

**Evaluación de la transferencia de *Salmonella*
enterica en cajas de madera y plástico
utilizadas en tomate
(*Solanum lycopersicum* L.)**

Marco Antonio Pérez Romero

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación de la transferencia de *Salmonella*
enterica en cajas de madera y plástico
utilizadas en tomate
(*Solanum lycopersicum* L.)**

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

Presentado por

Marco Antonio Pérez Romero

Zamorano, Honduras

Octubre, 2014

Evaluación de la transferencia de *Salmonella enterica* en cajas de madera y plástico utilizadas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Presentado por:

Marco Antonio Pérez Romero

Aprobado:

Mayra Márquez González, Ph.D.
Asesora Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Jorge Alfredo Cardona, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Evaluación de la transferencia de *Salmonella enterica* en cajas de madera y plástico utilizadas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Marco Antonio Pérez Romero

Resumen: Los contenedores utilizados durante el transporte de frutas y verduras juegan un papel importante en la contaminación del producto. Los objetivos fueron (i) evaluar la transferencia y contaminación cruzada de *Salmonella*, (ii) evaluar procedimientos de limpieza, y (iii) determinar las características físicas y microbiológicas del tomate transportado y almacenado en cajas de madera y plástico. Para la transferencia, tomates inoculados pasaron primero por cajas limpias, seguido de contaminación del tomate a la caja y viceversa. Para la higienización se aplicaron dos tratamientos de limpieza en cajas inoculadas: lavado con agua y lavado con solución clorada (200 ppm) más detergente. Se determinó el porcentaje de daño, pérdida de peso y la calidad microbiológica del producto al recibir los tomates y 15 días después de almacenamiento. En ambas cajas hay una contaminación por parte del tomate de 1.5 log₁₀UFC/superficie. La higienización con solución clorada presentó reducciones de 99.999% en cajas plásticas y 98.378% en cajas de madera. Durante el almacenamiento se observó 13% de tomate dañado/caja, teniendo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en pérdida de peso. Se recomienda hacer el cambio de cajas de madera por las plásticas, evaluando otro diseño en cajas plásticas, ya que el daño del tomate fue igual en ambas cajas. Sin importar el material de las cajas, el coeficiente de transferencia demostró que ambas cajas sufren contaminación cruzada, la cual no depende solo del material sino de la aplicación de correctos procedimientos de lavado y desinfección así como de las buenas prácticas de higiene.

Palabras clave: Desinfección, *E. coli* K12, pérdida de agua, porcentaje de daño, *S. Poona*, *S. Typhimurium*.

Abstract: The use of container in the transport of fruits and vegetables play an important roll in the contamination of fresh products. The mean objectives were (i) evaluate the transfer and cross contamination of *Salmonella*, (ii) evaluate the process of cleaning and (iii) determine the physical and microbiological characteristics of tomato transported and stored in wood and plastic boxes. For the transference, inoculated tomatoes first were passed on clean boxes, followed by passing uninoculated tomatoes on the contaminated surfaces. For the sanitation, two treatments of cleaning were applied on inoculated boxes: washing with water and washing with chlorine solution (200 ppm) and detergent. The percentage of damage, weight loss, and microbiological quality of product upon receiving and after 15 days of storage of the product were determined. Cross contamination of tomato at levels of $1.5 \log_{10}$ CFU/surface occurred on both type of boxes. The sanitation with chlorine solution presented reduction of 99.999% in plastic boxes and 98.378% in wood boxes. During the storage was observed 13% of tomato damage/box, taking difference ($P \leq 0.05$) in weight loss. The recommendation is changing the wood boxes for the plastics, evaluating other design in plastic boxes, because the percentage of damage is the same in both boxes. Regardless the material of boxes, the coefficient of transfer showed that both boxes suffer cross contamination, which did not depend of material but the application of correct procedures of washing and disinfection as of good hygiene practices.

Keywords: Disinfection, *E. coli* K12, percentage of damage, S. Poona, S. Typhimurium, weight loss.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	v
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4 CONCLUSIONES.....	27
5 RECOMENDACIONES.....	28
6 LITERATURA CITADA.....	29
7 ANEXOS.....	34

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Tabla de reducción de <i>Escherichia coli</i> K12.....	9
2. Recuento de <i>Salmonella enterica</i> en tomate inoculado antes y después.....	14
3. Recuento de <i>Salmonella enterica</i> en tomate no inoculado.....	15
4. Resultados de reducción logarítmica (\log_{10} UFC/superficie).....	16
5. Resultados de pérdida de peso y porcentaje de daño del tomate.....	19
6. Resultados de color del tomate en L a b, durante 15 días.....	21
7. Resultados de color del tomate a^*/b^* , h y croma durante 15 días.....	22
8. Resultados Microbiológicos para superficies y tomates de Guatemala.....	26

Anexos	Página
1. Condiciones poco insalubres de almacenamiento de las cajas de madera.....	34
2. Condiciones de cosecha de tomate, exponiendo cajas al suelo directamente.....	35
3. Tomate con presencia de arrugamiento en la epidermis por pérdida de agua.....	36
4. Tomates con crecimiento de hongos ubicados en cajas de madera.....	36
5. Superficies con crecimiento de hongos ubicados en cajas de madera.....	37

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo, las frutas y verduras son un componente importante en la dieta del ser humano, el consumo de éstas ayuda al organismo disminuyendo el riesgo de sufrir ataques al corazón, padecer obesidad, diabetes y cáncer, atribuyendo a los antioxidantes presentes en los frutos (Ames 1983) y la buena fuente de vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos (Giovanelli *et al.* 1999). De acuerdo con el reporte de la Salud Mundial se recomienda un consumo mínimo de 400 g de fruta y vegetales al día para prevenir estas enfermedades (WHO 2003). Actualmente brotes provocados por el consumo de alimentos causan un estimado de 48 millones de casos cada año en Estados Unidos de América (EUA), de los cuales 9.4 millones son causados por patógenos (Gould *et al.* 2013).

La Salmonelosis es una enfermedad causada por *Salmonella spp.* transmitida por alimentos provocando diarrea, fiebre y dolores abdominales, 12 a 72 horas después de la infección (CDC 2014), principalmente por *Salmonella* serotipo Enteritidis (Mendoza *et al.* 2012). Teniendo anualmente en EUA 1 millón de casos, con 19,000 hospitalizaciones y 380 muertes. *Salmonella* serotipo Typhimurium es responsable de la fiebre tifoidea, ésta únicamente se desarrolla en humanos teniendo un estimado anualmente de 1,821 casos con fiebre tifoidea en EUA (FDA 2013a). En este mismo país se estiman cerca de 5,700 casos anualmente (CDC 2013). Con un estimado de 1.2 millones de casos en EUA con 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes provocadas por este patógeno (CDC 2014).

El tomate, presenta una vulnerabilidad a ser contaminado con *Salmonella*, de 1973 a 2010 ha presentado alrededor de 15 brotes multietatales en EUA, teniendo un aumento de casos en las últimas dos décadas. Ejemplo de esto en el verano del 2004 en el estado de Florida, EUA, una empacadora de tomates presentó tres brotes de salmonelosis con 561 casos reportados por enfermedad. La Salmonelosis presenta un costo anual en EUA de \$ 365 millones USD en costos médicos indirectos por año (CDC 2005; CDC 2011; FDA 2013b).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos de corta longitud, no esporulados, Gram-negativa y móviles, a excepción de *Salmonella Gallinarium* y *S. Pullorum*. Presentan respiración anaerobia facultativa y son oxidasa negativa. El género *Salmonella* se divide en dos especies *S. enterica* y *S. bongori*. Las cepas se pueden desarrollar en un rango de temperaturas entre 7 – 48 °C donde la temperatura óptima es de 37 °C, pH entre 4 donde el óptimo es 7 y Aw de 0.93 (FDA 2013b; Jay *et al.* 2005; Adelantado *et al.* s.f.).

El principal hábitat es el tracto intestinal de animales domésticos o salvajes como aves, reptiles y ocasionalmente insectos (FDA 2013a; Jay *et al.* 2005). La contaminación se da

por las excretas de estos, al momento de ser depositados, contaminan el suelo y fuentes de agua. La irrigación de agua, fungicidas e insecticidas reconstituidos, compost mal tratado y trabajadores al manipular alimentos pueden contribuir a la contaminación pre y poscosecha de productos frescos, provocando una contaminación cruzada. Durante la cosecha se pueden contaminar también con equipos, contenedores, agua para enjuagar el producto o vehículos de transporte (Olaimat y Holley 2012). En especial un producto tan sensible, como lo es el tomate, debido a su delgada capa de piel denominada epidermis, llegan a sufrir daños en la superficie y el exudado de nutrientes es aprovechado por bacterias, hongos o patógenos.

Algunos microorganismos tienen la capacidad de internalizarse en el producto, protegiéndose de agentes químicos sanitizantes (hipoclorito de sodio y ácido peracético) (Heaton y Jones 2008). *Salmonella spp.* también ha presentado brotes asociados con diferentes productos como: lechuga, coliflor, espinaca, melón y champiñones. En tomates durante su almacenamiento y distribución por lo general se utilizan cajas de madera o plástico para su transporte, provocando que producto contaminado con microorganismos patógenos se adhieran a la superficie de estos propiciando una contaminación cruzada una vez que el patógeno se ha establecido y tiene las condiciones favorables, se multiplican desarrollando biofilms (exopolisacáridos hidratados), por lo general son considerados infecciosos una vez que son ingeridos (Abrishami *et al.* 1994).

En el caso especial de la madera, ésta presenta gran porosidad y adherencia dificultando la limpieza (Abrishami *et al.* 1994). La madera tiende a absorber una mayor carga microbiana comparándola con una superficie plástica, la cual es más fácil de limpiar y desinfectar. Otros tipos de superficies como acero inoxidable permiten tener mayor cantidad de microorganismos pero su remoción es mayor debido a la naturaleza de su superficie, la cual permite una mejor remoción al momento de la limpieza y desinfección. De la misma forma esta presencia de antibacteriales, caso de esto es la madera de pino la cual posee propiedades antibacteriales jugando un papel importante en la reducción de células viables de patógenos (Moore *et al.* 2007).

En la actualidad se han realizado estudios sobre la transferencia de microorganismos patógenos a alimentos crudos, ya sea por contaminación cruzada, de algunas superficies inertes (madera, plástico, acero inoxidable y formica). Estos han demostrado una gran contaminación de células vegetativas, las cuales contaminan carnes, frutas y verduras que han llegado a presentar contacto directo con la superficie o con alguna herramienta que presento previo contacto con algún patógeno (Wang y Ryser 2014).

A partir de un estudio, donde, se evaluó la contaminación cruzada de *Salmonella enterica* proveniente de pollo a lechuga, mediante tres escenarios de manipulación de estos alimentos. En el primer escenario se cortó pollo ($10^6 \log_{10}$ UFC/g) y se volvió a cortar lechuga sin lavar la tabla y el cuchillo. En el segundo escenario tabla y cuchillo fueron lavados con agua por separado después de cortar el pollo para cortar la lechuga y en el tercer escenario tabla y cuchillo fueron lavados con agua caliente y jabón después de cortar el pollo y antes de cortar la lechuga. Teniendo como resultados para el primer escenario $2 \log_{10}$ UFC/cm² en cuchillo y tabla, la lechuga presentó $3 \log_{10}$ UFC/g, en el segundo escenario presentó 0.5 - $2.4 \log_{10}$ UFC/cm² en tabla y cuchillo y en el tercer

escenario presentó $\leq 1 \log_{10}$ UFC/g o cm^2 en lechuga y utensilios (Ravishankar *et al.* 2012). En otro estudio en tomates se evaluó la transferencia de *Salmonella* Enteritidis de cuatro superficies (madera, vidrio, acero inoxidable y plástico tratado con triclosán) donde se determinó que la madera es la más fácil de limpiar (Mendoza *et al.* 2012). Lo anterior debido a que la madera presenta mayor capilaridad que otros materiales, permitiendo la penetración de las bacterias y complicando la extracción de estas (Abrishami *et al.* 1994).

