



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

**SOBREVIVENCIA, CRECIMIENTO E INTERNALIZACIÓN DE
Salmonella Typhimurium Y SU ASOCIACIÓN CON *Rhizopus*
EN MELÓN CANTALOUPE BAJO ATMÓSFERAS
CONTROLADAS**

PATRICIA LANDA SALGADO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2007

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para la realización de mis estudios de postgrado.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano, por su paciencia y su apoyo.

A mis asesores: Dr. Joel Corrales García, Dr. Gustavo Mora Aguilera y el Dr. Cristóbal Chaidez Quíroz, por su colaboración, ayuda y comentarios.

Al Sr. Adrián Paredes García por su apoyo durante el establecimiento, muestreo y procesamiento de muestras.

Al M.C. Natanael Magaña Lira, por su apoyo con el análisis de resultados.

A INFRA S.A de C.V. por su colaboración en este trabajo.

DEDICATORIA

El esfuerzo depositado en este trabajo lo dedico a:

Dios: Por su infinita misericordia y por la vida que me ha dado.

Mi madre: Evelia Salgado Sandoval, por su apoyo, su amor y sus oraciones.

Mis hermanos: Claudia, Felipe, Diana y Cesar por su compañía, amistad y por creer en mí.

CONTENIDO		
ÍNDICE DE CUADROS		6
ÍNDICE DE FIGURAS		8
ANEXOS		
Medios de cultivo		11
Cuadros		12
Figuras		13
RESUMEN GENERAL		16
GENERAL ABSTRACT		17
I. MARCO DE REFERENCIA		18
1.1 Melón Cantaloupe		18
1.1.1 Importancia económica		18
1.1.2 Índices de calidad de fruto		19
1.1.3 Condiciones óptimas de manejo		20
1.1.4 Microorganismos postcosecha en melón Cantaloupe.		21
1.2 <i>Salmonella</i>		21
1.2.1 Descripción y taxonomía		21
1.2.2 Hábitat y fuentes de contaminación		23
1.2.3 Brotes epidemiológicos		23
1.2.4 Control químico, físico y biológico		25
1.3 Asociaciones metabióticas		28
II. SOBREVIVENCIA E INTERNALIZACIÓN DE <i>Salmonella</i> Typhimurium EN MELÓN CANTALOUPE		31
2.1 Introducción		33
2.2 Hipótesis		33
2.3 Objetivo		33
2.4 Materiales y métodos		33
2.4.1 Inducción de resistencia y caracterización de cepas		33
2.4.2 Adquisición y preparación de melones		35
2.4.3 Establecimiento de cámaras con AC		36
2.4.4 Preparación de inóculo e inoculación de melones		37
2.4.5 Muestreo y análisis microbiológico		38
2.4.6 Análisis estadístico		40
2.5. Resultados y discusión		40
2.5.1 Cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium resistentes a kanamicina		40
2.5.2 Relación entre densidad óptica y unidades formadoras de		40

colonias.	
2.5.3 Supervivencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium bajo AC ₁ y aire en melones Cantaloupe.	41
2.6 Conclusiones	47
III. EFECTO DE <i>Rhizopus</i> NATURALMENTE ASOCIADO A MELÓN CANTALOUPE EN LA INTERNALIZACIÓN DE <i>Salmonella</i> Typhimurium	48
3.1 Introducción	48
3.2 Hipótesis	50
3.3 Objetivos	50
3.4 Materiales y métodos	51
3.4.1 Aislamiento de <i>Rhizopus</i> sp.	51
3.4.2 Preparación de inóculo e inoculación de melones	51
3.4.3 Determinación de textura y pH de melones Cantaloupe	53
3.4.4 Muestreo y procesamiento de tejido inoculado	55
3.4.5 Análisis estadístico	56
3.5 Resultados y discusión	56
3.5.1 Supervivencia, crecimiento e internalización de <i>Salmonella</i>	56
3.5.2 Supervivencia y crecimiento de <i>Rhizopus</i>	57
3.5.3 Textura, pH y °Brix	57
3.6 Conclusiones	60
IV. LITERATURA CITADA	61

ÍNDICE DE CUADROS		Página
Cuadro 2.1	Datos de densidad óptica (560 nm) de cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC23564, en CST, incubadas a 37°C sin agitación.	71
Cuadro 2.2	Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> crecida en CST por 18 h a 37°C sin agitación.	71
Cuadro 2.3	Relación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) con la densidad óptica ^b de la suspensión bacteriana. Los datos corresponden a la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> crecida en CST por 18 h a 37°C sin agitación.	72
Cuadro 2.4	Valores de los parámetros de la forma de curva de crecimiento (C) y del estimador de velocidad de crecimiento (B) entre la cepa nativa de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC23564 y cinco cepas resistentes a kanamicina. Los datos se analizaron con el método de Weibull.	72
Cuadro 2.5	Crecimiento, sobrevivencia e internalización de la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> en melón Cantaloupe ^a , durante el almacenamiento en AC ₁ y aire a 4.2°C (Prueba preeliminar).	73
Cuadro 2.6	Sobrevivencia de la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> en la corteza de melón Cantaloupe ^a , durante el almacenamiento en AC ₁ ^b y aire ^c a 4.2°C.	74
Cuadro 2.7	Sobrevivencia de la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> en corteza de melón Cantaloupe ^a , durante el almacenamiento en AC ₂ ^b y aire ^c a 3.8°C.	75
Cuadro 2.8	Sólidos soluble totales (°Brix) en melones Cantaloupe, almacenados en AC y aire a 4°C, registrados en un refractómetro ATAGO® manual.	76
Cuadro 3.1	Sobrevivencia de la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> en la corteza de melón Cantaloupe, inoculado con <i>Rhizopus</i> ^a sp.,	77

durante el almacenamiento en AC₂^b y aire^c a 3.8°C.

