* se rastrearon hasta la empacadora, pero en muchos de los casos no se determino el campo donde se cosecharon. En junio de 2002, *Salmonella* Javiana fue la causa de un brote en Transplant Games en Orlando, Florida, Estados Unidos, el origen del roto era tomate crudo en cubitos (Toth et. al. 2002). Cabe mencionar que en 2004 ocurrieron tres brotes separados de salmonelosis asociado con consumo de tomates Roma crudos en Estados Unidos y Canadá, la fuente exacta no quedo esclarecida, pero una sola empacadora en Florida y muchos procesadores en los estados de Georgia y Carolina del sur fueron sospechosos (CDC 2005; Roebuck 2004). En mayo de 2005, un muestreo rutinario programado por la FDA descubrió *Salmonella* en tomates Pera de California y un aviso se emitió, ningún caso fue reportado (U.S. FDA 2005). Más recientemente, el 10 de julio, 2008, un brote de *Salmonella* Saintpaul con causa no determinada, infecto a 1090 personas en 42 estados, el distrito de Columbia y Canadá, es otro indicador de la falta de un sistema eficiente de rastreabilidad y bioseguridad en la cadena de frutos frescos.

El etiquetado individual de frutas y vegetales frescos tiene el potencial para proporcionar la rastreabilidad a los productos frescos y, por tanto, reforzar los sistemas de inocuidad de los alimentos contra los brotes de origen alimentario. Actualmente, cada fruto es marcado con una etiqueta de "Price Look Up", (PLU) que contiene un código de 4 dígitos desarrollado por "Produce Electronic Identification Board", (PEIB) el cual identifica la variedad de fruta o vegetal (PEIB. 1995). La etiqueta PLU se adhiere a la superficie de la fruta o vegetal en la línea de empackado (Varon and Paddock 1978). La etiqueta PLU presenta varias desventajas entre ellas, dejar un residuo pegajoso en la superficie del fruto cuando se retira, como también el daño a la superficie cuando es removido usualmente por

las uñas (Durand-Wayland 2005). Una nueva manera de etiquetar frutos frescos es un “Tatuaje”, una etiqueta láser sobre la superficie del fruto, el aparato para etiquetado es un láser de CO₂ de baja energía (10,600 nm.) (Drouillard and Rowland 1997) model XY mark 10 (Durand-Wayland LaGrange Ga.) que crea una pequeña depresión en la superficie del tomate.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de etiquetado láser en la supervivencia de *Salmonella* spp. en tomates almacenados a 25 y 4 °C.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de dos temperaturas comunes de almacenamiento, en la población de *Salmonella* en tomates con etiquetado láser.
- Evaluar el efecto de 4 secuencias de etiquetado láser en la población de *Salmonella* en tomates.
- Evaluación de supervivencia de *Salmonella* durante 14 días.

2. REVISIÓN LITERARIA

Salmonella es una bacteria patógena que produce serios problemas sanitarios, es usualmente encontrada de forma natural en el ambiente y está catalogada como contaminante de frutas y vegetales (Beuchat 1996; Thunberg et. al. 2002). *Salmonella* no crece en ambiente con actividad de agua (*Aw*) menor a 0.92, pero puede sobrevivir por largos periodos de tiempo (Juven et. al. 1984), *Salmonella* es muy versátil, puede crecer a temperaturas desde 2 °C (Baker et al. 1986) hasta 54 °C (Droffner and Yamamoto 1992) y en un rango amplio de pH, desde 3.99 (Asplund and Nurmi 1991) hasta 9.5 (Holley and Proulx 1986).

Salmonella infecta típicamente animales y humanos por ingestión de alimentos o agua contaminada, las infecciones de *Salmonella* representan un estimado de 1.5 millones de casos, causando así, 16,430 hospitalizaciones y 582 muertes por año en Estados Unidos de América. (Mead et. al. 1999). Los tomates crudos se han reconocido como vehículos para los brotes de origen alimentario desde 1990 (Wood et. al. 1991), los tomates se pueden contaminar con *Salmonella* mediante el contacto con excretas animales (pájaros, insectos, roedores y reptiles), suelo contaminado, agua contaminada (irrigación o lluvia), estiércol compostado inapropiadamente usado como fertilizante durante crecimiento y cosecha de los frutos, o empleados infectados (Wei et. al. 1995). Wells and Butterfield (1997), demostraron que la incidencia de *Salmonella* en frutos, es un poco mayor con la interacción de hongo de las raíces, o con heridas en la superficie, que en los frutos sanos.