Se han evaluado diferentes materiales (acero inoxidable, formica, polipropileno y madera) en un área de 25 cm^2 (5% suero de caballo con caldo de soya tripticasa), evaluando la recuperación y transferencia de *Salmonella* Typhimurium, muestreando cada hora por un lapso de 6 h (Moore *et al.* 2007). Cada superficie fue limpiada con agua caliente y detergente previa a la inoculación. Según los autores se presentó mayor contaminación cruzada en pepinos al ser expuesto a superficies de formica y el acero, comparando la madera y el plástico de polipropileno que presentaron menor contaminación cruzada en los pepinos. De la misma forma, se han evaluado el lavado poscosecha del tomate con tres diferentes rodillos (plástico, cepillos y esponja) donde, en la maquina pasaron 25 tomates inoculados con $4 \log_{10}$ UFC/g. Para probar si existía alguna contaminación cruzada se volvieron a pasar 25 tomates no inoculados evaluando la transferencia de las superficies (rodillos) a los tomates no inoculados (Wang y Ryser 2014).

Al determinar la transferencia de *Salmonella enterica* en dos diferentes contenedores de transporte (cajas de madera vs cajas plásticas), se pretende hacer conciencia sobre el productor de Guatemala al mirar los beneficios de las cajas plásticas y las consecuencias de seguir utilizando las cajas de madera. De acuerdo a un estudio realizado con *E. coli* O157:H7 se presentó mayor adherencia de estos microorganismos en las superficies de madera por su naturaleza (Abrishami *et al.* 1994), siendo un vector de contaminación cruzada por parte de los productores que utilizan estas cajas para el transporte del tomate durante la cosecha hasta la comercialización. Si a esto se le asume que el tomate no recibe ningún tratamiento poscosecha después de la cosecha, el riesgo de sufrir una contaminación cruzada por patógenos es elevado.

Cabe mencionar que la importancia de tener programas de limpieza para prevenir este tipo de contaminaciones es necesaria para asegurar la inocuidad de los productos frescos, elevando la calidad microbiológica de estos tomates, reduciendo costos de salud pública. De acuerdo a la problemática se han determinado los siguientes objetivos:

- Evaluar la transferencia de *Salmonella enterica* en dos diferentes cajas (madera vs plástico) utilizados para la cosecha y transporte de tomate.
- Evaluar la contaminación cruzada provocada por las cajas contaminadas con *Salmonella enterica*.
- Evaluar la reducción de *Escherichia coli* K12 en las cajas (madera vs plástico) después de un tratamiento de desinfección.
- Evaluar las características físicas y microbiológicas de los tomates cosechados y empacados en Guatemala, transportados y almacenados en Honduras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio. El estudio se desarrolló en dos áreas de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Localizada en el km 30 carretera hacia Danlí, en el departamento de Francisco Morazán, al este de Tegucigalpa, Honduras. En el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LMAZ) y en la Planta de Poscosecha (PP), ambos pertenecientes al Departamento de Agroindustria Alimentaria.

Microorganismos:

Cepa de *Salmonella* serotipo Typhimurium ATCC¹ 14028

Cepa de *Salmonella* serotipo Poona NCTC² 4840

Cepa de *Escherichia coli* K12 ATCC 25922

Cajas:

Cajas de madera (35.96 cm ancho × 58.51 cm largo × 18.83 cm alto)

Cajas de plástico (29.00 cm ancho × 38.67 cm largo × 21.20 cm alto). Cesta One Way Industrial, de Megaplast®.

Evaluación de la transferencia y contaminación cruzada de *Salmonella enterica* en dos diferentes contenedores utilizados para la cosecha y transporte de tomate.

Preparación del inóculo. Se resucitó la cepa de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y Poona en 50 mL de Caldo de Soya Triptica (TSB, Acumedia, Neogen Corp.) realizando un cóctel de *Salmonella*, 25 mL respectivamente, incubadas a 35 °C/18-24 h (Thermo Scientific, 6856). Se lavó con 50 mL de Buffer de fosfatos (PBS) tres veces en la centrifuga 15 min a 5000 RPM (Thermo Scientific, 75004381). Se ajustó el inóculo a una concentración final de 8 log₁₀ UFC/mL con 450 mL de Diluyente de Peptona al 0.1% (DP, Difco, BD), con la finalidad de tener el inóculo utilizado durante la inmersión de los tomates.

La concentración del inóculo se verificó mediante una serie de diluciones decimales con DP y siembras por superficie, en placas con Agar Sulfito de Bismuto (ASB, Acumedia, Neogen Corp.), incubando a 42 °C/18-24 h (Thermo Scientific, 6856). Se reportaron las placas que se encontraron en un rango de 25 – 250 colonias en log₁₀ UFC/mL (Swanson *et al.* 2001).

¹ American Type Culture Collection

² National Collection of Type Cultures

Inoculación de los tomates. Se seleccionaron 25 tomates con un nivel de madurez (75% color: 25% verde) de acuerdo a estándares de madurez del tomate. Se verificó ausencia de *Salmonella spp.* en los tomates a utilizar como control negativo. Para ello se muestrearon 5 tomates no inoculados, sumergiendo 1 tomate en 100 mL de Agua peptonada Buferada (APB, Acumedia, Neogen Corp.) aplicando un ligero masaje al tomate dentro de la bolsa por un tiempo de 3 minutos. Incubando a 35 °C/24 h. Después del pre-enriquecimiento se realizó un enriquecimiento selectivo transfiriendo 1 mL y 0.1 mL a Caldo Tetrionato (CT, Acumedia, Corp) y Caldo Rapapport-Vassiliadis (CRV, Acumedia, Corp), respectivamente incubando a 35 °C/24 h. Posteriormente se sembraron alícuotas de los enriquecimientos selectivos en placas de Agar Sulfito de Bismuto (ASB, Acumedia, Neogen, Corp.), Agar Entérico Hektoen (AEH, Criterion, Corp) y Agar XLD (AXLD, Acumedia, Neogen, Corp) incubando a 42 °C/24 h. La confirmación de las colonias sospechosas a *Salmonella* se realizó mediante pruebas bioquímicas y aglutinación serológica con antisuero polivalente O (Difco) (Andrew *et al.* 2011).

Para inocular los tomates fueron sumergidos en 500 mL de inóculo ajustado a 7 log₁₀ UFC/mL, sumergiéndolo por un periodo de tiempo de 20 minutos en constante agitación. La carga microbiana en los tomates estimada fue de 5 log₁₀ UFC/tomate, éstos fueron puestos a secar durante un tiempo de 45 minutos, hasta completar un secado uniforme del inóculo.

Se verificó la concentración del inóculo en los tomates, al muestrear cinco frutos por separado, sumergiendo en 100 mL de DP y aplicando un ligero masaje por un tiempo de 3 minutos (Wang y Ryser 2014). Realizando diluciones decimales de cada enjuague de cada tomate para sembrar por superficie en placas de ASB, incubando a 42 °C/18-24 h (Thermo Scientific, 6856), contando colonias típicas de crecimiento de *Salmonella*, los datos fueron reportados en log₁₀UFC/tomate, para las placas que se encontraron en un rango de 25 – 250 colonias (Swanson *et al.* 2001).

Evaluación de la transferencia (Tomate – Caja). Se emplearon cajas de madera (35.96 ± 0.87 cm ancho × 58.51 ± 0.20 cm largo × 18.83 ± 0.87 cm alto) presentando una capacidad aproximada de 22.73 kg y cajas plásticas (29.00 ± 0.00 cm ancho × 38.67 ± 0.28 cm largo × 21.20 ± 0.00 cm alto) presentando una capacidad aproximada de 11.37 kg. Las cajas plásticas son más usadas por lo general ya que proporciona protección al fruto y disminuye pérdidas por manipulación y transporte vs la caja de madera (FAO 2006). Se verificó la ausencia de *Salmonella* en las cajas a utilizar, muestreando la superficie de tres cajas (madera o plástico), previamente al paso de los tomates inoculados. Se tomaron muestras con una gasa estéril, la cual fue humedecida con 10 mL de DP. Para el muestreo de la caja de madera se realizó en un área de 10 × 10 cm y para la caja plástica se realizó en toda la superficie de la base interior, debido a que presenta agujeros (cajas caladas). Posteriormente la gasa fue sumergida en 90 mL de Agua peptonada Buferada (APB, Acumedia, Neogen Corp.) y se introdujo al stomacher por 1 minuto a 200 RPM (IUL, Masticator). Se realizó el enriquecimiento selectivo, aislamiento y confirmación de *Salmonella* como se describió en la inoculación de los tomates.

Para evaluar la transferencia de *Salmonella* del tomate a la caja, se colocaron cinco tomates previamente inoculados en cada tipo de caja (madera o plástico), por un periodo

de 30 minutos con el fin de tener contacto directo con la misma, colocando cada caja en un agitador orbital (Standar Analog Shaker, VWR) a 200 RPM simulando el transporte durante la cosecha del tomate.

Muestreo del Tomate después de pasar (TIDP). Se muestrearon cinco tomates al finalizar el periodo de agitación, sumergiendo cada fruto en 100 mL de DP, respectivamente. Los resultados fueron reportados en \log_{10} UFC/tomate como se describió en la inoculación de los tomates.

Cálculo del Coeficiente de transferencia (Tomate – Caja). Se evaluó el coeficiente de transferencia ocasionado por los tomates inoculados después de ser expuestos a las diferentes superficies de acuerdo a la ecuación 1 (Wang y Ryser 2014).

$$CFT = \frac{(\text{Población total de } Salmonella \text{ en TNIDP}) \times 100}{(\text{Población del inóculo en TI que fueron pasados por las cajas})} \quad [1]$$

Donde:

CFT: Coeficiente de Transferencia del tomate a la caja expresado en porcentaje

TNIDP: Tomates no inoculados después de pasar por la superficie contaminada en UFC/tomate

TI: Tomates inoculados en UFC/tomate

Evaluación de la contaminación cruzada (Caja – Tomate). Se colocaron cinco tomates inoculados en cada caja (madera o plástico), por un periodo de 30 minutos con el fin de tener contacto directo con la misma, cada caja se colocó en un agitador orbital (Standar Analog Shaker, VWR) a 200 RPM simulando el transporte durante la cosecha del tomate.

Muestreo de la caja después de pasar tomates inoculados. Al finalizar el tiempo de exposición se tomó una muestra de la superficie de la caja al azar, para la caja de madera. Se muestreo toda la base de la superficie de la caja plástica, como se describió en la evaluación de la transferencia (tomate-caja).

Evaluación de la contaminación cruzada (Caja – Tomate). Al finalizar el paso de los tomates inoculados en las cajas (madera o plástico), se pasaron 5 tomates no inoculados sobre las cajas, por un periodo de tiempo de 30 minutos en el agitador orbital (Standar Analog Shaker, VWR) a 200 RPM. Sobre el muestreo de los tomates al finalizar el tiempo se realizó muestreo como se indicó en la inoculación de los tomates.

Cálculo del Coeficiente de Transferencia (Caja – Tomate). Se evaluó el coeficiente de transferencia ocasionado por la contaminación de las cajas después de haber pasado por los tomates inoculados y ser expuestos a tomates no inoculados, de esta forma se obtuvo el cálculo en porcentaje sobre cuánto es la transferencia de las cajas a los tomates de acuerdo a la ecuación 2 (Wang y Ryser 2014).

$$CFT = \frac{(\text{Población total de } Salmonella \text{ en la caja DPTNI}) \times 100}{(\text{Población del inóculo encontrado en la caja DPTI})} \quad [2]$$

Donde:

CFT: Coeficiente de Transferencia de la caja al tomate expresado en porcentaje

DPTNI: Después de pasar el tomate no inoculado en UFC/100 cm² o superficie

DPTI: Después de pasar tomate inoculado en UFC/100 cm² o superficie

Diseño Experimental. Se desarrolló un Bloque Completo al Azar (BCA) para determinar la transferencia de *Salmonella enterica* en las cajas, con 2 tratamientos y 2 repeticiones, cada repetición fue un bloque, teniendo un total de 4 unidades experimentales.