Cuadro 3.2 Sólidos solubles totales (°Brix), pH y textura en melones Cantaloupe, previamente inoculados con *Rhizopus* sp., y mantenidos bajo AC₂^a y aire^b. 78

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 2.1 Establecimiento de cámara con atmósfera controlada (AC) y aire para almacenar melones en frigorífico (UACH). **A**, Tanques con mezcla estándar de AC (3-5% O₂, 12-15% CO₂, y 85-80% N₂) y con aire comprimido (aire) (21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂); **B**, Humidificador con mezcla de glicerol-agua (8:2); **C**, Tablero de alimentación de flujo de AC y aire; y **D**, Cubeta con tapa y mangueras rígidas de entrada y salida de gases (cámara) en AC o aire; **E**, Multiconector para concentrar la mezcla y el aire de salida de las cámaras. 80
- Figura 2.2 Muestreo de tejido de melón almacenado en atmósfera controlada (AC) o aire. **A**, Melón en cámara previo al muestreo de tejido; **B**, Muestreo de tejido de melón con sacabocado de 5.8 cm de diámetro; **C**, Corte de tejido de corteza y tejido a diferentes profundidades; **D**, Bolsa Ziploc® estéril con muestra de tejido; y **E**, Hielera para transportar en hielo bolsas con tejido. 81
- Figura 2.3 Procesamiento de muestras de melón para la detección y aislamiento de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium*. **A**, Bolsa con corteza de melón y APB a 0.1% para recuperación de células mediante lavado tejido; **B**, Dilución de suspensión de lavado de tejido en APB a 0.1 %; **C**, Dispersión de suspensión de lavado AEH-Km⁵⁰; **D**, Cajas Petri inoculadas en incubadora a 37°C; **E**, Cajas con crecimiento de la cepa St-3^{Km50} de 48 h. 82
- Figura 2.4 Aislamiento en Agar Entérico Hektoen + kanamicina (50 mg/mL) de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* de melón Cantaloupe, inoculado con 8.8 log₁₀ UFC, y almacenado en AC₂ (5% O₂, 15% CO₂, y 85% N₂) a 4°C por 96 h. Cajas con y sin crecimiento de colonias en las que se depositaron 100 µL de **(A)** Suspensión de lavado de corteza y **(B)** Tejido interno (5 83

- mm de profundidad).
- Figura 2.5 Crecimiento de cepas de *Salmonella* Typhimurium en caldo soya tripticaseína a 37°C sin agitación. Donde: *Salmonella* corresponde a *S. Typhimurium* ATCC2356; y, St-1^{Km50}, St-2^{Km50}, St-3^{Km50}, St-4^{Km50} y St-5^{Km50} corresponden a cepas resistentes a kanamicina (50µg/mL). 84
- Figura 2.6 Proporción entre densidad óptica y tiempo. Los datos corresponden al promedio de cinco repeticiones. Las cepas de *S. Typhimurium* se incubaron en CST con Km sin agitación a 37°C por ocho horas. 85
- Figura 2.7 Sobrevivencia de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* en melón Cantaloupe inoculado con 7.5 log₁₀ UFC, almacenado en AC (3% O₂ y 12% CO₂, 85% N₂, línea-rombos) o aire (línea-cuadros) a 4.2°C. **A**, Valores de UFC registrados en corteza; **B**, en tejido de 5 mm; y, **C** en tejido de 10 mm de profundidad, respectivamente. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones, cada repetición constó de un melón. 86
- Figura 2.8 Sobrevivencia de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe almacenados a 3.7°C y 98.8% de HR. Los valores se registraron en melones almacenados en: **A**, AC₁ (3% O₂ y 12% CO₂, 85% N₂, línea-cuadros) o aire (línea-círculos); y **B**, AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂, línea-cuadros) o aire (línea continua-círculos). Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos; cada uno constó a su vez de tres repeticiones. En **A** los melones se inocularon con 7.7 log₁₀ UFC y en **B** con 8.8 log₁₀ UFC, en promedio. Las barras representan el error estándar entre los valores. 87
- Figura 3.1 Texturómetro utilizado para medir textura de melones Cantaloupe inoculados con *Rhizopus* sp., y cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium*, almacenados bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 88

80% N₂) y aire. **B**, Potenciómetro digital con electrodo tipo aguja utilizado para medir pH del punto de inoculación sobre la superficie de melón Cantaloupe. Las mediciones de pH se hicieron después de medir la textura.

- Figura 3.2 Aislamiento de *Rhizopus* sp., de 48 h de crecimiento en PDA acidificado. El hongo se recuperó de la superficie de melón Cantaloupe, después de 192 h de incubación a 3.2°C bajo AC₂. 89
- Figura 3.3 Sobrevivencia de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe, previamente inoculados con 6.15 X 10⁴ esporangioesporas, y almacenados a 3.2°C y HR 99.6% bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂, línea-cuadros) o aire (línea-círculos). Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos; cada experimento constó a su vez de tres repeticiones. Los melones se inocularon con 8.6 log₁₀ UFC en promedio. Las barras representan el error estándar entre valores. 90

ANEXOS

Medio de Cultivo	Pagina
Agar Soya Trypticaseína con kanamicina (AST-Km50)	92
Agar entérico Hektoen con kanamicina (AEH-Km50)	92
Agua Peptonada Buferada a 0.1%	92
Medio PDA acidificado	92
Preparación de solución stock de kanamicina	93
Preservación de cepas de <i>Salmonella</i> en glicerol	93
Caldo Soya Trypticaseína (CST) con Kanamicina (Km) a diferentes concentraciones	94

	Cuadros	Página
Cuadro 1.1	Índice respiratorio de Melón Cantaloupe a diferente temperatura de almacenamiento.	96
Cuadro 1.2	Composición química del aire.	97
Cuadro 1.3	Ejemplos de brotes de enfermedades causadas por diferentes serotipos de <i>Salmonella</i> asociados al consumo de productos hortofrutícolas frescos.	98
Cuadro 2.1	Sólidos soluble totales (°Brix) en melones Cantaloupe, almacenados en AC ₁ ^a y aire ^b a 4.2°C, registrados en un refractómetro ATAGO® manual.	99
Cuadro 2.2	Sólidos soluble totales (°Brix) en melones Cantaloupe, almacenados en AC ₂ y aire a 3.2°C, registrados en un refractómetro ATAGO® manual.	100
Cuadro 3.1	Sólidos solubles (°Brix), pH y textura de melones Cantaloupe inoculados con <i>S. Typhimurium</i> + <i>Rhizopus</i> sp y sin inocular, almacenados en AC ₂ ^a y aire ^b a 3.8 °C. Se indican las UFC de <i>Salmonella</i> obtenidas y la recuperación del hongo después del almacenamiento, al tiempo indicado. Cada 48 h se analizaron tres melones.	101
Cuadro 3.2	Sólidos solubles (°Brix), pH y textura de melones Cantaloupe inoculados con <i>S. Typhimurium</i> + <i>Rhizopus</i> sp y sin inocular, almacenados en AC ₂ ^a y aire ^b a 3.8 °C. Se indican las UFC de <i>Salmonella</i> obtenidas y la recuperación del hongo después del almacenamiento, al tiempo indicado. Cada 48 h se analizaron tres melones y HR.	102