El manejo que brindan las plantas procesadoras y empacadoras los tomates antes de ser transportados a sus instalaciones, es un lavado con agua clorinada, para controlar contaminación cruzada post-cosecha, el proceso consiste en colocar los tomates en tanques conteniendo agua con 150 a 200 ppm de cloro libre a 10 °C, comúnmente a un pH 6.5 a 7, por un periodo corto de tiempo, antes de ser empacados (Bartz et. al. 2001), sin embargo, el lavado de los tomates con agua clorinada no elimina de manera eficiente la contaminación adherida en fisuras, zonas cóncavas y convexas en la superficie del tomate, aunque el agua conteniendo 50 a 200 ppm de cloro se reportó que inactivó bacterias patogénicas, varios grupos de frutos fueron expuestos a estas concentraciones de cloro resultando en reducciones menores a 2-log en la carga microbiana (Beuchat. 1992; Zhuang et. al. 1995; Beuchat 1999; Cherry 1999; Taormina y Beuchat 1999); Adicionalmente, altas concentraciones de cloro pueden reaccionar con material orgánico, como los carbohidratos, en la superficie de los frutos, formando productos órgano-clorados, que pueden resultar carcinogénicos (Richardson et. al. 1998; Rodgers et. al. 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Ubicación:

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Educación de los Cítricos (Citrus Research and Educational Center, CREC), Instituto de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos (Institute of Food and Agricultural Science, IFAS), Universidad de Florida (University of Florida, UF), Lake Alfred, Florida, Estados Unidos de América. El análisis estadístico se llevó a cabo en el Centro de Cómputo Estudiantil, de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

3.1.2 Materiales:

Se usaron tomates variedad Roma proveídos por la empresa Tomatoes of Ruskin, 202 11th Ave. NW Ruskin, FL, Estados Unidos. Se utilizaron cinco variedades de *Salmonella* para inocularlos tomates, como medio de cultivo se usó Agar tríptico de soya (TSA; Difco, Detroit, MI, USA). Para suspender las bacterias y lavar los tomates al recuperar la *Salmonella* se usó caldo de *soja tríptico* (TSB; Difco, Detroit, MI, USA). Para evitar contaminación al momento de contar colonias se usaron bacterias resistentes al antibiótico Rifampicin (rif) (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Butterfield's phosphate buffer (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, USA) fue usado como medio de suspensión de bacterias en el ciclo de lavado.

3.1.3 Equipo:

Se hizo uso de estufas para disolver el medio en agua ultra filtrada antes de ser esterilizadas en el autoclave, para preparar el inóculo se usó tubos Falcon centrifugables, y para preparar el medio se utilizó Beaker, Pipetas de 25, 10, 1ml y 200, 20ul fueron usadas para hacer diluciones y transferencias de cultivo, se usó una centrifuga (AllegraX-12 centrifuge, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Desarrollar Resistencia a Antibiótico:

Las cepas seleccionadas de *Salmonella* se sustrajeron del congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se dejaron descongelar por 5 min. a temperatura ambiente, $23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego se extrajo una bolita y se distribuyó en un plato petri con TSA, se incubó a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 hrs, se seleccionó una colonia y se trasladó a otro plato petri con TSA, se incubó a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 hrs, se tomó una colonia y se colocó en un tubo de ensayo con 9mL de TSB libre de rif, fue incubado a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 hrs, después de la incubación se tomó 1ml de la solución y se transfirió a otro tubo de ensayo con 9ml de TSB con 2ug rif, se incubó a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 hrs, cada día después de ser extraído del incubador se transferían a otro tubo con 2ug de rif más que el tubo anterior, hasta llegar a una concentración de 20 ug, que representan 200 ppm en el medio, al finalizar este proceso se sembró 0.1ml en un plato petri TSA + rif (100 ppm), a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 hrs, luego se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Almacenamiento congelado de bacterias:

3.2.2.1 Preparación de vial. Se lavó en agua desionizada, se dejó secar por 24 hrs en una cámara de flujo laminar, se colocó 20-30 bolitas en cada vial criogénico, se esterilizaron en la autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min.

3.2.2.2 Preparación del caldo para congelación. El cultivo se congeló en un caldo conteniendo 15% (vol. /vol.) de glicerol. Se elaboró el caldo TBS y se agregó el glicerol hasta la concentración final de 15% (85ml de caldo + 15ml de glicerol). Se esterilizaron los viales en la autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min. Cada cepa se colocó en 200ul de la solución, luego se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se requirieron.