Análisis Estadístico. Para los Bloques Completos al Azar (BCA), se realizó un análisis de varianza, un modelo lineal general (GLM), con separación de medias por Duncan, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, con ayuda del programa “Statistical Analytical System 9.4”. Se realizó una prueba “t” para determinar diferencias entre superficies.

Evaluación de la reducción de *Escherichia coli* K12 en las dos diferentes superficies (madera vs plástico) después de ser sometidas a un tratamiento de desinfección.

Preparación del inóculo. Se resucitó la cepa de *Escherichia coli* K12 en 10 mL de Caldo Soya Tripticasa (TSB, Acumedia, Neogen Corp.), incubando a 35 °C/18-24 h. Pasado el tiempo se lavó con 10 mL de Buffer de Fosfatos (PBS) 3 veces en la centrifuga 15 min por 5000 RPM (Thermo Scientific, 75004381). Se ajustó el inóculo a una concentración final aproximada de 7 log₁₀UFC/mL con 90 mL de PBS.

La concentración del inóculo se verificó haciendo diluciones decimales con diluyente de peptona (DP) y siembra por superficie, en placas con Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV, Acumedia, Neogen Corp.) incubando a 35 °C/18-24 h, reportando las placas que se encontraron en un rango de 25 – 250 colonias, reportados en log₁₀ UFC/mL (Swanson *et al.* 2001).

Inoculación de las cajas (CI). Debido al tamaño de las cajas y la autoclave (Sterimatic Market Forge, STM-E), las cajas (plásticas y madera) fueron cortadas en 4 piezas iguales, se utilizó una pieza para el control negativo, control positivo, tratamiento 1 y el tratamiento 2. Previo a la inoculación de las cajas se higienizo cada pieza lavándola con detergente y aplicando un tratamiento térmico, autoclave (121 °C por 15 min). Se inocularon tres piezas de cada caja con *Escherichia coli* K12, el uso de un microorganismo el cual no es patógeno se dio, principalmente, por cuestiones de bioseguridad, no es posible estar propagando microorganismos patógenos al ambiente, con la finalidad de tener un mejor manejo. De las seis cajas inoculadas (tres de madera y tres plásticas) se inocularon a una carga de 5 log₁₀ UFC/cm² para las cajas de madera y por superficie para las plásticas al remojar las superficies tres veces, dejándolas orear por un tiempo de 15 minutos entre inoculado a una temperatura de 25 °C (temperatura ambiente), de esta manera se logró una inoculación de las superficies uniforme.

Del control positivo, se muestreó una vez la superficie, tomando una muestra con gasa estéril, para las cajas de madera en un área de 10 × 10 cm y para las cajas plásticas toda la superficie, la gasa previamente fue humedecida con 10 mL de DP y se mezcló con 90 mL

de DP para ser homogenizada en el stomacher (IUL, Masticator) 1 minuto a 200 RPM, se realizó una serie de diluciones decimales y siembra por superficie en placas de Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV, Acumedia, Neogen Corp.), incubando a 35 °C/18-24 h (Thermo Scientific, 6856). Las placas reportadas fueron las que se encontraron en un rango de 25 – 250 colonia en \log_{10} UFC/100 cm² para cajas de madera y \log_{10} UFC/superficie para cajas de plástico (Swanson *et al.* 2001).

Aplicación de los tratamientos. Se aplicaron dos tratamientos diferentes de desinfección de las cajas para determinar la capacidad de retener células vegetativas de *Escherichia coli* K12 en las superficies de acuerdo a la naturaleza del material.

Tratamiento de agua (25 °C). El primer tratamiento consistió en la aplicación de agua destilada previamente estéril (25 °C) a chorro corrido con un ligero cepillado en las paredes internas de la caja por un periodo de tiempo de 10 segundos, evaluando el efecto mecánico de este tratamiento sobre las células vegetativas de *Escherichia coli* K12. Al finalizar se realizó un enjuague con agua estéril y se dejó orear por un tiempo de 15 minutos.

Tratamiento agua (25 °C) + detergente + solución de cloro 200 ppm. El segundo tratamiento consistió en la preparación de una solución de desinfección con cloro a una concentración de 200 ppm, agua destilada (25 °C) y detergente común, en este tratamiento también se aplicó un cepillado en las paredes internas de la caja (base) por un tiempo de 10 segundos, evaluando el efecto en las células vegetativas de *Escherichia coli* K12. Al finalizar se realizó un enjuague con agua estéril y se dejó orear por un tiempo de 15 minutos. La preparación de la solución se realizó con 500 ml de agua estéril, 0.50 g de detergente y 0.15 g de hipoclorito de sodio al 68%, de esta forma se obtuvo la solución a 200 ppm (Neal *et al.* 2012; Beuchat y Jee-Hoon 1997).

Muestreo de las cajas después del tratamiento (CDT). Después de realizados los tratamientos de desinfección, de las cajas de madera se tomaron 3 muestras de diferentes puntos al azar, pasando una gasa estéril en una área de 10 × 10 cm, previamente humedecida con 10 mL de Caldo Neutralizante (CN, Acumedia, Neogen Corp.) y sumergida en 90 mL de CN. La muestra fue homogenizada en el stomacher (IUL, Masticator) por 1 minuto a 200 RPM, realizando una serie de diluciones decimales y siembra por superficie en placas de ABRV. Para las cajas de plástico fue el mismo procedimiento, solamente que se muestreo toda la superficie de la base de la caja, incubando a 35 °C/18-24 h (Thermo Scientific, 6856). Las placas que se reportaron fueron las que se encontraron dentro del rango de 25 – 250 colonias en \log_{10} UFC/100 cm² para las cajas de madera y \log_{10} UFC/superficie para las cajas plásticas (Swanson *et al.* 2001).

Reducción de *Escherichia coli* K12. Se determinó la reducción logarítmica que se tuvo presente en las cajas de acuerdo a los tratamientos de limpieza, además de obtener el porcentaje de reducción de la misma, mediante las siguientes ecuaciones 3 y 4:

$$\text{Red} = \text{Log CI} - \text{Log CDT} \quad [3]$$

Donde:

Red: Reducción logarítmica del tratamiento.

CI: Recuento inicial de *E. coli* en las cajas de madera y plástico inoculadas en log₁₀ UFC/100 cm² y superficie, respectivamente.

CDT: Recuento final en cajas de madera y plástico después del tratamiento en log₁₀ UFC/100 cm² y superficie, respectivamente.

$$\% \text{ Reducción} = \frac{(\text{Conc. CI} - \text{Conc. CDT})}{\text{Conc. CI}} \times 100 \quad [4]$$

Donde:

% Reducción: Reducción del tratamiento en porcentaje.

CI: Recuento inicial de *E. coli* en las cajas de madera y plástico inoculadas en UFC.

CDT: Recuento final en cajas de madera y plástico después del tratamiento en UFC.

Diseño Experimental. Se desarrolló un Bloque Completo al Azar (BCA) para determinar la reducción de *Escherichia coli* K12, después del tratamiento de desinfección, donde cada bloque fue la superficie evaluada teniendo 2 superficies × 2 tipos de lavado con un total de 4 tratamientos por cada diseño y 3 repeticiones. Se tuvo un total de 12 unidades experimentales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tabla de reducción de *Escherichia coli* K12 durante el tratamiento de desinfección.

Tipos de caja	Tratamiento	
	Agua (25 °C)	Agua (25 °C + detergente + Sol. Cloro 200 ppm)
Madera	TRT 1	TRT 2
Plástico	TRT 3	TRT 4

Análisis Estadístico. Se realizó un análisis de varianza, con un modelo lineal general (GLM) y separación de medias por Duncan, con un nivel de significancia de P≤0.05, con ayuda del programa “Statistical Analytical System 9.4”.

Evaluaciones físicas de tomates procedentes de Guatemala, almacenados en cajas de madera y plástico.

Obtención del producto. El tomate se obtuvo de productores en Guatemala, arribó a la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano el 13 de Agosto del 2014, 2:00 pm. Al momento de llegar, fue colocado en la Planta de Poscosecha del Departamento de Agroindustria Alimentaria. La mayoría del tomate, llegó madurado (100% de color rojo), el volumen almacenado fue de 12 cajas plásticas con 11.36 kg de tomate/caja y 12 cajas de madera con 22.73 kg de tomate/caja.

Almacenamiento (Temperatura Ambiente). El tomate tiene una tolerancia térmica arriba de 10 °C y por debajo de 12 °C (FAO 2006) para no dañar sus características químicas y físicas del mismo. El tomate fue colocado en una tarima de madera en un cuarto a temperatura ambiente (25 °C) durante un periodo de 15 días en dos estibas, cajas de madera y cajas plásticas respectivamente.

Diseño Experimental. El diseño que se realizó fue un Bloque Completo al Azar, (BCA), con medidas repetidas en el tiempo, dos tratamientos (2 tipos de cajas de almacenamiento). Los tratamientos fueron medidos a través del tiempo durante 15 días. Se midió porcentaje de daño, pérdida de peso y color. El análisis microbiológico se realizó dos veces, al recibir el tomate y al terminar el experimento.

Pérdida de peso. La pérdida de peso se expresó como pérdida de agua por día en kilogramos, muestreando diario 10 cajas de madera y plástico, pesando al inicio de la selección del tomate y al final, por diferencias de pesos, se determinó la pérdida de agua del tomate durante 15 días.

Porcentaje de Daño. Se determinó el porcentaje de daño del tomate mediante el peso de 10 cajas de madera y plásticas. Al iniciar la jornada se pesaba el tomate, el tomate para descarte fue aquel que presento daño por bacterias, hongos o levaduras o por presentar algún daño físico, al finalizar la jornada diaria se volvía a pesar y por diferencias de pesos, se determinó el porcentaje de daño diario.

Análisis de color. Se realizó un análisis digital de imagen para el color, mediante una aplicación electrónica mColorMeter®, bajo la licencia de Apple Inc. para iPad. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Nikon D-5200 y se analizaron con ayuda del programa al subir las fotos en la iPad. De esta forma se determinó el color en notación Munsell como RGB (Red Green Blue), siendo este es un lenguaje de programación, de la misma forma en formatos de impresión de colores (cien, magenta, amarillo y negro), una vez obtenidos los valores de RGB se tabularon en un cuadro para obtener los valores de L^* , a^* , b^* , hue (ángulo), croma y a^*/b^* , los cuales fueron calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones 5, 6 y 7:

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad [5]$$

Donde:

h: hue (ángulo)

a*: valor de color a^*

b*: valor de color b^*

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad [6]$$

Donde:

C: color croma

a*: valor de color a^*

b*: valor de color b^*

$$a^*/b^* = \frac{a^*}{b^*} \quad [7]$$

Donde:

a^*/b^* : relación color a^* y b^*

a*: valor de color a^*

b*: valor de color b^*

Análisis microbiológicos. Se tomaron cinco muestras de tomate por cada tipo de caja de almacenamiento. Cada muestra consistió en cinco tomates. Se realizaron dos muestreos, al llegar los tomates (día 1) y el segundo muestreo, al terminar el experimento (día 15). Así mismo se recolectaron tres muestras de cada una de las superficies de las cajas (madera y plástico) en cada día de muestreo. Para las cajas de madera se muestreó en un área de 10×10 cm y para las plásticas toda la base interna de la caja, reportando los datos en \log_{10} UFC/ 100 cm² y \log_{10} UFC/superficie, respectivamente. Se determinó en cada muestra el recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales, *E. coli*, hongos y levaduras y la determinación de *Salmonella spp.*

Mesófilos aerobios. Cada muestra de cinco tomates fue sumergida en 500 mL de Diluyente de Peptona (DP, Difco, BD), homogenizando por 2 minutos mediante un masaje a la superficie de los tomates. Se desarrolló una serie de diluciones decimales, sembrando de la dilución 10^2 hasta 10^5 , por vaciado en placa, vertiendo una alícuota de 1 mL de la dilución en la placa Petri y 12 – 15 mL de Agar para Métodos Estándar (ACE, Acumedia, Neogen Corp.), atemperado a 45 ± 1 °C en baño maría (Mettler, WNE10), incubando a 35 °C por 46 – 48 h (Thermo Scientific, 6856). Los datos fueron reportados en \log_{10} UFC/tomate, solamente para las placas que se encontraron en el rango contable 25 – 250 colonias (Swanson *et al.* 2001).