	Figuras	Página
Figura 2.1	Sobrevivencia de la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> en la superficie de melones Cantaloupe almacenados a 4.2°C y 99.28% de HR. Los valores se registraron en melones almacenados bajo AC ₁ (3% O ₂ y 12% CO ₂ , 85% N ₂ , línea-rombos) o aire (línea-cuadros). A y B representan los valores obtenidos en el primer y segundo experimento, cada experimento constó de tres repeticiones. En A los melones se inocularon con 7.7 log ₁₀ UFC y en B con 8.8 log ₁₀ UFC, en promedio. Las barras representan el error estándar entre valores.	104
Figura 2.2	Sobrevivencia de la cepa St-3 ^{km50} de <i>S. Typhimurium</i> en la superficie de melones Cantaloupe almacenados a 3.2°C y 98.3% de HR. Los valores se registraron en melones almacenados bajo AC ₂ (5% O ₂ y 15% CO ₂ , 80% N ₂ , línea-rombos) o aire (línea-cuadros). A y B representan los valores obtenidos en el primer y segundo experimento, cada experimento constó de tres repeticiones. En A los melones se inocularon con 7.7 log ₁₀ UFC y en B con 8.8 log ₁₀ UFC, en promedio. Las barras representan el error estándar entre valores.	105
Figura 2.3	Temperatura (cuadros) y humedad relativa (rombos) promedio dentro de las cámaras donde se colocaron los melones Cantaloupe. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada seis h por ocho días. En A se muestran los valores promedio registrados en cámaras con AC ₁ (3% O ₂ y 12% CO ₂ y 85% de N ₂); y en B , los valores promedio registrados en cámaras con	106

AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂ y 80% de N₂). Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos.

- Figura 2.4 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de la hielera para transportar en hielo bolsas con tejido de melón Cantaloupe, almacenado bajo AC₁ (3% O₂ y 12% CO₂, 85% N₂) a 3.8 °C y 99.3% de HR. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada 15 min. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos. T₁, T₂, T₃, y T₄, y HR₁, HR₂, HR₃ y HR₄, representan los valores promedio obtenidos de los muestreos realizados a las 48, 72, 144 y 192 h, en cada experimento. 107
- Figura 2.5 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de la hielera para transportar en hielo bolsas con tejido de melón Cantaloupe, almacenados bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂) a 4°C y 98.3% de HR. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada 15 min. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos; y, T₁, T₂, T₃, y T₄, y HR₁, HR₂, HR₃ y HR₄, los valores promedio registrados de los muestreos realizados a las 48, 72, 144 y 192 h, en cada experimento. 108
- Figura 3.1 Sobrevivencia de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe, previamente inoculados con 6.14 X 10⁴ esporas, y almacenados a 3.8°C bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂, línea-rombos) o aire (línea-cuadros). A y B representan los valores obtenidos en el primer y segundo experimento 109

respectivamente, cada experimento constó a su vez de tres repeticiones. Los melones se inocularon con $8.6 \log_{10}$ UFC en promedio. Las barras representan el error estándar entre los valores.

Figura 3.2 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de las cámaras donde se colocaron los melones Cantaloupe inoculados con *S. Typhimurium* y *Rhizopus* sp., y mantenidos bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂ y 80% de N₂). Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada seis h por ocho días. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos y, T₁, T₂, y T₃; y HR₁, HR₂ y HR₃, los valores promedio registrados de los muestreos realizados a las 48, 72 y 144 h, en cada experimento. 110

Figura 3.3 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de la hielera para transportar en hielo bolsas con tejido de melón Cantaloupe inoculados con *S. Typhimurium* y *Rhizopus* sp mantenidos bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N,) a 3.8°C y 99.6% de HR. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada 15 min. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos y, T₁, T₂, y T₃; y HR₁, HR₂ y HR₃, los valores promedio registrados de los muestreos realizados a las 48, 72 y 144 h, en cada experimento. 111

SOBREVIVENCIA, CRECIMIENTO E INTERNALIZACIÓN DE
Salmonella Typhimurium Y SU ASOCIACIÓN CON *Rhizopus* EN MELÓN
CANTALOUPE BAJO ATMÓSFERAS CONTROLADAS

Patricia Landa Salgado, MC.

Colegio de Postgraduados, 2007

Estudios epidemiológicos reportan a Cantaloupes mexicanos como responsables de algunos brotes de salmonelosis. Se ha demostrado que el crecimiento de enteropatógenos como *Salmonella* se ve favorecido cuando se asocia con hongos y bacterias pectinolíticas. Actualmente ningún desinfectante es 100% efectivo para eliminar *Salmonella* de la corteza de melón, por lo que se han buscado varias alternativas para llevar a cabo su control. Se tiene conocimiento de que las atmósferas controladas (AC), utilizadas para incrementar la vida postcosecha de varios productos, pueden inhibir el desarrollo de algunos fitopatógenos y patógenos de humanos. Este trabajo tuvo como objetivo analizar la sobrevivencia, el crecimiento y la capacidad de internalización de *S. Typhimurium* sola y asociada con *Rhizopus* en melón Cantaloupe, durante el almacenamiento en frío en AC. Los resultados demostraron que *S. Typhimurium* puede sobrevivir en la superficie de melón bajo las atmósferas **AC₁** (3% O₂ y 12% CO₂ y 85% N₂); **AC₂** (5% O₂, 15% CO₂ y N₂) y **aire** (21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂) hasta por 192 h a 3.7 °C, sola o asociada con *Rhizopus* sp. La bacteria tuvo un decremento de 3.2, 4.0 y 5.3 log₁₀ en AC₁, AC₂ y aire, respectivamente, en la población. Bajo las mismas condiciones (tipo de atmósfera y temperatura) no se registró crecimiento ni internalización de *S. Typhimurium* en melón, con o sin *Rhizopus* sp., en ninguna de las atmósferas probadas. Los grados Brix (11.41), la textura (671.15 g/cm) y el pH (6.38) de los melones se mantuvieron sin cambio significativo durante el periodo de almacenamiento bajo las AC evaluadas.