3.2.2.3 Preparación de la cepa. Medio sólido: se pipeteó 1ml de mezcla glicerol y caldo en el plato petri, usando un distribuidor "L" de células, se suspendieron las células en el caldo. Se agregó 200ul de las células en suspensión en los viales pre etiquetados conteniendo las bolas, se agitó las bolas con la punta de la pipeta para asegurar una distribución uniforme de la cepa. Los tubos luego se colocaron en una caja de almacenamiento apropiado y se transfirieron al congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.4 Al momento de usar las cepas. Se dejaron descongelar los viales a temperatura ambiente ($23 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 5 min. Se colocó una bola en un plato petri con medio, usando una aza para colonias aisladas. Se incubó a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 hrs. Devolver el vial al congelador $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Preparación de Inoculo:

Las cepas usadas se obtuvieron del banco de microorganismo en el Centro de investigación y Educación de los Cítricos, del Instituto de Agricultura y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Florida, en Lake Alfred, Florida, Estados Unidos de América.

Las 5 cepas de *Salmonella* fueron: 1) *Salmonella* Saint Paul, número de cultivo: MDD 295, fuente: Jugo de naranja. 2) *Salmonella* Montevideo, número de cultivo: MDD 236, fuente: Tomate. 3) *Salmonella* New Port, número de cultivo: MDD 316, fuente: Tomate. 4) *Salmonella* Michigan, número de cultivo: MDD 251, fuente: Melón. 5) *Salmonella* Poona, número de cultivo: MDD 237, fuente: Tomate.

El ciclo de purificación de la cepa de *Salmonella* consistió en sembrar en TSA + rif, luego incubarlo a 37 ± 2 °C por 24 ± 2 hrs. Una colonia aislada fue transferida a TSB + rif (10ml tubos falcon), se incubo a 37 ± 2 °C por 24 ± 2 hrs. Se centrifugó cada tubo para precipitar las células a 3000 RPM durante 10 min, se procedió a desechar el sobrenadante de cada tubo Falcon en una bolsa. Se realizó el primer lavado, agregando 10ml Butterfield's phosphate buffer a cada tubo Falcon, cada tubo con buffer y el precipitado de células se agitó en un vortex para resuspenderlas y redistribuirlas.

El ciclo de centrifugación y lavado se realizo 3 veces, luego se realizo una mezcla de las 5 cepas, el cual se uso para inocular los tomates.

3.2.4 Determinación de población inicial de cada cepa:

Se tomó un tubo Falcon (de igual manera con los 4 restantes más la mezcla).

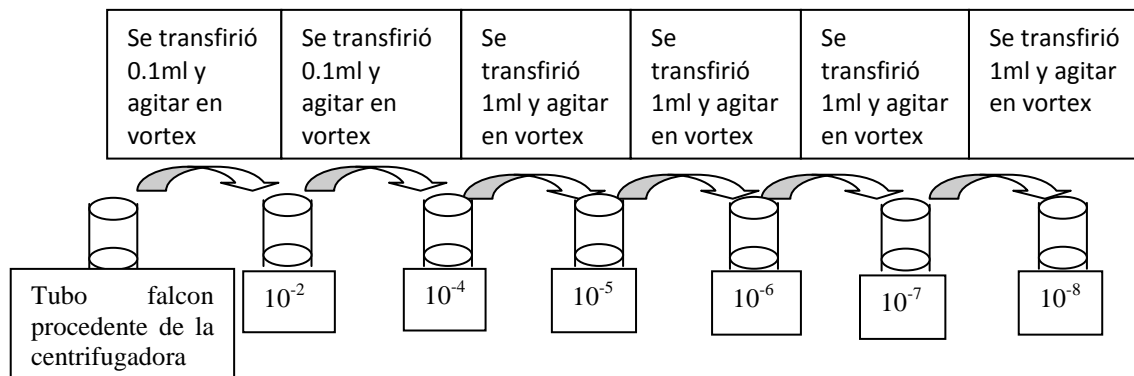


Figura 1. Diluciones seriadas.
Fuente: Strawn (2009).

Se sembraron las diluciones 5, 6, 7, 8; 0.1 ml fueron transferidos a platos con TSA + rif, incubado a 37 ± 2 °C por 24 ± 2 hrs. Por duplicado. La ecuación utilizada para determinar la concentración de *Salmonella*, fue la siguiente:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{No. Colonias * Factor de Dilución * ml}{ml}$$

3.2.5 Preparación de Tomates:

Los tomates fueron obtenidos un día antes de la inoculación y almacenados en su empaque a 4 °C. Todos los tomates fueron etiquetado el mismo día de inoculación, con la siguiente etiqueta “Tomatoes 35us USA” con una intensidad de exposición al láser de 35 microsegundos. Posteriormente se rotularon por tratamientos, se almacenaron individualmente en una bolsa plástica (para evitar transferencia) y en una caja, luego se transportaron a los ambientes de almacenamiento destinados.