Hongos y Levaduras. Para los tomates, se tomó la metodología igual que para los mesófilos aerobios, pero aquí se sembraron las diluciones 10^0 hasta 10^3 en placas Petri vertiendo una alícuota de 1 mL y 12 – 15 mL de Agar Papa Dextrosa (APD, Acumedia, Neogen Corp.) acidificado a pH 3.5 con ácido tartárico al 10%, atemperado a 45 ± 1 °C. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente 25 °C por 5 días. Se reportaron los resultados en \log_{10} UFC/tomate para las placas que se encontraron en un rango de 15 – 150 colonias (Swanson *et al.* 2001).

Para las superficies, se desarrolló el mismo procedimiento que los mesófilos aerobios para el caso de las superficies muestreadas, cambiando las diluciones a sembrar 10^0 hasta 10^3 , las placas reportadas fueron aquellas que se encontraron en un rango de 25 – 250 colonias (Swanson *et al.* 2001), estos resultados fueron reportados en \log_{10} UFC/100 cm² y \log_{10} UFC/superficie, para cajas de madera y cajas plásticas.

Coliformes totales en placa y *Escherichia coli* spp. Para los tomates, se desarrolló la misma metodología que hongos y levaduras sembrando las mismas diluciones decimales, por vaciado en placa, vertiendo 12 – 15 mL de Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV, Acumedia, Neogen Corp.) con una sobrecapa de Agar Bilis Rojo Violeta con MUG (ABRV con MUG, Acumedia, Neogen Corp.), esto para detectar células de *Escherichia coli* mediante radiación Ultra Violeta (254 nm). Para los coliformes se reportaron aquellas placas que se encontraron en el rango contable de 25 – 250 colonias por placa (Swanson *et al.* 2001) en \log_{10} UFC/tomate.

Para las superficies, se desarrolló la misma metodología que para los hongos y levaduras sembrando las mismas diluciones decimales, por vaciado en placa, utilizando ABRV y sobrecapa de ABRV con MUG. Para los coliformes se seleccionaron aquellas placas que se encontraron en un rango contable de 25 – 250 colonias por placa (Swanson *et al.* 2001) reportando en \log_{10} UFC/100 cm² y \log_{10} UFC/superficie, para cajas de madera y cajas plásticas.

Aislamiento de *Salmonella* spp. Para el aislamiento, en el segundo muestreo se cambió el DP por Agua Peptonada Bufferada (APB, Acumedia, Neogen Corp.), después de realizar los análisis para mesófilos, coliformes totales, hongos y levaduras, se incubó a 35 °C/18-24 h (Thermo Scientific, 6856) y se desarrolló la metodología de aislamiento de *Salmonella* spp. del manual de métodos analíticos bacteriológicos (BAM) de la FDA (Andrew *et al.* 2011).

Análisis Estadístico. Se realizó un análisis de varianza, un modelo lineal general (GLM), con separación de medias por Duncan, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, con ayuda del programa “Statistical Analytical System 9.4”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la transferencia y contaminación cruzada de *Salmonella enterica* en dos diferentes contenedores utilizados para la cosecha y transporte de tomates. La concentración del inóculo en la que fueron sumergidos los tomates fue de $8.20 \pm 0.02 \log_{10}$ UFC/mL. Los tomates después de haber sido sumergidos en el inóculo y oreados presentaron una carga inicial de $7.45 \pm 0.19 \log_{10}$ UFC/tomate, previos al paso por las cajas de madera y plástico. Se determinó que hubo una reducción significativa ($P \leq 0.05$) en la transferencia para las dos superficies (madera y plástico) *versus* la carga inicial de los tomates al ser pasados por las mismas (Cuadro 2), obteniendo recuentos de $5.9 \log_{10}$ UFC/tomate en ambas cajas. Otros autores han determinado que la transferencia de *Salmonella* como otros microorganismos es posible siempre y cuando los niveles de organismos indicadores estén como posible fuente de enterobacterias (Bell *et al.* 1997).

De acuerdo al coeficiente de transferencia tomate-caja, el porcentaje para la caja de plástico y madera, no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$), mientras que el tomate inoculado (Cuadro 2) presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) contra los otros dos tomates pasados por las cajas de madera y plástico, observándose que 1.49 y $1.60 \log_{10}$ UFC/tomate, se quedaron en las cajas de madera y plástico, respectivamente. Autores coinciden con el coeficiente de transferencia donde reportan un 95% de adherencia de *E. coli* cepa ATCC 11229, esto en madera nueva de maple (Abrishami *et al.* 1994).

El porcentaje de transferencia del tomate a la caja, se encontró entre el rango de 90-100%, otros autores han reportado valores similares que oscilan entre los 97.68 y 97.42% en zanahorias y melón, respectivamente, después de estar en una superficie de plástico y tener un tiempo de secado de 0 horas, mientras que a la hora de secado este porcentaje tiende a aumentar para el caso de la zanahoria (99.93%) y el melón tiende a bajar (90.05%). Los valores a las 0 horas en log están entre 2.52 y 2.63 \log_{10} UFC/g, siendo similares a los reportados en la transferencia del tomate que fue $< 2 \log_{10}$ UFC/tomate (Jensen *et al.* 2013).

La reducción de *Salmonella enterica* se debe a la pérdida de viabilidad en células vegetativas, debido que no es capaz de sobrevivir y persistir en superficies de madera o polipropileno, comparando otros materiales como formica o acero inoxidable (Moore *et al.* 2007). Además, la presencia de algunos nutrientes en las superficies, puede ayudar en mejorar el daño que sufren las células por desecación, facilitando la generación de ATP para reparar este estrés. Es necesario mantener las superficies libres de materia orgánica, la cual pueda ayudar a prevenir la deshidratación por parte de las células (Abban *et al.* 2012).

Cuadro 2. Recuento de *Salmonella enterica* en tomate inoculado antes y después de pasar por las cajas de madera o plástico.

Etapa	log ₁₀ UFC/tomate	CFT Tomate-Caja (%)
	Media ± DE [¥]	Media ± DE
Antes de pasar	7.454 ± 0.189 ^A	
Después de pasar en caja de Madera	5.964 ± 0.289 ^B	95.858 ± 2.474 ^A
Después de pasar en caja de Plástico	5.848 ± 0.282 ^B	96.961 ± 1.999 ^A
CV (%)	4.016	2.333

^{A-B}: valor estadísticamente diferente entre cajas (P≤0.05) dentro de la columna.

CFT: Coeficiente de transferencia= [(Población de 10 Tomates Inoculados Antes de Pasar)-(Población total en 10 Tomates Inoculados Después de Pasar)]*100/(Población Total de los Tomates Inoculados); CV: Coeficiente de Variación; ¥: Desviación Estándar.

La prueba t indicó que no hay diferencias entre superficies (P≥0.05) para el coeficiente de transferencia del tomate a la caja. La recuperación de *Salmonella entérica* en las cajas de madera y plástico, no presentó diferencias (P≥0.05). Por lo que tanto las cajas de madera como de plástico llegan a sufrir contaminaciones por *Salmonella*, llegando a tener una contaminación cruzada (Cuadro 3). Al pasar por las superficies se observa la cantidad en log₁₀ UFC/tomate de contaminación cruzada y el coeficiente de transferencia de las cajas al tomate > 2 log₁₀ UFC/tomate se transfirió hacia el fruto.

Las cajas de madera y plástico no presentaron diferencias significativas (P≥0.05) entre superficies. Los tomates que no sufrieron una contaminación directa con el inóculo presentaron un 100% de contaminación por *Salmonella entérica* (Cuadro 3) al pasar sobre las superficies de las cajas que habían tenido contacto directo con fruto contaminado. El tomate presentó una transferencia del 30.76 ± 6.58% equivalente a 2.28 ± 0.466 log₁₀ UFC/tomate y 24.92 ± 11.243% lo equivalente a 2.56 ± 0.69 log₁₀UFC/tomate, para madera y plástico, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos con *Salmonella enterica* en el estudio de Ravishankar *et al.* (2010), donde evaluó la transferencia de *Salmonella* Newport en tres diferentes escenarios. El primero fue el más similar a este estudio, encontrando una carga en la tabla de picar y cuchillo utilizado de 2.21 ± 0.21 y 2.09 ± 0.03 log₁₀ UFC/cm², respectivamente, después de haber inoculado pollo a 5 log₁₀ UFC/g.

La madera y el plástico tienen una superficie rugosa, mayor en la madera a comparación del plástico y no es visible a simple vista la cual disminuye la capacidad de remoción de *Salmonella enterica*, (Cuadro 3). Se observa que solo un 30.77 y 24.93% fue transferido de la caja de madera y plástico, respectivamente al tomate. De la misma forma la cantidad recuperada en cajas de madera y plástico al finalizar el paso de los tomates inoculados y los no inoculados dieron conteos de 2.866 ± 0.885 y 3.639 ± 1.035 log₁₀ UFC/superficie, respectivamente.

Cuadro 3. Recuento de *Salmonella enterica* en tomate no inoculado después de pasar por las cajas de madera o plástico contaminadas con tomates inoculados.

Tipo de caja	% tomates contaminados	log ₁₀ UFC/tomate	CFT
		Media ± DE [¥]	Caja-Tomate (%) Media ± DE
Madera	100	2.29 ± 0.47 ^A	30.77 ± 6.58 ^A
Plástico	100	2.56 ± 0.69 ^A	24.93 ± 11.24 ^A
CV (%)		26.445	32.425

^{A-B}: valor estadísticamente diferente entre cajas ($P \leq 0.05$) dentro de la columna.

CFT: Coeficiente de transferencia= [Población total en Log de 10 Tomates No Inoculados Después de Pasar]*100/(Población total de los Tomates Inoculados).

CV: Coeficiente de Variación; ¥: Desviación Estándar.

La prueba t indicó que no hay diferencias entre superficies ($P \geq 0.05$) para el coeficiente de transferencia de la caja al tomate. Autores han reportado que en superficies plásticas el porcentaje de tomates que se contaminan al entrar en contacto con este tipo de materiales es de 0. En este estudio se observó que ambas cajas tanto madera como plástico presentaron el mismo nivel de contaminación cruzada hacia los tomates no inoculados. Los coeficientes de transferencia del material contaminado al producto reportados por otros autores han sido menores (0.013%) (Wang y Ryser 2014). No obstante la carga microbiana transferida al tomate reportada fue $> 2 \log_{10}$ UFC/100 cm², similar a las reportadas en este estudio.

Evaluación de la reducción de *Escherichia coli* K12 en las dos diferentes superficies (madera vs plástico) después de ser sometidas a un tratamiento de desinfección. La concentración de la suspensión del inóculo fue de $8.22 \pm 0.091 \log_{10}$ UFC/mL de *E. coli* K12. La carga inicial para las cajas de plástico y madera en las superficies fue de $7.69 \pm 0.05 \log_{10}$ UFC/superficie y $8.22 \pm 0.06 \log_{10}$ UFC/100 cm², respectivamente.