Palabras clave: *Salmonella* Typhimurium, melón cantaloupe, atmósferas controladas.

SURVIVAL, GROWTH AND INTERNALIZATION OF
Salmonella Typhimurium AND ITS ASOCIATION WITH *Rhizopus* ON CANTALOUPE
MELON UNDER CONTROLLED ATMOSPHERES

Patricia Landa Salgado, MC.

Colegio de Postgraduados, 2007

Epidemiological studies report Mexican Cantaloupes as responsible for some salmonellosis outbreaks. It has been demonstrated that the growth of *Salmonella* increases when it is associated with fungi and pectinolytic bacteria. Currently, no disinfectant is 100% effective in eliminating *Salmonella* from the skin of the melon; therefore many investigators have been researching several alternatives for its control. Controlled atmospheres (CA), used to increase the post-harvest life of several products, can inhibit the development of some phytopathogens and human pathogens. The objective of this work was to analyze the survival, growth, and internalization capability of *S. Typhimurium*, individually and associated with *Rhizopus*, on Cantaloupe melon, during cold storage in CA. The results demonstrated that *S. Typhimurium* can survive on the melon skin in atmospheres CA₁ (3% O₂, 12% CO₂, and 85% N₂); CA₂ (5% O₂, 15% CO₂, and N₂); and air (21% O₂, 0.03% CO₂, and 75% N₂) for up to 192 hr at 3.7 °C, alone or associated with *Rhizopus* sp. The bacterium had a decrease of population of 3.2, 4.0, and 5.3 log₁₀ in CA₁, CA₂, and air, respectively. Under the same conditions (type of atmosphere and temperature), no growth or internalization of *S. Typhimurium* in melon was registered, with or without *Rhizopus* sp., in the atmospheres tested. The Brix degrees (11.41), the texture (671.15 g_f/cm), and pH (6.38) of melons remained without significant change during the storage period in the evaluated CA.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, Cantaloupe melon, controlled atmospheres.

I. MARCO DE REFERENCIA

1.1 Melón Cantaloupe

1.1.1 Importancia económica

Desde principios del siglo XX, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), el melón (*Cucumis melo* L.), ha sido un producto generador de importantes divisas para el país, así como importante fuente de empleos y utilidades para los productores mexicanos. Actualmente ocupa el tercer lugar como producto agropecuario en la captación de divisas por exportación (Agrored, 2006).

En los años sesenta el melón Cantaloupe mexicano tuvo una gran demanda tanto del mercado nacional como del internacional pero ésta decreció en el 2002 por problemas de inocuidad y previamente por fuertes problemas fitosanitarios como las enfermedades virales. A partir de entonces Cantaloupes provenientes de diversos países empezaron a ganar los espacios en el mercado internacional, y a convertirse en una fuerte competencia para el melón mexicano. Como ejemplo, cabe señalar a los Cantaloupes provenientes de Costa Rica, quienes sustituyeron al melón mexicano en el mercado estadounidense, importante país importador de este producto. También destacan en el mercado internacional los provenientes de China, Turquía, Estados Unidos de América (USA por sus siglas en inglés), España e Irán, los cuales conjuntamente representan el 60% de la producción mundial (Infoaserca, 2000). En México los estados de Durango, Sonora, Michoacán, Coahuila y Guerrero, son quienes en conjunto suman el 60% de la producción nacional (Infoaserca, 2000).

Taxonomía y descripción del fruto

El melón Cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) pertenece a la familia de las Cucurbitáceas cuyos frutos son precoces (85-95 días), esféricos, ligeramente aplastados, de peso entre 700 g y 1200 g, de costillas poco marcadas, piel fina y pulpa naranja, dulce (11-15 °Brix) y de aroma característico (Kader, 2002).

1.1.2 Índices de cosecha y calidad de fruto

El fruto se cosecha cuando el tallo, en la zona de abscisión, se desprende fácilmente y los sólidos solubles oscilan entre 12 y 14 °Brix. También se considera, el color de la piel el cual cambia de verde a amarillo, una vez que el fruto ha alcanzado la plena madurez (Infoaserca, 2000).

Las normas de calidad del mercado internacional indican que los melones Cantaloupe deben ser dulces, estar enteros, sanos, limpios, exentos de humedad exterior anormal, sin olores ni sabores extraños, de forma y color característico de acuerdo a la variedad, sin manchas por el sol, pedúnculos cercenados, heridas, lesiones o deformaciones, y de aspecto fresco (Kader, 2002).

El grado de madurez, la coloración del fruto, el espesor de la pulpa, el diámetro polar y ecuatorial son parámetros importantes para determinar la calidad comercial del melón Cantaloupe. Los grados Brix, es decir, la cantidad de sólidos solubles mínimos, requeridos son de 8°. Los diámetros polar y ecuatorial, cuyas dimensiones indicaran el calibre del embalaje, oscilan entre los 9, 12, 15, 18, 23 y 30 melones por caja. En este último parámetro mientras más grande sea el melón, menor número de melones se empacan en la misma caja (Infoaserca, 2000).

1.1.3 Condiciones óptimas de manejo

Temperatura.- El melón Cantaloupe debe mantenerse en condiciones de frío óptimas durante toda la cadena de producción y comercialización para conservar la calidad del producto. Las condiciones óptimas de temperatura varían entre 2.2°C y 5°C pudiéndose conservar el producto de 21 a 25 días con poca reducción en la calidad sensorial (Kader, 2002). Temperaturas debajo de este intervalo pueden ocasionar daños por frío en el fruto después de varios días o cuando el fruto se expone posteriormente a temperaturas mayores (García-Sahagún *et al.*, 2005). Cuando el melón se conserva bajo temperaturas de refrigeración la respiración del fruto disminuye y por consiguiente la vida postcosecha del producto se incrementa (Cuadro 1.1 del Anexo 2) (Kader, 2002; Suslow *et al.*, 2007).