3.2.6 Inoculación:

Se distribuyeron 10 gotas con un volumen total de 20ul del inóculo por tomate, sobre la etiqueta, después de inoculados se mantuvieron 1 hr a 23 ± 2 °C para permitir el secado del inóculo en la superficie.

3.2.7 Recuperado de *Salmonella* spp:

Se colocó 100ml de agua peptonada al 0.1% en las bolsas plástica en las que se encontraban los tomates. La bolsa fue sacudida por 30 seg, luego restregada por 1 min, diluciones seriadas uno en 10 fueron hechas en tubos de ensayo con agua peptonada al 0.1%. Las muestras fueron sembradas en platos con medio selectivo (TSA + rif), fueron incubados a 37 ± 2 °C por 24 ± 2 hrs.

UFC /ml fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{No. Colonias * Factor de Dilución * ml}{ml}$$

3.2.6 Análisis Estadístico:

Todas las muestras fueron realizadas en duplicado, con tres repeticiones. Las colonias contabilizadas por plato fueron transformadas a Log UFC/tomate, (Unidad Formadora de colonia, UFC), el diseño experimental usado fue Diseño Completamente al azar con Arreglo factorial. Se analizaron estadísticamente con medidas repetidas en el tiempo, con el programa “Statistical Analysis System” (SAS®). Con una probabilidad de 0.05.

3.2.7 Descripción de tratamientos:

Tratamiento 1: Inoculación de *Salmonella* y luego etiquetado láser (SE).

Tratamiento 2: Etiquetado láser posteriormente inoculación con *Salmonella* (ES).

Tratamiento 3: Etiquetado láser después inoculación con *Salmonella* luego recubierto con aceite (ESA).

Tratamiento 4: Etiquetado láser en seguida recubierto con aceite después inoculación con *Salmonella* (EAS).

Tratamiento 5: Control. Sin etiquetado láser y sólo inoculado con *Salmonella* (C).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES.

Se realizó un estudio de vida útil de la etiqueta a 4 y 25 °C, realizando inspecciones visuales cada día. Se evaluó legibilidad y deshidratación de la etiqueta, se mantuvo registro fotográfico en los primeros 5 días. Se determinó que la etiqueta en tomates almacenados a 4 y 25 °C es legible durante 28 y 14 días de almacenamiento respectivamente. El experimento se realizó con 3 secuencias de etiquetado: 1) Control, sin etiquetado, 2) Etiquetado sin aceite y 3) Etiquetado con aceite (Ver anexo).

4.2 SUPERVIVENCIA DE *SALMONELLA*:

Siguiendo el modelo propuesto, se realizó una prueba de esfericidad de los datos para escoger la metodología de análisis de los datos. Los resultados del test de esfericidad (P 0.0013) establecieron que los datos violan la hipótesis de esfericidad, por lo tanto se debe usar un análisis Multivariado para determinar el efecto de los factores.

Cuadro 1. Análisis de varianza medidas repetidas para el Entre factor.

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Temp	1	6.26	6.26	4.38	0.0507
Etiquetado	4	14.26	3.56	2.5	0.0792
Temp*Etiquetado	4	0.37	0.09	0.06	0.9918
Error	18	25.69	1.43		

El efecto neto de la temperatura de almacenamiento no fue determinante en las variaciones de las poblaciones de *Salmonella* en la superficie de los tomates (Pr= 0.0507). Las secuencias de etiquetado por sí solas tampoco afectaron a las poblaciones de *Salmonella* (Pr= 0.0792), (cuadro 1), la interacción entre la temperatura de almacenamiento y las secuencias de etiquetado no actuaron significativamente sobre las poblaciones de *Salmonella* en la etiqueta láser en los tomates.

Cuadro 2. Matriz Suma de Cuadrados y producto Cruzado para el Estadístico Wilks' Lambda para el Co factor.