Se puede observar que entre tratamientos existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$), para las cajas de plástico, mientras que las cajas de madera no presentan cambios significativos ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos de lavado. Entre superficies solamente hay cambios significativos ($P \leq 0.05$) en el tratamiento de lavado con la solución de cloro a 200 ppm, entre ambas superficies (Cuadro 4). El uso de soluciones cloradas en la industria alimentaria es cotidiano, principalmente para la desinfección de frutas y vegetales, en la parte de poscosecha. La aplicación de éstas y su efectividad en reducir microorganismos tanto patógenos como deterioradores, tiene aplicaciones durante el lavado, con el fin de alargar la vida útil del producto. La contaminación por microorganismos no solamente se da por *Salmonella spp.* también se ha reportado *Escherichia coli spp.* (Beuchat y Jee-Hoon 1997).

Cuadro 4. Resultados de reducción logarítmica (\log_{10} UFC/superficie) de acuerdo a los tratamientos de higienización.

Cajas	Agua (25 °C)	Agua (25 °C + Sol. Cloro 200 ppm + detergente)
	Media \pm DE [¥]	Media \pm DE
Madera	1.256 \pm 0.393 ^{A(x)}	1.886 \pm 0.387 ^{B(x)}
Plástica	2.220 \pm 0.784 ^{A(y)}	5.813 \pm 0.188 ^{A(x)}
CV (%)	33.860	7.469

^{A-B}: valor estadísticamente diferente entre cajas ($P \leq 0.05$) dentro de la misma columna.

^{x-y}: medidas con diferente letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) dentro de la misma fila.

¥: Desviación Estándar.

CV: Coeficiente de Variación.

La contaminación de las superficies está asociada directamente al tipo de materiales con las que se fabrican cada caja. Las fibras de la madera (celulosa y lignina) y la porosidad de la misma son factores importantes en la adherencia de patógenos en éste tipo de materiales. Lo mismo para las cajas plásticas, que depende mucho de la condición en la cual se encuentra la superficie del envase para presentar adherencia alguna. Estudios muestran que la madera tiene mayor capacidad de retener bacterias en comparación al plástico (Abban *et al.* 2012; Barker *et al.* 2003; De Vere y Purchase 2007; Osorio 2014).

Las cajas de madera y plástico, representan un punto potencial de contaminación en los tratamientos aplicados. Para este estudio se puede observar una disminución logarítmica representativa y con diferencias significativas, donde se presentaron interacciones entre los dos tratamientos de higienización ($P \leq 0.05$) en las cajas de madera. Para los porcentajes de reducción no se presenta interacción entre el tratamiento de lavado y el tipo de superficies ($P > 0.05$).

El lavado con solución de cloro a 200 ppm mostró reducciones de $99.9999 \pm 0.00001\%$, reduciendo $5.813 \pm 0.188 \log_{10}$ UFC/superficie en cajas plásticas. Estudios han demostrado que las soluciones cloradas son ineficientes en la eliminación total de patógenos. Esto se puede comparar con ambos tratamientos de lavado. En el caso del plástico, se recuperó una carga de $2 \log_{10}$ UFC/superficie después de aplicar el tratamiento de lavado y desinfección. Las soluciones cloradas son potencialmente usadas como agente de higienización para prevenir una contaminación cruzada con productos frescos que lleguen a estar en contacto con estas superficies. Además, la materia orgánica neutraliza el cloro antes de tener un efecto letal sobre los microorganismos (Olaimat y Holley 2012; Wang y Ryser 2014).

Por otra parte una solución a 200 ppm con un tiempo prolongado de exposición (15 min) y acción mecánica >10 segundos reduce significativamente ($P \leq 0.05$) la carga microbiana de una superficie debido a que ningún patógeno sobrevive a este tipo de tratamientos químicos. La reducción para el tratamiento (agua + 200 ppm cloro) de higienización en cajas de madera presentó una reducción de $98.378 \pm 1.034\%$ presentando diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) aplicados a las cajas de madera. Los porcentajes de reducción obtenidos en los tratamientos (agua a 25 °C) presentaron un 93.031 ± 4.690 y $98.628 \pm 1.678\%$, para cajas de madera y plástico, respectivamente. La reducción en madera es mínima y se asume que a medida que se deja el oreado en este tipo de superficies, la capilaridad de la misma hace que se absorban o retenga mayor cantidad de células vegetativas (Abban *et al.* 2012; Moore *et al.* 2007).

Cuando se presenta mayor contacto con la superficie de la madera siendo prolongado por un periodo >5 minutos, la madera tiende a absorber el líquido (inóculo) a la matriz de la madera algo diferente a las superficies plásticas o metálicas las cuales no presentan una matriz similar no absorben presentando menor adherencia. Ejemplo de esto, se puede observar con los recuentos obtenidos en las cajas de madera vs plástico (Cuadro 4), donde el tiempo de oreado para ambas fue de 15 minutos y solo hubo una reducción mínima en las cajas de madera vs plástico siendo significativamente diferente entre ambos tratamientos por superficies ($P \leq 0.05$) (Abrishami *et al.* 1994).

Autores han reportado reducciones logarítmicas de 0.22 y 0.04 \log_{10} UFC/mL en madera nueva y usada, respectivamente (Abrashami *et al.* 1994). Además en plástico reportando ND (no detectable) para los primeros 5 minutos después de inoculados, debido a la remoción por completo de la superficie. De la misma forma se sabe que las bacterias patógenas forman biofilms (exopolisacáridos hidratados), muchas veces como medio de protección ante el ambiente (Osorio 2014; Abrashami *et al.* 1994). La FDA recomienda lavar utensilios con un método abrasivo con el fin de poder remover mayor cantidad de microorganismos en este caso *Salmonella*, es necesario que el consumidor tenga una educación sobre la importancia de por qué es necesario realizar una limpieza de utensilios que tienen contacto directo con alimentos, en este caso con alimentos crudos (vegetales), con la finalidad de prevenir una enfermedad o infección por alimentos (Ravishankar *et al.* 2010).

La temperatura del agua a la cual fueron lavadas, también tiene una gran afectación, debido que estaba a temperatura ambiente (25 °C). Estudios demuestran que el lavado con agua fría no tiene ningún efecto de reducir una carga microbiana a comparación si es lavada con agua tibia a una temperatura de 46 °C por 75 segundos o agua caliente 62 °C por 10 segundos. La presencia de *Salmonella* está por debajo del límite de detección, indicando que la aplicación de temperatura tiene un efecto letal sobre las células vegetativas de este patógeno al momento de entrar en contacto directo con el agua caliente (de Jong *et al.* 2008; Ravishankar *et al.* 2010).

Evaluación de las características físicas y microbiológicas de los tomates procedentes de Guatemala, almacenados en cajas de madera y plástico. El tomate fue recibido el 13 de agosto del 2014, proveniente la ciudad de Guatemala, frontera con Copan. Un total de 20 cajas con producto fueron analizadas, 10 cajas de madera y 10 cajas plásticas, con un peso promedio por caja de 23.16 ± 0.96 kg y 11.15 ± 0.63 kg, respectivamente. A primera vista el productor tiene una pérdida en ventas del producto, ofreciendo más volumen a menor precio debido que las cajas de madera son tomadas a un peso estándar de 22.73 kg (50 lb) y 11.36 kg (25 lb) para las cajas de plástico. En el mercado de Guatemala, la caja de tomate de primera calidad tiene un precio Q. 60.00 la caja de 50 lb y el de segunda Q. 40.00 la caja para Septiembre 2014 (1 USD= Q. 7.72) (FASAGUA 2014).

Para el porcentaje de daño no se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre ambas cajas pero a través del tiempo si ($P \leq 0.05$) (Cuadro 5). Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la pérdida de peso (agua) donde el mejor material de almacenamiento fue la caja plástica vs caja de madera ya que presentó menor pérdida de agua por día (0.440 ± 0.252 kg agua). El factor caja y tiempo presentaron interacciones ($P \leq 0.05$), asumiendo esto, ya que la caja de madera tiene la capacidad de absorber humedad del medio y por la transpiración del fruto si éste es expuesto a temperaturas >15 °C se genera más la pérdida de agua del fruto (Kader *et al.* 1993; Reina *et al.* 1998). El tomate almacenado en las cajas plásticas presentó mayor arrugamiento en la epidermis por deshidratación en el día 10 de almacenamiento, lo que generó una reducción en la turgencia del tejido, provocando un ablandamiento en los frutos, debido a los orificios presentes en la misma.

El tomate fue almacenado a una temperatura de 26.3 ± 2.91 °C y 61.4 ± 10.67 %HR con un tiempo de almacenamiento de 15 días realizando pruebas microbiológicas y físicas. El principal material de las cajas de madera es proveniente de pino (*Pinus oocarpa*) la cual se encuentra y utiliza tanto en Guatemala, su principal uso es para la fabricación de cajas de empaque, postes, durmientes o extracción de resinas, la madera tiene la característica de presentar capilares y la penetración del inóculo líquido hacia el interior de la matriz (Abrashami *et al.* 1994). Las cajas plásticas son de un material de polipropileno, siendo un polímero vinílico, similar al polietileno, este tiene una baja densidad de 0.9 g/cm³, no se funde a temperaturas por debajo de 160 °C, es cristalino de forma isotáctica por lo cual adquiere la dureza y rigidez siendo resistentes a la deformación por calor. Por lo general son llamados homopolímeros cuya densidad es 0.905 g/cm³ (Hindle s.f.), con la ventaja de poderse reciclar una vez que presenten algún daño en la estructura de la misma, teniendo un ingreso por la venta de esta caja, algo diferente a las cajas de madera las cuales son desechadas dando un uso en generación de energía (al quemarlas).

La función principal del empaque es contener el producto y garantizar la calidad del mismo facilitando el manipuleo y aireación del producto reduciendo la pérdida por humedad e impidiendo la deshidratación (Reina *et al.* 1998; Casierra-Posada y Aguilar-Avenidaño 2008). Las interacción entre el factor daño no presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$), sin embargo se pudo observar que el porcentaje de daño diario fue aproximadamente 13%. Autores reportan que el mejor punto de cosecha y

almacenamiento del tomate se da cuando se cosecha con una coloración 75% verde y 25% color (Casierra-Posada y Aguilar-Avendaño 2008). Para efecto de este estudio, el fruto llegó con un grado de maduración del 100% color, teniendo mayor descarte por caja de tomate diario para ambas cajas, sin presentar diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre cajas de madera y cajas plásticas.

El transporte es otro factor que influye en los daños del tomate, debido a que, los tomates fueron transportados por tierra desde Guatemala hasta la escuela. En su mayoría se presentaron daños por compresión e impacto, tanto por movimientos del vehículo y entre las mismas cajas de madera y plásticas, la cantidad de tomate descartado después de ser recibidos fue de 4.44 y 1.33 kg, respectivamente.

Cuadro 5. Resultados de pérdida de peso y porcentaje de daño del tomate almacenado en la planta de poscosecha durante 15 días.

Cajas	Daño (%)	Pérdida de Peso (kg)	Descarte tomate (kg/caja día)
	Media \pm DE [¥]	Media \pm DE	Media \pm DE
Madera	13.7 \pm 6.43 ^A	0.72 \pm 0.34 ^A	0.91 \pm 0.52 ^A
Plástica	13.2 \pm 4.34 ^A	0.44 \pm 0.25 ^B	0.73 \pm 0.41 ^A
CV (%)	29.481	20.727	32.706

^{A-B}: medias con diferente letra son significativamente diferente entre columnas ($P \leq 0.05$).

CV: Coeficiente de Variación.

¥: Desviación Estándar.

A través del tiempo, aumenta directamente el descarte del tomate (kg). En países en desarrollo las pérdidas poscosecha de productos frescos varían entre el 25 al 50% de la producción (Ferratto *et al.* 2010) y el porcentaje de ambas cajas varía entre un 13 – 14% sin que haya cambios estadísticamente significativos ($P \geq 0.05$) para ambas cajas de embalaje. La mayoría de los tomates producidos son comercializados localmente en Guatemala (CENMA sur) a un precio de Q. 1.2 por cada 0.454 kg, para el mes de Septiembre (FASAGUA 2014). Si a esto se le asume la pérdida de peso diario en cajas de madera o plástico, el productor pierde por día de almacenamiento a una temperatura de 26.3 °C la cantidad de Q. 9.69 para las cajas de madera y Q. 5.06 para las cajas de plástico por kilogramo.