Humedad relativa.- La humedad relativa (HR) es esencial para maximizar la calidad postcosecha y evitar la desecación del melón. La HR óptima de almacenamiento se encuentra entre 90% y 95%. Lo anterior es especialmente importante ya que a través de la cáscara y de las lesiones por daños físicos ocurre una considerable pérdida de agua (IICA 2007; Infoaserca 2000).

Atmósfera de almacenamiento.- Generalmente el melón Cantaloupe se maneja bajo atmósfera normal de aire (Cuadro 1.2 del Anexo 2); sin embargo, en las últimas décadas se ha manejado también, aunque no a gran escala comercial, bajo atmósferas controladas (AC). Una atmósfera controlada es una atmósfera en la que se ha modificado la concentración normal de oxígeno (O₂) y la del dióxido de carbono (CO₂) e implica un control preciso de estos gases (Wills, 1980). Los beneficios del almacenamiento o transporte del melón bajo AC son moderados. En períodos

prolongados de tránsito, de 14 a 21 días, los beneficios son: retraso de la maduración, disminución de la respiración, mantenimiento de la calidad sanitaria del fruto al inhibir pudriciones de la superficie por microorganismos, e incremento de la vida postcosecha del fruto. Las condiciones óptimas de manejo del melón Cantaloupe bajo AC son: 3% O₂ y 10% CO₂ a 3°C; aunque puede tolerar concentraciones de 2% O₂ y 15% CO₂. Condiciones extremas de almacenamiento bajo estos gases (<1% O₂, > 20% CO₂) pueden alterar la maduración normal del producto y causar sabores y olores desagradables (Kader, 2002; Suslow *et al.*, 2007).

1.1.4 Microorganismos postcosecha en melón Cantaloupe

Normalmente los microorganismos postcosecha presentes en melón son los fitopatógenos, es decir patógenos de plantas; sin embargo, también se pueden encontrar algunos patógenos de humanos. En el primer caso, se han detectado varias especies de los siguientes géneros de hongos: *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Cladosporium* y *Rhizopus* (Kader, 2002). En tanto que en el segundo, especies de los géneros de *Salmonella*, como: *S. Poona*, *S. Javiana* y *S. Typhimurium* y serotipos de *Escherichia coli* (Wells y Butterfield, 1997; Wuytack *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2004a).

1.2 Salmonella

1.2.1 Descripción y taxonomía

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae cuyos miembros se caracterizan por ser bacilos gram-negativos, de 0.7-1.5 x 1.0-5 µm, generalmente

móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinearum*), anaerobios facultativos, no esporulados (Terragno *et al.*, 2003).

De acuerdo a análisis de ADN con técnicas de hibridación, el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *S. enterica* y *S. bongori*. La especie *S. enterica* consta de varias subespecies: *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *arizonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae* y *S. enterica* subesp. *indica*. A su vez las subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* comprenden más de 2600 serotipos, definidos en función de la asociación de factores antigénicos somáticos O (*Salmonella* Paratyphi A), flagelares H y de envoltura (Vi) (Terragno, *et al.*, 2003).

La mayoría de los serotipos aislados del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* y derivan su nombre, en general, del lugar geográfico donde se aislaron por primera vez; por ejemplo, *S. Montevideo* se aisló por primera vez en Montevideo (Terragno *et. al.*, 2003).

Como el criterio para denominar a los serotipos es diferente de aquel para denominar a las especies, sus nombres no siguen las reglas del “International Code of Nomenclature of Bacteria”. Actualmente el denominar a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serotipo Typhimurium como *Salmonella* Typhimurium es con fines prácticos y ambos nombres son validos en la literatura. Especificamente, la clasificación taxonómica de *Salmonella* Typhimurium es la siguiente:

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Especie: *enterica*

1.2.2 Hábitat y fuentes de contaminación

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, su hábitat natural es el tracto intestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos. Se les puede encontrar como comensales o patógenos causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y en los animales (Terragno, *et al.*, 2003).

Los productos hortofrutícolas y el agua de uso agrícola se pueden contaminar con *Salmonella* debido a la presencia de materia fecal. Es por esto que la higiene de trabajadores así como los animales son componentes importantes a considerar en programas de calidad e inocuidad de estos productos (FAO/OMS, 2003). También considerados en estos programas se encuentra la calidad del suelo, el polvo del ambiente, el agua de uso agrícola y potable, el manejo de las compostas, la calidad de las semillas de cultivo, y la limpieza del equipo de trabajo, de los contenedores y de los vehículos de transporte (Buck *et al.*, 2003).

1.2.3 Brotes epidemiológicos

En las últimas dos décadas numerosos brotes epidemiológicos por salmonelosis se han registrado en diversas partes del mundo, especialmente en USA (Barak, *et al.*, 2003). Un brote puede definirse como: un incidente que afecta a dos o más personas

las cuales se han expuesto a una fuente común de contaminación y experimentan una infección o enfermedad similar (Wikipedia, 2007). Otro término relacionado es brote mayor el cual no solo depende del número de personas afectadas sino también de la patogenicidad del organismo causal y su potencial de dispersarse en una comunidad (Wikipedia, 2007).

Importancia sanitaria.- Los brotes por salmonelosis pueden presentarse, en general, en toda la población; sin embargo, estos se registran principalmente en lactantes, niños menores de cinco años, ancianos y pacientes con inmunodeficiencia adquirida (FAO/OMS, 2003). Se reportan con mayor frecuencia en hospitales, jardines maternos y restaurantes (Brock, 1998).

Importancia económica.- Los brotes por salmonelosis asociados con melón Cantaloupe han ocasionado importantes pérdidas a la economía del país. Lo anterior debido a la baja en las divisas generadas por las exportaciones de este producto a USA, principal socio comercial de México (SENASICA, 2004). Las exportaciones de Cantaloupe cayeron de 72 millones de dólares en su año pico en 2002 a 4.7 millones de dólares en el 2004. Representando una caída acumulada de exportaciones de cerca de 250 millones de dólares (SENASICA, 2004). Adicional a estas pérdidas están las registradas en noviembre de 2006, cuando las exportaciones del melón se detuvieron nuevamente por la detección de *Salmonella* en melón, registrándose pérdidas de 2.8 millones de pesos diarios (Reforma, 2006) (Cuadro 1.3 del Anexo 2).