Variabes	Valor	F-Valor	Pr > F
Tiempo	0.18	12.4	<.0001
Tiempo*Temp	0.45	3.49	0.0295
Tiempo*Etiqueta	0.32	0.96	0.5219
Tiempo*Temp*Etiqueta	0.2	1.45	0.1448

En el Análisis Multivariado de Varianza (MANOVA), usando los valores F de Wilks' Lambda (Df 5, Den DF14, Pr <.0001) demostró que las poblaciones de *Salmonella* en los tomates fueron distintas durante los 14 días de muestreo. Asimismo, se encontró un efecto significativo en la interacción tiempo-temperatura (F de Wilks' Lambda Df 5, Den DF14, Pr= 0.0295) (cuadro 2). Las interacciones tiempo-etiquetado y tiempo-temperatura-etiquetado no fueron significativas en el estudio (F de Wilks' Lambda Df 5, Den DF14, Pr= 0.5219 y Df 5, Den DF 14, Pr= 0.1448 respectivamente).

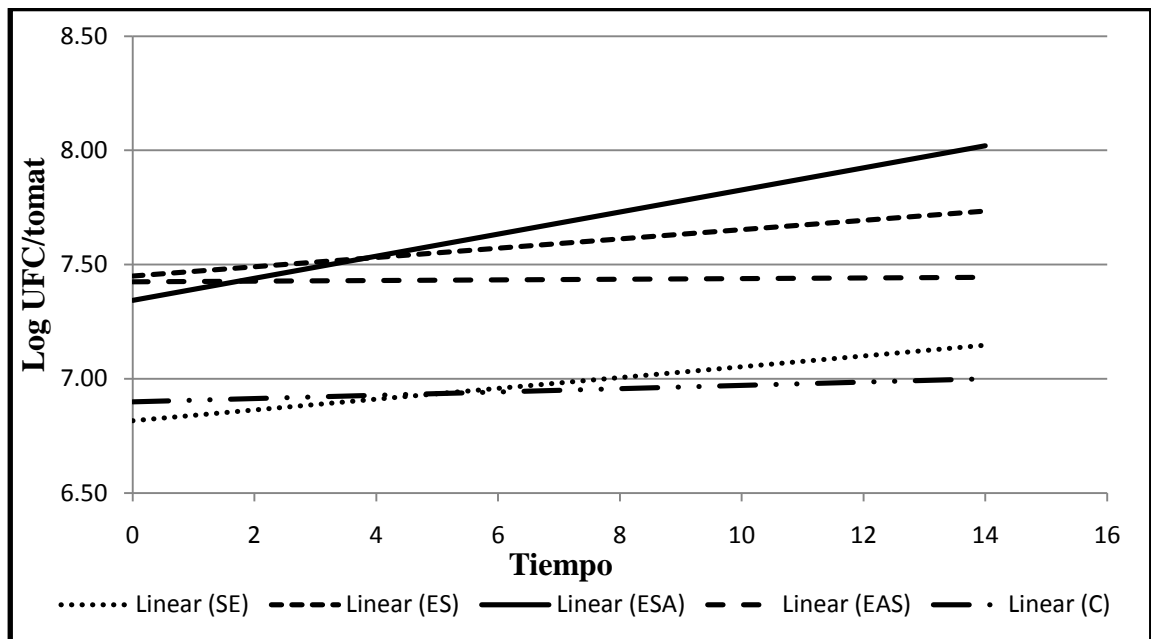


Figura 2. Comportamiento de poblaciones de *Salmonella* a 4 °C.

Se muestra (figura 2) la tendencia creciente de las poblaciones de *Salmonella* recuperada de la etiqueta láser en la superficie de los tomates de las 5 secuencias de etiquetado durante los 14 días, de muestreo. El crecimiento proviene de la naturaleza del organismo.