Teniendo en cuenta los promedios recibidos, se puede deducir que el productor tiene una pérdida en su ingreso vendiendo 0.44 kg de tomate más en cajas de madera y el comerciante de 0.22 kg de tomate, monetariamente hablando equivale a \$ 0.15 USD de pérdida por caja de madera que se vende suponiendo que el tomate es de primera y para las cajas plásticas la pérdida es de \$ 0.075 USD por caja plástica vendida. Si la venta se da

por parte de un tercero, estaría ganando Q. 1.16 y Q. 0.58 por caja de madera y plástico vendida, respectivamente. Ganancia que tiene por el extra de 0.44 y 0.22 kg de tomate, de acuerdo a los pesos promedio reportados anteriormente se puede observar que las cantidades presentes en las cajas de madera y plástico, tienen más producto del que se maneja en el mercado de Guatemala, donde se ofrece una caja de madera a un peso establecido de 22.73 kg (50 lb) y la plástica de 11.36 kg (25 lb).

Para el tomate, el color es un parámetro importante en la calidad del fruto. Cambios en la deshidratación como pérdida de peso y agua, provocan cambios directos en la coloración del tomate. Las variables indispensables en la medición del color fueron L^* que es luminosidad con escala de 0 siendo negro y 100 blanco; a^* es (rojo-verde), los valores positivos rojos, valores negativos verdes y 0 es neutro; b^* (azul-amarillo), los valores positivos azules, los valores negativos amarillos y 0 neutro; y el tono (hue) se mide por el ángulo alrededor del eje vertical indicando un color en particular (Konica Minolta 2003).

Cambios no significativos en L^* , a^* y b^* ($P \leq 0.05$) fueron observados (Cuadro 6). A medida que pasaba el tiempo de almacenamiento, los valores correspondientes para las cajas de plástico bajaron transcurridos 10 días de almacenamiento ($P \leq 0.05$). Debido que el tomate llegó con un grado de maduración 100% color, se esperaba que durante el tiempo de almacenamiento se presentara un aumento en los valores de a^* y b^* , debido a la degradación de la clorofila y aumento de licopeno. El tomate presentó valores similares en luminosidad según lo reportado por otros autores donde encontraron 48.40 ± 7.19 utilizando la metodología de análisis de imagen digital, para el fruto presente en las cajas de plástico y de madera (Stinco *et al.* 2013) siendo iguales los valores por el periodo de 15 días en ambas cajas, respectivamente. En el valor a^* en cajas de plástico y madera, presentó cambios significativos ($P \leq 0.05$) a los 10 y 15 días de almacenamiento, respectivamente. Teniendo el mismo comportamiento el valor b^* .

Estas variaciones en color se pueden atribuir directamente al contenido de licopeno y β -caroteno presente en el fruto. Se han encontrado aumentos en la coloración de estos compuestos dependiendo de las condiciones de donde se cultive este producto y la etapa de maduración del mismo. En este caso el tomate al llegar al 100% color, el contenido de clorofila fue mínimo teniendo altos valores en a^* los que se asumen al alto contenido de licopeno y β -caroteno (Jarquin-Enríquez *et al.* 2013).

El tono (hue) no presentó diferencias significativas ($P \geq 0.05$) para las cajas de madera vs cajas de plástico, donde la coloración obtenida se encontró en el rango similar reportado por otros autores Ali *et al.* (2004). Esta variable fue significativamente diferente ($P \leq 0.05$) para las cajas plásticas vs madera que fueron iguales, según la escala de tonalidad (hue). Los valores que se encuentran entre los 40° significan que tienen una coloración anaranjada, los tomates evaluados tuvieron medias en el rango de $40 - 45^\circ$ algo que a la perspectiva del ojo humano pareciera una coloración rojiza, mediante la aplicación mColorMeter®, presentaron dicha tonalidad con un grado de maduración de 100% (Cuadro 7).

Cuadro 6. Resultados de color del tomate en L a b, a temperatura ambiente durante los 15 días de almacenamiento para cajas plásticas y de madera.

Valores	Días	Cajas de Almacenamiento	
		Plástico	Madera
		Media ± DE [¥]	Media ± DE
<i>L</i> *	1	41.4 ± 2.68 ^{A(x)}	37.9 ± 2.97 ^{A(x)}
	5	40.7 ± 1.22 ^{A(x)}	37.9 ± 2.98 ^{A(x)}
	10	40.0 ± 4.47 ^{A(x)}	40.4 ± 2.39 ^{A(x)}
	15	38.1 ± 1.70 ^{A(x)}	37.0 ± 2.12 ^{A(x)}
	CV (%)	6.577	7.846
<i>a</i> *	1	51.2 ± 3.84 ^{A(x)}	50.2 ± 1.38 ^{A(x)}
	5	47.9 ± 1.40 ^{AB(x)}	50.4 ± 2.17 ^{A(x)}
	10	44.4 ± 3.30 ^{B(y)}	49.6 ± 1.01 ^{A(x)}
	15	47.4 ± 1.82 ^{AB(x)}	46.7 ± 1.39 ^{B(x)}
	CV (%)	1.691	0.971
<i>b</i> *	1	47.7 ± 3.87 ^{A(x)}	46.5 ± 2.10 ^{A(x)}
	5	44.8 ± 3.04 ^{A(x)}	46.1 ± 3.15 ^{A(x)}
	10	38.0 ± 2.91 ^{B(y)}	45.8 ± 1.60 ^{A(x)}
	15	44.1 ± 1.83 ^{AB(x)}	40.5 ± 2.41 ^{B(x)}
	CV (%)	1.895	1.580

^{A-B}: valor diferente significativamente entre cajas ($P \leq 0.05$) dentro de la misma columna.

^{x-y}: medidas con diferente letra son diferentes significativamente ($P \leq 0.05$) dentro de la misma fila;

CV: Coeficiente de Variación; ¥: Desviación Estándar.

El valor *L** presentó valores similares a los reportados por otros autores con respecto la procedencia de los tomates (cajas de madera o plástico), donde oscila entre 37.5 a 47.2 como valor mínimo y máximo, respectivamente. Por lo que se puede comparar directamente con los resultados obtenidos en este estudio (Odriozola-Serrano *et al.* 2008). El valor *a** sirve como un parámetro para indicar la coloración rojiza que se desarrolla a medida que aumenta el grado de maduración del fruto y el valor *b** indica el cambio de decoloración amarilla. Entendiendo esto los valores obtenidos entre *a**/*b** indican que al ser mayores a 1.00, hay coloración roja en los tomates que se almacenaron, según autores han encontrado que estos valores tienen fluctuaciones entre el rango -0.47 para tomates con coloraciones verdes y 0.95 a 1.21 para colores rojizos, propios del fruto (Batu 2004). Para el hue (Cuadro 8), fueron similares a los obtenidos por Stinco *et al.* (2013), donde utilizó análisis por imágenes digitales, algo similar a lo de este estudio, teniendo un valor en los tomates frescos de *a**/*b** y hue (1.06 ± 0.31 y 44.72 ± 9.62 , respectivamente).

Las cajas de madera no presentaron cambios significativos ($P \leq 0.05$) a través del tiempo pero las cajas plásticas tuvieron mejor color al día 5 comparado con las otras tres medidas, cabe mencionar que los datos de color son expresados en tomate fresco. De la misma forma se observa un cambio significativo ($P \leq 0.05$) a través del tiempo para los tomates almacenados en plástico vs los almacenados en madera, por lo demás se puede afirmar que

al ser un tomate con un mismo grado de madurez fue difícil encontrar diferencias significativas, pero se puede afirmar que otros autores obtuvieron valores similares a los reportados en color (Santos-Sánchez *et al.* 2012).

Cuadro 7. Resultados de color del tomate a^*/b^* , h y croma, a temperatura ambiente durante los 15 días de almacenamiento para cajas plásticas y de madera.

Valores	Días	Cajas de Almacenamiento	
		Plástico	Madera
		Media \pm DE [¥]	Media \pm DE
a^*/b^*	1	1.02 \pm 0.004 ^{B(x)}	1.02 \pm 0.019 ^{A(x)}
	5	1.04 \pm 0.010 ^{A(x)}	1.02 \pm 0.006 ^{A(y)}
	10	1.03 \pm 0.010 ^{B(x)}	1.02 \pm 0.014 ^{A(x)}
	15	1.02 \pm 0.015 ^{B(x)}	1.04 \pm 0.022 ^{A(x)}
	CV (%)	0.805	1.483
h	1	42.96 \pm 0.40 ^{A(x)}	43.03 \pm 2.23 ^{A(x)}
	5	40.55 \pm 1.14 ^{B(y)}	43.08 \pm 0.70 ^{A(x)}
	10	42.33 \pm 1.02 ^{A(x)}	42.69 \pm 1.57 ^{A(x)}
	15	42.89 \pm 0.63 ^{A(x)}	40.83 \pm 2.48 ^{A(x)}
	CV (%)	2.158	4.088
Croma	1	69.99 \pm 5.42 ^{A(x)}	68.43 \pm 1.80 ^{A(x)}
	5	65.66 \pm 2.33 ^{A(x)}	68.34 \pm 3.59 ^{A(x)}
	10	58.43 \pm 4.24 ^{B(y)}	67.55 \pm 1.79 ^{A(x)}
	15	64.74 \pm 2.45 ^{A(x)}	61.89 \pm 1.09 ^{B(x)}
	CV (%)	6.459	4.194

^{A-B}: valor estadísticamente diferente entre cajas ($P \leq 0.05$) dentro de la misma columna.

^{x-y}: medidas con diferente letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) dentro de la misma fila; CV: Coeficiente de Variación; ¥: Desviación Estándar.

Los análisis microbiológicos (Cuadro 8) mostraron, para los Coliformes Totales que no hubo diferencias significativas ($P \geq 0.05$) a través del tiempo, ni entre superficies muestreadas como los tomates muestreados. Para los análisis de *E. coli* se observa diferencias significativas entre superficies muestreadas ($P \leq 0.05$), mientras que a través del tiempo no se mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$). Se podría afirmar que a los 15 días los tomates presentaron un valor estimado de $< 2.0 \log_{10}$ UFC/superficie en cajas de plástico a comparación de las de madera se encontró $2.98 \log_{10}$ UFC/100 cm².

Los análisis de *E. coli* en tomate no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) a través del tiempo y entre la procedencia de los tomates. Para los mesófilos aerobios se pudo determinar que hubo diferencias estadísticamente significativas a través del tiempo ($P \leq 0.05$) y entre superficies no se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$). Los análisis sobre los tomates mostraron que no hubo diferencias significativas ($P \geq 0.05$) a través del tiempo y entre tomates, pero en los tomates provenientes de las cajas de madera se observó un aumento de $1 \log_{10}$ UFC/tomate. De la misma forma, para las cajas de

madera y plástico, presentaron un aumento a través del tiempo de casi $4.5 \log_{10}$ UFC/100 cm^2 y $1.5 \log_{10}$ UFC/superficie, respectivamente.

Los hongos y levaduras presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre superficies, pero no a través del tiempo ($P \geq 0.05$). Los mesófilos aerobios presentaron diferencias significativas a través del tiempo ($P \leq 0.05$), casi de $3.6 \log_{10}$ UFC/100 cm^2 y $1.5 \log_{10}$ UFC/superficie para cajas de madera y plástico, respectivamente. Para el caso de los tomates fue al contrario, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) a través del tiempo y entre origen de almacenamiento de los tomates, en el caso de los tomates provenientes de las cajas de madera y plástico, se observó que presentaron un aumento de casi 1.5 y $2.1 \log_{10}$ UFC/tomate, respectivamente.