1.2.4 Control químico, físico y biológico de *Salmonella*

Se han probado diferentes tratamientos químicos, físicos y biológicos en alimentos con la finalidad de eliminar, o reducir la población de los microorganismos patógenos de humanos. En particular, los tratamientos que se han probado en melón Cantaloupe para eliminar o reducir a *Salmonella* son los que a continuación se describen.

Control químico.- La efectividad de hipoclorito de sodio (NaClO), a diferentes concentraciones, y la del peróxido de hidrogeno (H₂O₂) se ha probado con éxito en la reducción del nivel contaminación de *S. Ponna* en melón Cantaloupe.

El cloro a concentraciones de 200 ppm por tres minutos reduce el nivel de la bacteria se de 1 a 2.6 log (Ayhan *et al.*, 1998; Ukuku, 2005, Ukuku y Sapers, 2006) en tanto que a concentraciones de 850 a 1200 ppm la reducción es de 3 log (Park y Beuchat 1999; Ukuku, 2005). En concentraciones arriba de 1200 ppm por 10 minutos el control puede ser de hasta 5 log (Materon, 2003). Sin embargo, el hipoclorito de sodio como otros desinfectantes disponibles además que no elimina completamente a *Salmonella* y tiene varias limitantes. Entre éstas están la de que su efectividad depende del pH y de la concentración de materia orgánica del agua que se va a utilizar para preparar la solución; y la de que a altas concentraciones puede causar daño celular al producto, afectando así su calidad comercial (Barak, *et al.*, 2003).

En contraste el peróxido de hidrógeno a 2.5% por dos minutos reduce en aproximadamente 2.6 log el nivel de contaminación de *Salmonella* en la superficie de melón sin afectar la calidad del producto (Ukuku, 2005)

Control físico.- Debido a la reducida efectividad de los productos químicos para reducir o eliminar a *Salmonella*, por la formación de biopelículas en la superficie de melón (Annous, *et al.*, 2005), se han probado algunos tratamientos físicos como el aire caliente, la inmersión en agua caliente y el almacenamiento bajo atmósferas controladas (AC) y modificadas (AM).

El aire y el agua caliente son efectivos para prevenir el moho de la superficie pero su aplicación, a nivel comercial, ha sido limitada (Suslow *et al.*, 2007). Recientemente se ha utilizado la inmersión de melones Cantaloupe en agua a 96°C por dos minutos la cual reduce la población inicial de *Salmonella* hasta 4.6 log. Sin embargo, la inmersión en agua caliente tiene el inconveniente de hacer al producto más susceptible a una re-contaminación por *Salmonella* en comparación a los melones tratados con productos químicos (Ukuku, 2005).

Las atmósferas artificiales como las AC y AM, que prolongan la vida postcosecha de algunos productos, se han estudiado por sus efectos en el crecimiento y sobrevivencia de diferentes microorganismos. Las AC, aunque de aplicación comercial limitada, se han probado con efectividad para reducir o retrasar el crecimiento de hongos en postcosecha. Concentraciones de 0, ¼, ½, 1, 2, y 4 % de O₂ y 0, 10, 20, y 45 % de CO₂ limitan el crecimiento o esporulación de *Alternaria tenuis*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* y *Rhizopus stolonifer* en melón (Wells y Uota 1970; Suslow *et al.*, 2007).

Hoogerwer *et al.*, (2002) encontraron que el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium discolor* se reduce bajo una atmósfera de 80% de O₂ y 20% de CO₂. También observaron que el crecimiento *B. cinerea* se detiene por 17 días

cuando la atmósfera se combina con temperatura de 10°C. Los efectos de la atmósfera refrigerada en el cese del crecimiento lo relacionaron con la actividad de la enzima peroxidasa, la cual disminuye o incrementa de acuerdo a la concentración de CO₂.

Diversos autores han estudiado el impacto que tiene la composición de la atmósfera en el crecimiento de algunos microorganismos patógenos de humanos como *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritis y *Salmonella* Typhimurium. Al respecto, Nychas y Tassou (1996) reportaron que *Salmonella* Enteritis sobrevive pero no crece en carne de pollo bajo AM (100% CO₂; 100 N₂ y 20 % CO₂ /80% O₂) a 3°C por 11 días; aunque se desarrolla rápidamente a 10°C, bajo las mismas condiciones de atmósfera.

Por su parte Amanatidou *et al.* (1999) encontraron que a 8°C, la combinación de 90% O₂ y 10% CO₂, redujo significativamente la velocidad de crecimiento de *E. coli* y *S. Enteritis* pero incrementó ligeramente la de *S. Typhimurium*.

En tanto que Daş *et. al.* (2005) evaluando el crecimiento de *Salmonella* Enteritis en tomate cherry bajo AC, AM y aire, encontraron que la sobrevivencia y/o crecimiento de la bacteria en almacenamiento depende del sitio en donde se encuentre en el fruto, de la densidad inicial y de la temperatura de almacenamiento. Al respecto, estos autores registraron que en la cicatriz peduncular la población puede incrementar hasta en 1.0 UFC/tomate a 22°C y que las células sobreviven sin cambio significativo a 7°C; que hay reducción en la población de 4-5 log₁₀ UFC/tomate cuando el inóculo inicial es de 7.0 log₁₀ UFC y del 100% cuando es de 3.0 log₁₀ UFC/tomate en aire; y, muerte de todas las células al sexto día a 7°C y al octavo a 22°C. Así mismo, reportaron que en AM todas las células mueren al cuarto día y al sexto en AC y aire; que la velocidad de muerte es superior en AM con respecto a AC y aire.

Control biológico.- Richards y Beuchat (2004b) trabajando con melón y levaduras para control biológico encontraron que *Candida oleophila* y *Rhodotorula glutinis* redujeron la población de *Salmonella* Poona en la corteza de melón Cantaloupe con heridas e inoculado previamente con *G. candidum*. La reducción registrada en la población fue de 4.49 log₁₀ a 3.64 log₁₀ en UFC con *C. oleophila* y de 4.88 log₁₀ en UFC con *R. glutinis* a 4°C durante 14 días de almacenamiento.