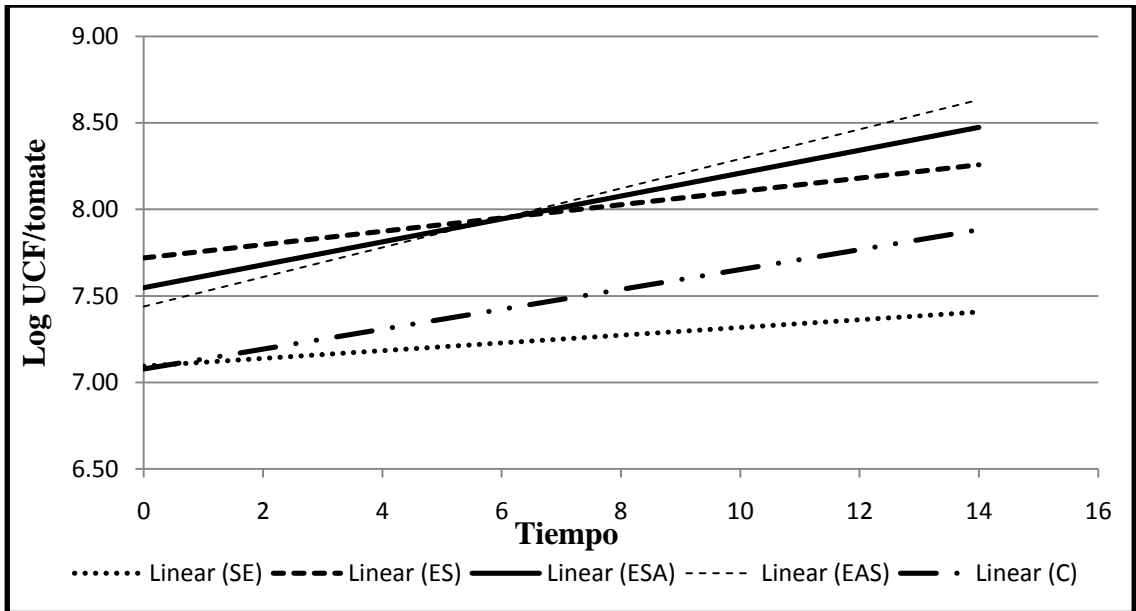


Figura 3. Comportamiento de poblaciones de *Salmonella* a 25 °C.

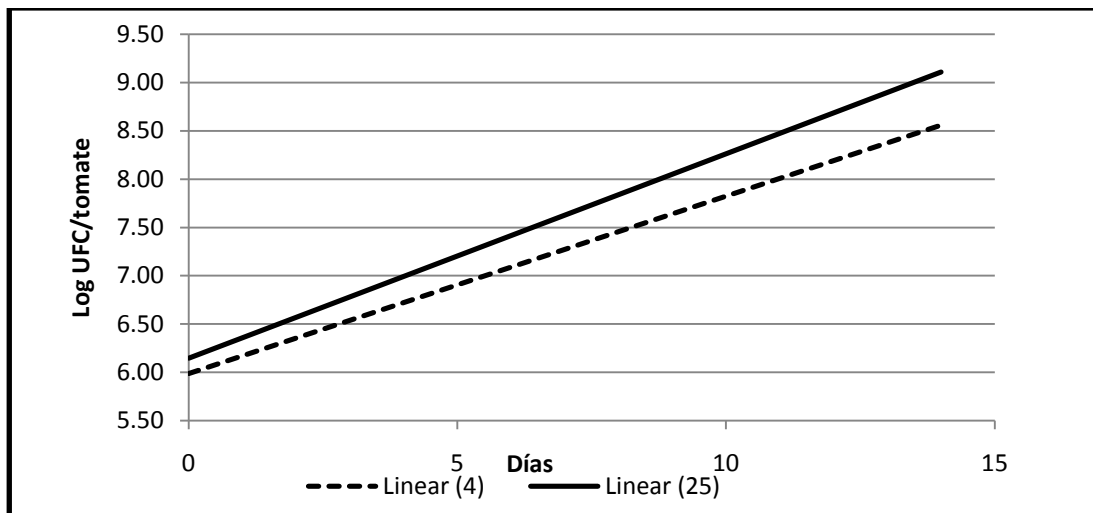


Figura 4. Efecto de la interacción Tiempo-Temperatura.

Se muestra (figura 3) la tendencia creciente de las poblaciones de *Salmonella* recuperada de la etiqueta láser en la superficie de los tomates, en las 5 secuencias de etiquetado durante los 14 días de muestreo. El crecimiento proviene de la naturaleza del organismo. Se ve una diferencia en las poblaciones de los tomates sometidos a 25 °C, comparado con los almacenados a 4 °C, aunque estadísticamente son iguales.

Los datos aquí obtenidos son comparables a los obtenidos por Beuchat (2004), trabajo en tomates y concluyo que independientemente del punto de inoculación en el melón, que se almacena a 4 °C, las poblaciones de *Salmonella* se mantuvieron constante entre 2 y 24 hrs

después de la inoculación, pero creció después de 24 hrs en melones almacenados a 21 y 37 °C.

Se puede observar (figura4) claramente el efecto de la interacción tiempo-temperatura, pues al día cero, hay una pequeña diferencia, y al final, en día 14 la diferencia se incrementa.

5. CONCLUSIONES

- El etiquetado láser no interfiere en el comportamiento de la micro flora presente en la superficie del tomate.
- Las diferencias en las poblaciones de *Salmonella* a lo largo de los 14 días, se debieron a la naturaleza misma del microorganismo.
- Los factores analizados, temperatura de almacenamiento, secuencia de etiquetado y la interacción entre ambas no tienen un efecto significativo en las poblaciones de *Salmonella* en la etiqueta láser.