Los principales hongos y microorganismos que afectan a los tomates durante poscosecha, son el moho gris, *Botrytis cinerea sp*; podredumbre blanda, *Erwinia carotovora subsp carotovora* (Sosa 2013). La importancia de saber la carga microbiología de los alimentos, es porque muchos de ellos tienen aplicaciones como organismos indicadores, en el caso de coliformes totales, *Escherichia coli* es usado como indicador de posible presencia de *Salmonella* (Bell *et al.* 1997). Además de saber las condiciones higiénicas con respecto a las buenas prácticas, también los organismos deterioradores sirven como indicadores de patógenos, los cuales tienen altos costos en la salud pública.

La cuantificación de estos microorganismos deterioradores en la industria alimentaria como en productos crudos, es de vital importancia debido que provee información sobre si algún paso durante el proceso falló. Ejemplo de estos tenemos a los mesófilos aerobios, hongos y levaduras. Sobre patógenos, la detección es mínima, por lo que es necesario realizar una resucitación de estas con medios de enriquecimiento y aislamientos para realizarles pruebas bioquímicas típicas de cada patógeno.

Los mesófilos aerobios, indican la calidad de los alimentos, por lo general cuando el producto está contaminado hay mayor desarrollo cuando existe un abuso de temperatura. Por lo general la temperatura de incubación está en el rango de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, la temperatura a la cual fueron almacenadas las cajas fue $26.3 \text{ }^\circ\text{C}$ promedio, comparado a la temperatura óptima se encuentra entre los 20 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por lo que se observó mayor desarrollo de mesófilos durante los 15 días de almacenamiento. En relación a los coliformes fecales y *E. coli*, este grupo tiene la peculiaridad de fermentar lactosa comparada con *Salmonella* que no fermenta glucosa. La presencia de *E. coli* indicó una deficiencia en las condiciones higiénicas del lugar. Los hongos y levaduras son los organismos más comunes en el deterioro de frutas y vegetales reduciendo la actividad de agua, aunque también pueden desarrollarse en A_w 0.6 a 0.7 (Bell *et al.* 1997).

El tomate es un fruto botánicamente, los límites máximos permisibles para hongos y levaduras es $6 \log_{10}$ UFC/tomate (Bell *et al.* 1997). Los recuentos en los tomates indican que está por encima del límite permisible en $0.5 \log_{10}$ UFC/tomate tanto para tomates provenientes de las cajas de madera como las de plástico. Para el caso de *E. coli* el límite máximo permisible es $3 \log_{10}$ UFC/tomate según el criterio microbiológico (Bell *et al.* 1997) para productos listos para comer (Crudos) y de $2 \log_{10}$ UFC/tomate para el

reglamento técnico centroamericano (RTCA 67.04.50:80). En este caso, se encontró que los tomates estaban por debajo del límite $2 \log_{10}$ UFC/tomate.

Para enterobacterias como *Salmonella* el criterio tiene que ser ausencia, en el caso de los mesófilos y coliformes totales el criterio de ausencia no aplica. El reglamento técnico centroamericano, RTCA 67.04.50:80, para frutas y hortalizas frescas indica que en el caso de *Salmonella spp.* tiene que presentar ausencia en 25g. Se recuperó *Salmonella spp.* de 2 superficies de las cajas plásticas (n=10), 1 de las cajas de madera (n=10) y 1 de los tomates provenientes de las cajas plásticas (n=10), las cuales fueron aisladas y confirmadas mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

La norma Peruana 2007, (Decreto No, 349041) para superficies inertes en contacto con alimentos señala que el límite permisible para coliformes totales debe ser $< 1 \text{ UFC/cm}^2$, en el caso de las cajas de madera y plásticas, presentaron $6.97 \pm 0.88 \log_{10} \text{ UFC/100 cm}^2$ y $5.95 \pm 0.62 \log_{10} \text{ UFC/superficie}$, respectivamente indicando que no están por dentro del límite permisible violando esta norma (Pérez 2007). En el caso de *Salmonella* debe presentar ausencia en 1 cm^2 , de acuerdo a los resultados obtenidos en el aislamiento, se identificó que de las 4 cepas aisladas de este patógeno, 3 estaban presentes en las superficies, de la misma forma se incumple esta norma. De acuerdo a los resultados obtenidos es necesario implementar o verificar las condiciones de inocuidad presentes en la central de abastos de Guatemala, de esta forma se podrá asegurar la higiene y prevenir algún brote provocado por algún microorganismo patógeno.

Esta contaminación puede provenir de diversas fuentes y encontrarse en diferentes partes del tomate. Autores reportan conteos altos a la altura de la cicatriz en el tallo (pedúnculo) y corazón central donde son menos vulnerables al cloro. Un serotipo especial, *Salmonella* Baildon, puede sobrevivir en tomates al ser sumergidos en una solución clorada (200 ppm) (Cummis *et al.* 2001). Además, el principal vehículo de transporte es por materia fecal de aves que es transmitido al suelo directamente. De la misma forma para *E. coli* la cual se puede encontrar en el tracto intestinal de aves y rumiantes la cual al estar en contacto directo con el suelo se puede propagar una contaminación hacia las cajas (Heaton y Jones 2008) por no tener un control sobre la inocuidad de las cajas durante la cosecha. Ejemplo de lo anterior la contaminación de las cajas puede ocurrir al no tener una tarima para colocar las cajas del producto evitando tener contacto con el suelo.

Por lo general, estas cajas de madera son apiladas una sobre otra, sin tener cuidado alguno, tanto para el tomate y para la caja son colocadas en el suelo directamente, sin el uso de alguna tarima evitando el contacto directo con las cajas. Si a esto se le suma la deficiente o casi nula higienización de las mismas, aumenta el riesgo de sufrir contaminación tanto de *Salmonella enterica* como de *Escherichia coli*. Es importante destacar el alto nivel de contaminación fecal de los productos y cajas, lo que indicó, que en el país se encuentran aún a bajos niveles de calidad sanitaria presentando un riesgo constante para la población (Kopper *et al.* 2009).

La importancia de tener en cuenta cuales son las posibles fuentes de contaminación se debe a que la contaminación se puede presentar tanto en pre y poscosecha del fruto.

Durante la cosecha ésta fuente de contaminación puede provenir de contacto directo con el suelo, irrigación del mismo y la manipulación por parte de los trabajadores. Los factores que inciden directamente con la contaminación después de la cosecha, son el equipo utilizado para la cosecha, almacenamiento y transporte del tomate. Estudios demuestran que *Salmonella* puede sobrevivir en el suelo de 7 a 25 semanas, dependiendo del tipo de suelo, temperatura y condiciones (Olaimat y Holley 2012).

Microorganismos enteropatógenos pueden sobrevivir >45 horas y < 15 días en tomates cuando se le realizó una aplicación con fungicida contaminado con *Salmonella* y *E. coli* (Guan *et al.* 2005). Para evitar una contaminación es necesario implementar una corrección directa en las actividades de cosecha del tomate, buenas prácticas agrícolas y de manipulación para productos frescos, necesario tener un control de la calidad microbiológica y física del agua de riego, tener control sobre abonos provenientes de excretas animales y trabajadores necesitan tener equipo de protección seguida de una buena higiene personal garantizando la inocuidad de los productos frescos (Olaimat y Holley 2012).

La organización mundial de la salud (2008), recomienda el control de patógenos e incrementar la seguridad de productos frescos durante el pre y poscosecha. Para esto es necesaria la aplicación de métodos para minimizar la posible contaminación por patógenos. Es necesaria la implementación de actividades que protejan el área de cultivo de contaminación fecal, el producto de agua contaminada y mantener la aplicación de buenas prácticas agrícolas. Además, de capacitar al personal encargado de manipular directamente e indirectamente productos frescos.

De acuerdo a la inestabilidad de soluciones cloradas es necesario aplicar o implementar el uso de otros agentes químicos como el ácido peroxiacético en 80 ppm el cual ha sido aprobado por la FDA a esa concentración para asegurar la reducción de hasta 2.6 y 3.8 \log_{10} UFC/g de *Salmonella* y *E. coli*. Lo anterior aseguraría los valores obtenidos en la contaminación cruzada (Cuadro 3) donde los tomates presentaron > 2 \log_{10} UFC/tomate (USDA 2000).

Cuadro 8. Resultados Microbiológicos para las superficies de las cajas y los tomates provenientes de Guatemala durante los 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Análisis Microbiológico	Día	Superficie caja de Madera	Superficie caja de Plástico	Tomate proveniente de Madera	Tomate proveniente de Plástico
		Media ± DE [¥]	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
Coliformes Totales	1	6.97 ± 0.88 ^{A(x)}	5.95 ± 0.62 ^{A(x)}	6.58 ± 0.41 ^{A(x)}	6.75 ± 0.39 ^{A(x)}
	15	6.66 ± 0.68 ^{A(x)}	5.52 ± 0.86 ^{A(x)}	6.44 ± 0.93 ^{A(x)}	6.20 ± 0.86 ^{A(x)}
	CV (%)	13.044	3.212	11.926	10.607
<i>Escherichia coli</i>	1	4.24 ± 1.18 ^{A(x)}	2.83 ± 0.72 ^{A(y)}	2.15 ± 0.63 ^{A(x)}	2.10 ± 0.37 ^{A(x)}
	15	2.98 ± 1.11 ^{A(x)}	< 2.00 ^{A(y)}	2.04 ± 0.67 ^{A(x)}	2.07 ± 0.68 ^{A(x)}
	CV (%)	34.952	22.444	31.723	23.854
Mesófilos aerobios	1	4.86 ± 3.60 ^{B(x)}	5.08 ± 3.17 ^{B(x)}	6.91 ± 0.56 ^{A(x)}	6.59 ± 0.55 ^{A(x)}
	15	8.48 ± 1.29 ^{A(x)}	6.52 ± 0.91 ^{A(x)}	7.36 ± 0.17 ^{A(x)}	6.54 ± 0.65 ^{A(x)}
	CV (%)	19.345	8.005	8.727	8.378
Hongos y Levaduras	1	8.56 ± 2.27 ^{A(x)}	6.58 ± 2.40 ^{A(y)}	5.37 ± 0.55 ^{B(x)}	4.44 ± 0.58 ^{B(y)}
	15	7.34 ± 0.72 ^{A(x)}	5.27 ± 0.63 ^{A(y)}	6.87 ± 0.39 ^{A(x)}	6.58 ± 0.65 ^{A(x)}
	CV (%)	16.102	22.806	8.578	5.281

^{A-B}: medias con diferente letra son estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) dentro de la misma columna (superficies o tomates).

^{x-y}: medias con diferente letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) dentro de la misma fila (a través del tiempo).

CV: Coeficiente de Variación.

¥: Desviación Estándar.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó que la caja plástica, no está libre de sufrir una contaminación por *Salmonella entérica*, siendo un factor de riesgo para las hortalizas y capaz de provocar una enfermedad transmitida por los tomates, tanto caja plástica como madera, se encuentran bajo el mismo riesgo de sufrir una contaminación.
- Se determinó que 10/10 tomates se contaminaron en las cajas, indiferentemente del material que estén fabricadas.
- Debido a las propiedades físicas de la madera vs plástico, se pudo observar que la reducción con un $99.999 \pm 0.0001\%$ se presentó en las cajas plásticas vs de madera, las cuales solo presentó una reducción del $98.378 \pm 1.034\%$, estas reducciones se logran al lavar las cajas con agua, detergente y cloro (200 ppm), ejerciendo acción mecánica durante un periodo de 10 segundos.
- Los tomates procedentes de Guatemala, al ser expuestos a un transporte en camión, desde la frontera de Copán, presentaron 13% de daño, tanto para los tomates presentes en cajas de madera como plásticas. Esto representó un total de pérdida de hasta Q. 343.2 (\$ 44.45 USD) por cada tonelada métrica de tomate por día (1 USD = Q. 7.72, Septiembre 2014). El desarrollo de color fue mínimo, debido a que, en su mayoría este tomate presentó un grado de maduración del 100% de color. La calidad microbiológica del tomate está por arriba de los límites legales permisibles, indicando fallas en el sistema de buenas prácticas agrícolas como de higiene.