1.3 Asociaciones metabióticas e internalización de patógenos

La palabra metabiosis de acuerdo a sus raíces etimológicas, proviene del griego meta = “entre, junto a y con”, y bios = vida, y se utiliza para referirse a las relaciones entre organismos vivos. En las asociaciones metabióticas los organismos involucrados se pueden beneficiar mutuamente; sin embargo, no dependen uno de otro y su sobrevivencia es independiente de su interacción; cada uno, es capaz de sobrevivir aisladamente, aunque la interacción aumenta su tasa de crecimiento (Sutton, 2004).

En la literatura se encuentran varios reportes de la asociación de patógenos de humanos, con origen en los alimentos, con algunos microorganismos, principalmente hongos y en menor proporción bacterias. En estas asociaciones la sobrevivencia, el crecimiento y la internalización de los patógenos se han visto favorecidas (Wells y Butterfield, 1997). La palabra internalización se refiere a la condición de poder embeberse en los tejidos de una planta; por lo tanto, un microorganismo que se encuentra embebido se dice que esta “internalizado” y está protegido del “estrés” del medio ambiente y no puede ser inactivado por el contacto con biocidas u otros desinfectantes de la superficie (Bartz, 2006).

El proceso de internalización puede ser activo o pasivo. En el proceso activo, los microorganismos penetran mediante presión mecánica o actividad enzimática a través del tejido mientras que en el pasivo penetran directamente por las aberturas naturales, tales como lenticelas, estomas, hidátodos o heridas causadas por daño mecánico (Bartz y Showalter, 1981). Bartz y Showalter (1981) y Bartz (1982) reportaron que los patógenos de humanos pueden internalizarse cuando existe diferencial de presión osmótica entre el medio y el fruto y cuando existe un gradiente de temperatura entre el producto y el medio ambiente. Por ejemplo, *E. coli* puede internalizarse de 24 μm hasta 70 μm de profundidad en manzanas sumergidas en agua contaminada cuando se tienen gradientes de presión tanto positivos como negativos (Burnett *et al.*, 2000). *Salmonella enterica* se puede internalizar en mangos, cuando la temperatura de la pulpa es superior a la del agua durante el tratamiento hidrotérmico (Kenney *et al.*, 2001).

Durante las relaciones metabióticas también puede ocurrir internalización cuando los microorganismos degradan enzimáticamente los tejidos y generan vías de acceso favorables para la internalización pasiva de patógenos como *Salmonella Typhimurium* (Penteado *et al.*, 2004).

La mayoría de los autores coincide en que el cambio de pH inducido por la actividad enzimática de los hongos y bacterias, así como también, la temperatura de almacenamiento (Richards y Beuchat 2004a), el tipo de tejido infectado y el tipo microorganismo (Conway *et al.*, 2000; Wells y Butterfield 1999) durante las asociaciones metabióticas, favorecen el crecimiento, la sobrevivencia y la internalización de patógenos de humanos como *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria*

monocytogenes (Draughon *et al.*, 1988; Conway *et al.*, 2000; Riordan *et al.*, 2000; Wade y Beuchat, 2003 a, b).

II. SOBREVIVENCIA E INTERNALIZACIÓN DE *Salmonella* Typhimurium EN MELÓN CANTALOUPE

2.1 INTRODUCCIÓN

Salmonella es un enteropatógeno que en las últimas dos décadas se ha relacionado con al menos 734 brotes (Bell y Kyriakides, 2002) asociados con el consumo de melón Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) (Gagliardi *et al.*, 1999; Barak, 2003) lo cual ha originado que los gobiernos de Estados Unidos de América (USA por sus siglas en inglés), Canadá y México unan esfuerzos para disminuir la incidencia de salmonelosis en los tres países (FAO/OMS 2003).

Debido a la importancia sanitaria y económica de *Salmonella* se han evaluado diferentes tratamientos químicos (Brackett, 1992; Ukuku, 2005), físicos (Amanatidou *et al.*, 1999; Daş *et al.*, 2005; Wuytack *et al.*, 2003; Zhuang *et al.*, 1995) y biológicos (Richards *et al.*, 2004b) para llevar a cabo un control efectivo contra este patógeno. Entre los tratamientos químicos más utilizados destacan el hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y tiempos de contacto (Ukuku, y Sapers 2006); y entre los físicos, esta la aplicación de calor utilizando agua a alta temperatura sobre la superficie del melón (Ukuku, 2005). Sin embargo, actualmente se carece de un tratamiento 100% efectivo para controlar a este patógeno (Ukuku y Sapers, 2006).

Dada la baja efectividad obtenida con los desinfectantes disponibles, la mejor estrategia es evitar la contaminación con *Salmonella* y otros enteropatógenos de humanos. Lo anterior se logra con la aplicación de las buenas prácticas agrícolas durante toda la cadena de producción del melón Cantaloupe para que el consumidor final obtenga un producto inocuo. Las buenas prácticas agrícolas divididas en Buenas

Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manejo o Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH) reducen la probabilidad de contaminación de los productos hortofrutícolas frescos y minimizan las oportunidades de contaminación con patógenos de humanos, en cada una de las etapas de la cadena de producción (SENASICA, 2007). Al respecto, algunos productores de melón Cantaloupe, principalmente aquellos quienes están interesados en exportar su producto, han implementado las BPA y BPM para mantenerse en el mercado (SENASICA, 2007). Aunque, algunas intervenciones se deben seguir probando en caso de contaminación accidental del producto por *Salmonella* ó algún otro patógeno.

Parte de la cadena productiva involucra el almacenamiento de las frutas y hortalizas frescas antes de su distribución. Las atmósferas controladas (AC) y atmósferas modificadas (AM), utilizadas para incrementar la vida postcosecha de una variedad de productos, al reducir el daño por frío y otros desordenes fisiológicos (Kader, 2002), se han evaluado de manera reciente para el control de patógenos de humanos como *Listeria monocytogenes* (Conway *et al.*, 2000), *Salmonella* Enteritidis (Silliker *et al.*, 1980; Nichas y Tassou, 1996) y *S. Typhimurium* (Amanadidou *et al.*, 1999). Así como también para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (Prusky *et al.*, 1996) y hongos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium discolor* (Hoogerwert *et al.*, 2002).