6. RECOMENDACIONES

- Repetir el estudio para asegurar el efecto nulo de la temperatura de almacenamiento, dado que en este estudio estuvo cerca de la significancia.
- Muchas veces un brote de enfermedad transmitida por alimentos no es causada por un solo microorganismo, se recomienda la interacción de *Salmonella* con otras bacterias, aunque no sean patogénicas.
- Se recomienda evaluar la etiqueta láser en otros frutos frescos de turgencia distinta a la del tomate.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Asplund, K.; Nurmi, E. (1991). The growth of *Salmonellae* in tomatoes. *International Journal of Food Microbiology* 13, 177–182 p.
- Baker, R.; Qureshi, R.; Hotchkiss, J. (1986). Effect of elevated level of carbon dioxide on the growth of spoilage and pathogenic bacteria. *Poultry Science* 65, 729–737 p.
- Bartz, J.; Eayre, C.; Mahovic, M.; Concelmom D.; Brecht, J.; Sargent, S. 2001. Chlorine concentration and the inoculation of tomato fruit in packinghouse dump tanks. *Plant Dis* 85:885–9 p.
- Beuchat, L. 1992. Surface disinfection of raw produce. *Dairy Food Environ Sanit* 12:6–9 p.
- Beuchat, L. 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* 62:845-9 p.
- Beuchat, L. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J Food Prot* 59:204–16.
- Beuchat, L.; Scouten, A. (2004). Factors affecting survival, growth, and retrieval of *Salmonella* Poona on intact and wounded cantaloupe rind and in stem scar tissue, *Food Microbiology*. 683-694 p.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition-U.S. Food and Drug Administration [CFSAN-FDA]. 30 de Septiembre, 2001. Analysis and evaluation of preventative control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. Consultado, 8 de mayo 2009. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~com>.
- Cherry, J. 1999. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *Food Technol* 53:54–9 p.
- Droffner, M.; Yamamoto, N. 1992. Procedure for isolation of *Escherichia*, *Salmonella*, and *Pseudomonas* mutants capable of growth at refractory temperature of 54°C. *Journal of Microbiological Methods* 14, 201–206 p.
- Drouillard, G.; Rowland, R. 1997. Method of laser marking produce. Patent no. 5660747. U. S. Department of Commerce, Patent and Trademark Office Washington, D. C.
- Durand-Wayland. 2005. Etched fruit to be featured on "Today Show". Consultado: 15 de junio 2009. Disponible en: <http://durand-wayland.com/label/docs/DWTodayShowRelease.pdf>.
- Holley, R.; Proulx, M. 1986. Use of egg wash pH to prevent survival of *Salmonella* at moderate temperatures. *Poultry Science* 65, 922–928 p.
- Juven, B.; Cox, N.; Bailey, J.; Thomson, J.; Charles, O.; Shutze, JV. 1984. Survival of *Salmonella* in dry food and feed. *J Food Prot* 47:445–8 p.
- Mead, P.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L.; Bresee, J.; Shapiro, C.; Griffin, P.; Tauxe, R. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–25 p.

- PEIB. 1995. Guide to coding fresh produce. Produce Electronic Identification Board. Newark, Del.
- Richardson, S.; Thruston, A.; Caughran, T.; Collette, T.; Patterson, K.; Lykins, B. 1998. Chemical by-products of chlorine and alternative disinfectants. *Food Technol* 52:58–61 p.
- Rodgers, S.; Cash, J.; Siddiq, M.; Ryser, E. 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* 67:721–31 p.
- Roebuck, K. 2004. Cause of salmonellosis outbreak still unknown. Pittsburgh, Pennsylvania. Consultado: 10 mayo 2009. Disponible en: http://pittsburghlive.com/x/search/s_248903.html.
- Strawn, L. 2009. Cuaderno de laboratorio.
- Taormina, P.; Beuchat, L. 1999. Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J Food Prot* 62:318–24 p.
- Tauxe, R.; Kruse, H.; Hedburg, C.; Potter, M.; Madden, J.; Wachsmuth, K. 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce, a preliminary report to the National Advisory Committee on microbiologic criteria for foods. *J. Food Prot.* 60(11):1400-1408 p.
- Thunberg, R.; Tran, T.; Bennett, R.; Matthews, R.; Belay, N. 2002. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. *J Food Prot* 65:677–82.
- Toth, B.; Bodager, D.; Hammond, R.; Stenzel, S.; Adams, J.; Kass-Hout, T.; Hoekstra, R.; Mead, P.; Srikantiah, P. 2002. Outbreak of *Salmonella* serotype Javiana infections - Orlando, FL, Junio 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 15:683-684. Consultado 10 de mayo 2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5131a2.htm>.
- U.S. FDA. 2005. California Specialty Produce, Inc. recalls product because of possible health risk. Consultado: 11 de mayo 2009. Disponible en: http://www.fda.gov/oc/po/firmrecalls/caspecialty05_05.html.
- Wei, C.; Huang, T.; Kim, J.; Lin, W.; Tamplin, M.; Bartz, J. 1995. Growth and survival of *Salmonella Montevideo* on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *J Food Prot* 58:829–36.
- Wells, J.; Butterfield, J. 1997. *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh Fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Disease.* 81:8: 867-872.
- Wood, R.; Hedberg, C.; White, K.; MacDonald, K.; Osterholm, M. 1991. A multi-state outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes [Abstract]. *Proceeding of the 40th Annual Conf. of the Epidemic Intelligence Service.* Washington, D.C.; April 8-21, 1991. Centers for Disease Control and Prevention; Atlanta, Ga. 69 p.
- Zhuang, R.; Beuchat, L.; Angulo, F. 1995. Fate of *Salmonella* Montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl Environ Microbiol* 61:2127–31.