5. RECOMENDACIONES

- Cambiar totalmente las cajas de madera por las cajas plásticas y la aplicación de lavado con agua, detergente, solución clorada (200 ppm), antes y después de utilizar las cajas, asegurando mayor calidad microbiológica del fruto y previniendo futuros brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos.
- Se recomienda evaluar otro diseño de cajas plásticas, la cual presente menor porcentaje de calados (orificios) y realizar conjuntamente análisis físicos, químicos y microbiológicos, para tomates con diferentes grados de maduración, comparándola con las Cestas One Way.
- Se recomienda estandarizar los pesos de las cajas (kg o lb), garantizando la uniformidad del peso de la caja. Siendo más justos evitando una pérdida económica para los productores.
- Capacitar al personal encargado de la manipulación directa e indirecta del tomate, durante pre y poscosecha en Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura y Procesos Estandarizados de Sanitización.

6. LITERATURA CITADA

Abban, S, M. Jakobssen y L. Jespersen. 2012. Attachment behavior of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella* Typhimurium P6 on food contact surfaces for food transportation. *Food Microbiology*. 31, 139-147.

Abrishami, S.H., B.D. Tall, T.J. Bruursema, P.S. Epstein y D.B. Shah. 1994. Bacterial Adherence and Viability on cutting board surfaces. *Food Safety*. 14, 153-172.

Adelantado, C., E.L. Arosemena, M.A. Calvo, L.M. Madeu, M.A. Martín, G. Ordoñez, F. Ponsa, M. Pontes, E.F. Rodríguez y D. Zekaria. s.f. *La Salmonella* de Actualidad desde Siempre. Barcelona España, Editorial Calier, Real Escuela de Avicultura. Pág. 15-19

Ali, S., K. Nakano y S. Maezawa. 2004. Combined effect of heat treatment and modified atmosphere packagin on the color development of cherry tomato. *Postharvest Biology and Technology*. 34. 113-116.

Ames, B. M. 1983. Dietary carcinogens and anticarcionogens: Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*. 221, 1256-1263.

Andrew, W., A. Jacobson y T. Hammack. 2011. *Bacteriological Analytical Manual*, Food and Drug administration. Capítulo 5: *Salmonella* (En línea). Consultado 18 de Agosto 2014. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>

Barker, J., Naeeni, M. y Bloomfield, S.F. 2003. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. *Applied Microbiology*. 95, 1351-1360.

Batu, A. 2004. Determination of aceptable firmness and color values of tomatoes. *Food Engineering*. 61, 471-475.

Bell, C., J. Hooker, Hyris, Kyriakides y R. Mills. 1997. Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today*. 11(3):137-176.

Beuchat, L.R. y Jee-Hoon, R. 1997. Produce Handling and Processing Practices. *Emerging Infectious Diseases*. 3(4):459-465.

Casierra-Posada, F. y Aguilar-Avenidaño, E. 2008. Calidad en Frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cosechado en diferentes estados de madurez. *Agronomía Colombiana*. 26(2):300-307.

Cantwell, M., Nie, X., Hong, G. 2009. Impact of Storage Conditions on Grape Tomato Quality. *Postharvest Symposium*. 8, 12:1-8.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. Outbreaks of *Salmonella* infections Associated with Eating Roma Tomatoes- United States and Canada, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 54(13):325-328.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. Making food Safer to Eat. (En línea). Consultado 24 de Octubre de 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/FoodSafety/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Typhoid Fever. (En línea). Consultado 22 de Mayo de 2014. Disponible en: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/#top

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2014. *Salmonella*. (En línea). Consultado 30 de Mayo 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/>

Cumminis, K., E. Barret, J.C. Mohle-Boetani, J.T. Brooks, J. Farrar, T. Hunt, A. Fiore, K. Komatsu, S.B. Wernwer y L. Slutsker. 2001. Un brote en varios estados de *Salmonella enterica* serotipo Baildon asociado con tomates crudos domésticos. *Emerging Infectious Diseases*. 7(6):1046-1048.

De Jong, A.E.I., L. Verhoeff-Bakkenes, M.J. Nauta y R. de Jonge. 2008. Cross-contamination in the kitchen: effect of hygiene measures. *Applicable Microbiological*. 105, 615-624.

De Vere, E. y D. Purchase. 2007. Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. *Food Microbiology*. 24, 425-430.

FASAGUA. 2014. Precios, Federación de Asociaciones Agrícolas de Guatemala. 2005-2011 (En línea) Consultado 6 de Septiembre del 2014, Disponible en: <http://www.fasagua.com/node/46>

Ferratto, J., I.T. Firpo y R. Rotondo. 2010. Las pérdidas poscosecha del tomate. *Agromensajes de la Facultad*. 28

Food and Agriculture Organization (FAO). 2006. Tomate (*Lycopersicon esculentum*). (En línea). Fichas técnicas. Productos Frescos y Procesados. Consultado 27 de Mayo 2014. Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/tomate.htm#B1

Food and Drug Administration (FDA). 2013a. Team Tomato Fights Contamination. (En línea). Consultado 22 de Mayo 2014. *Consumer Health Information* 1-3 Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM359832.pdf>

Food and Drug Administration (FDA). 2013b. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. Chapter Pathogenic Bacteria (Gram-negative bacteria) p 9-13

Gould, H. L., Walsh, K. A., Vieira, A. R., Herman, K., Williams, I. T., Hall, A. J., Cole, D. 2013. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks-United States, 1998-2008. Morbidity and Mortality Weekly Report, Center for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance Summaries. 62(2):1-34

Giovanelli, G., Lavelli, V., Peri, C., Nobili, S. 1999. Variation in antioxidant compounds of tomato during vine and post-harvest ripening. Science of the Food and Agriculture. 79, 1538-1588.

Guan, T.Y., Blank, G., Holley, R.A. 2005. Survival of pathogenic bacteria in pesticide solutions and treated tomato plants. Food Protection. 68, 296-304.

Heaton, J.C. and Jones, K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review. Applied Microbiology. 613-626.

Hindle C. s.f. Polypropylene (PP) (En línea). Consultado 20 de octubre de 2014. Disponible en <http://www.bpf.co.uk/plastipedia/polymers/pp.aspx#properties>

Jay, J.M., M.J. Loessner y D.A. Golden. 2005. Modern Food Microbiology. Seventh Edition, San Marcos, California, Estados Unidos, Springer. 751 p

Jarquín-Enríquez, L., Mercado-Silva, E.M., Maldonado, J.L., López-Baltazar, J. 2013. Lycopene content and color index of tomatoes are affected by the greenhouse cover. Scientia Horticulturae. 155, 43-48.

Jensen, D.A., L.M. Friedrich, L.J. Harris, M.D. Danyluk, y D.W. Schaffner. 2013. Quantifying transfer rates of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 between fresh-cut produce and common kitchen surfaces. Food Protection. 76(9):1530-1538.

Kader, A.A., P.E. Read, y J.E. Preece. 1993. The Biology of horticulture: An Introductory Textbook, New York: John Wiley and Sons, Inc. p 357-377.

Konica Minolta. 2003. Precise Color Communication. Color Terms. Part IV. Consultado 1 de Octubre 2014. Disponible en: <http://www2.konicaminolta.eu/eu/Measuring/pcc/en/part3/01.html>

Kopper, G., G. Calderón, S. Schneider, W. Domínguez y G. Gutiérrez. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. In: C., Rosell (ed) Informe Técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria, Roma. p 1- 155.

Mendoça, V., J. Gonçalves, C. Viana, T. Braga, L. dos Santos y J. Paes de Almeida. 2012. Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. Food Microbiology. 30, 453-456

Moore, G., I.S. Blair y D.A. Macdowell. 2007. Recovery and Transfer of *Salmonella* Typhimurium from Four Different Domestic Food Contact Surfaces. Food Protection. 70(10):2273-2280

Neal, J. A., M. Márquez-González, E. Cabrera-Díaz, L.M. Lucia, C.A. O'Bryan, P.G. Crandall, S.C. Ricke, y A. Castillo. 2012. Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. Food Research International. 45(2):1123-1128.

Sosa, M. A. 2013. Guía para el Reconocimiento de Enfermedades en el cultivo de Tomate. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) 1° Edición. El Colorado, Argentina. 31p.

Santos-Sánchez, N.F., R. Valadez-Blanco, M.S. Gómez-Gómez, A. Pérez-Herrera y R. Salas-Coronado. 2012. Effect of rotating tray on antioxidant components, color and rehydration ratio of tomato saladette slices. LWT-Food Science and Technology. 46, 298-304.

Odriozola-Serrano, I., R. Soliva-Fortuny y O. Martín-Belloso. 2008. Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. LWT-Food Science and Technology. 41, 217-226.

Olaimat, A.N. y Holley R.A. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiology. 32, 1-19.

Osorio Rodríguez, I.C. 2014. Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en superficies de cajas de madera y superficies de cestas plásticas utilizadas para el transporte y almacenamiento de tomate pera (*Solanum lycopersicum*). Tesis Ing. Agroindustria Alimentaria. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 48 p.

Pérez, A. 2007. Superficies Inertes, Norma Peruana decreto 349041. Normas Legales, El Peruano. (En línea), Consultado 29 de Octubre de 2014. Disponible en: http://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas_Legales/alimentos/RM_461_2007.pdf

Ravishankar, S., L. Zhu y D. Jaroni. 2012. Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. Food Microbiology. 27, 791-194

Reina G, J.C. Guzmán Torres y J.M. Sánchez Peña. 1998. Manejo Poscosecha y Evaluación de la Calidad de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) que se comercializa en la ciudad de Neiva. Universidad SurColombiana, Facultad de Ingeniería. p 127

Swanson, K.M.J., R.L. Petran, J.H. Hanlin. 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, (Pouch Downes and Ito Eds). 4° Edición. Washington, D.C. American Public Health Association, 53-62 p

Stinco, C.M., F.J. Rodríguez-Pulido, M.L.E. Escudero-Gilte, B. Gordillo, I.M. Vicario y A.J. Meléndez-Martínez. 2013. Lycopene isomers in fresh and processed tomato products: Correlations with instrumental color measurements by digital image analysis and spectroradiometry. *Food Research International*. 50, 111:120.

United States Department of Agricultural, USDA. 2000. Chemical used in washing or to assist in the peeling of fruits and vegetables, Code federal regulations 21 CFR 173.315, (En línea), Consultado 19 de Octubre de 2014, Disponible en: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2002-title21-vol3/xml/CFR-2002-title21-vol3-sec173-315.xml>

Wang, H., Ryser, E.T. 2014. *Salmonella* Transfer during Pilot Plant Scale Washing and Roller Conveying of Tomatoes. *Food Protection*. 77(3):380-387.

World Health Organization. 2003. WHO fruit and vegetable promotion initiative-a meeting report. Geneva, 25-27 August 2003. World Health Organization, Geneva

World Health Organization. 2008. WHO. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs, Microbiological risk assessment series, Meeting Report. 20, Abener Appia CH-1211 Geneva 27, Switzerland. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jemra/FFV_2007_Final.pdf

6. ANEXOS



Anexo 1. Condiciones poco insalubres de almacenamiento de las cajas de madera, tomadas en la central de abastos de Guatemala (CENMA Sur).
Fotografía tomada por: Mayra Márquez González, Julio 2014.



Anexo 2. Condiciones de cosecha de tomate, exponiendo cajas con producto directamente al suelo sin tener una tarima para evitar contacto con el mismo, tomada en Guatemala *Fotografía tomada por:* Mayra Márquez González, Julio 2014.



Anexo 3. Tomate con presencia de arrugamiento en la epidermis por pérdida de agua.
Fotografía tomada por: Marco A. Pérez Romero, Agosto 2014.



Anexo 4. Tomates con crecimiento de hongos ubicados en cajas de madera, almacenados en cajas de madera.
Fotografía tomada por: Marco A. Pérez Romero, Agosto 2014.



Anexo 5. Superficie con crecimiento de hongos ubicada en cajas de madera.
Fotografía tomada por: Marco A. Pérez Romero, Agosto 2014.