8. ANEXOS

Anexo 1. Calidad de etiqueta a 4°C, Control, sin etiqueta.



Figura 4. Tomate sin etiqueta, día 1.



Figura 5. Tomate sin etiqueta, día 2.



Figura 6. Tomate sin etiqueta, día 3.



Figura 7. Tomate sin etiqueta, día 4.



Figura 8. Tomate sin etiqueta, día 5.

Anexo 2. Calidad de etiqueta a 4°C, etiqueta.



Figura 9. Tomate con etiqueta, día 1.



Figura 10. Tomate con etiqueta, día 2.



Figura 11. Tomate con etiqueta, día 3.



Figura 12. Tomate con etiqueta, día 4.



Figura 13. Tomate con etiqueta, día 5.

Anexo 3. Calidad de etiqueta a 4°C, etiqueta con aceite.



Figura 14. Etiqueta y aceite, día 1.



Figura 15. Etiqueta y aceite, día 2.



Figura 16. Etiqueta y aceite, día 3.



Figura 17. Etiqueta y aceite, día 4.



Figura 18. Etiqueta y aceite, día 5.

Anexo 4. Calidad de etiqueta a 25°C, Control, sin etiqueta.



Figura 18. Tomate sin etiqueta, día 1.



Figura 19. Tomate sin etiqueta, día 2.



Figura 20. Tomate sin etiqueta, día 3.



Figura 21. Tomate sin etiqueta, día 4.

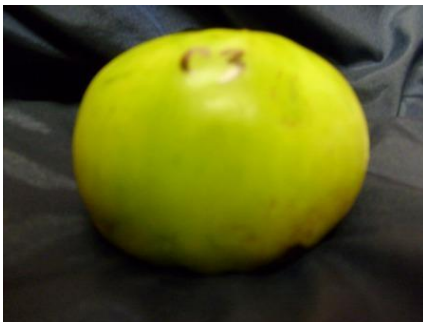


Figura 22. Tomate sin etiqueta, día 5.

Anexo 5. Calidad de etiqueta a 25°C, etiqueta.



Figura 23. Tomate con etiqueta, día 1.



Figura 24. Tomate con etiqueta, día 2.



Figura 25. Tomate con etiqueta, día 3.



Figura 26. Tomate con etiqueta, día 4.



Figura 27. Tomate con etiqueta, día 5.

Anexo 6. Calidad de etiqueta y aceite a 25°C, etiqueta.



Figura 28. Etiqueta con aceite, día 1.



Figura 29. Etiqueta con aceite, día 2.



Figura 30. Etiqueta con aceite, día 3.



Figura 31. Etiqueta con aceite, día 4.

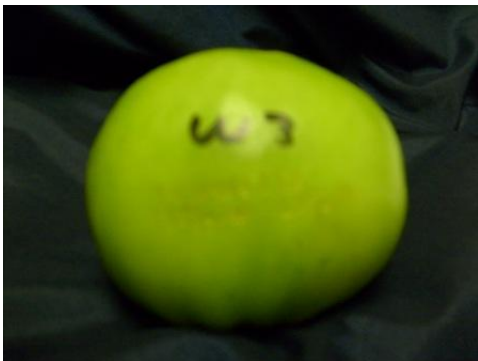


Figura 32. Etiqueta con aceite, día 5.