En 2006, Morales reportó la presencia de *Salmonella* Typhimurium en melones Cantaloupe colectados en almacén por lo que sería importante probar el efecto de las atmósferas controladas sobre este patógeno de humanos que pueden contaminar la superficie del melón Cantaloupe.

Considerando lo anterior así como importancia que tiene para los productores y comerciantes el contar con información sobre el impacto de la utilización de las nuevas tecnologías en la inocuidad de los productos hortofrutícolas, este trabajo tuvo el objetivo general que a continuación se describe.

2.2 HIPOTESIS

En condiciones de refrigeración, las atmósferas controladas (AC) tienen un efecto bactericida y/o bacterioestático en *Salmonella* Typhimurium.

2.3 OBJETIVO

Analizar la sobrevivencia, el crecimiento y la capacidad de internalización de *Salmonella* Typhimurium en melón Cantaloupe (*Cucumis melo* L.), durante el almacenamiento refrigerado bajo diferentes atmósferas controladas.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Inducción de resistencia y caracterización de cepas

Inducción de resistencia a kanamicina

Se indujo la resistencia a kanamicina para asegurar la trazabilidad de la cepa inoculada. Para este fin se utilizó la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC23564 donada por el laboratorio de microbiología del CIAD–Culiacán. Después de un año a -80°C en agua-glicerol (50:50), la cepa se reactivó en Agar Entérico Hektoen (AEH, BD Bioxón®) a 37°C por 24 h. De las colonias desarrolladas se seleccionaron tres de forma y color característico. La presentación utilizada de kanamicina fue Kanamycin A, SIGMA-ALDRICH (Km). La prueba se estableció de acuerdo a Clement *et al.* (1990), la cual consiste en exponer gradualmente a la bacteria a dosis cada vez mayores del

antibiótico. Las dosis a las que se expuso la bacteria en este caso fueron: 12.5, 25 y 50 µg/mL, en los medios de cultivo. Caldo Soya Trypticaseína (CST, BD Bioxón®) y AEH. La exposición se inició creciendo a la bacteria en CST con 12.5 µg/mL de Km a 37°C por 18 h y transfiriendo 100 µL de la suspensión bacteriana obtenida a un medio fresco con la concentración siguiente (Anexo 1). Como referencia, se seleccionó una colonia de forma y color característico a las anteriores la cual se creció en medios sin Km.

Caracterización de cepas resistentes a kanamicina

Con el objetivo de verificar las características de las cepas obtenidas después de la prueba de inducción de resistencia, se determinó la velocidad de crecimiento en CST con Km (50 µg/mL) a 37°C sin agitación. Se seleccionaron cinco colonias, de color y tamaño similar, de cultivos en AEH con 50 µg/mL de Km (AEH-Km⁵⁰) de 48 h de crecimiento. Las colonias se denominaron St-1^{Km50}, St-2^{Km50}, St-3^{Km50}, St-4^{Km50} y St-5^{Km50}. Como referencia (control), se seleccionó una colonia de la cepa crecida en AEH sin Km, de color y tamaño similar a las anteriores.

Los cultivos se establecieron en tubos de 15 mL con 5 mL de CST + CST-Km⁵⁰ o CST sin Km para el control. Después de inocular los medios con masa bacteriana, estos se incubaron a 37°C por ocho h sin agitación. La masa bacteriana se tomó del margen de una colonia de 48 h de crecimiento con la punta de una micropipeta estéril de 200 µL; y la masa junto con la micropipeta se depositó en el medio de cultivo. Cada cepa contó con tres repeticiones. Cada dos horas se registraron las lecturas de densidad óptica de los medios en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Termo spectronic) a 560 nm. En

el momento de la inoculación (tiempo cero) de los medios se tomó una lectura para iniciar la curva de crecimiento. El blanco del espectrofotómetro fue CST sin inocular.

Relación entre densidad óptica y número de unidades formadoras de colonias

Para establecer la relación entre la densidad óptica de la suspensión bacteriana y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se usó el método de Clement *et al.* (1990), y las cepas St-3^{km50} y control de *Salmonella*. La cepa St-3^{km50} se seleccionó para esta prueba por presentar características de crecimiento muy similares a las de la cepa control en CST (Figura 2.1). Los cultivos se establecieron en tubos de 15 mL con 5 mL de CST-Km⁵⁰ y CST. Después de inocularse con masa bacteriana, obtenida del margen de una colonia de 48 h de crecimiento, los medios se mantuvieron a 37°C por ocho h sin agitación. Cada cepa contó con tres repeticiones.

La densidad óptica de los medios se determinó a 560 nm e inmediatamente después se sembraron 100 µL de cada uno en AEH-Km⁵⁰ y en AEH. Para la siembra se realizaron diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁸ de la suspensión bacteriana en Agua Peptonada Bufferada (APB, DIFCO™) a 0.1%. De cada suspensión se sembraron 100 µL en medio sólido y se incubó a 37°C. Después de 48 h se registraron las UFC desarrolladas en los medios que presentaron números entre 30 y 300 colonias, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de bacterias por mL} = \text{No. de colonias} \times \text{dilución de la muestra} \times 10$$

2.4.2 Adquisición y preparación de melones

Melones Cantaloupe var. *reticulatus* (*Cucumis melo* L.) se adquirieron de la Central de Abastos de la Ciudad de México. El tamaño de los frutos fue uniforme

ajustándose a una clasificación de 15 por caja. Se utilizaron 24 melones los cuales se lavaron con agua corriente y jabón, y se desinfectaron por aspersion con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a 200 partes por millón (ppm) por tres minutos. Transcurrido este tiempo los frutos se asperjaron con agua destilada estéril, se secaron a 24°C y se colaron en recipientes de plástico de 5 L de capacidad, con tapa hermética, previamente desinfectados con alcohol. Los frutos en los recipientes se llevaron a una cámara frigorífica, con temperatura de $5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, donde se establecieron los experimentos con las AC.

2.4.3 Establecimiento de cámaras con AC

Los tratamientos con atmósfera se lograron establecer con base en mezclas comerciales estándar certificadas (INFRA, S.A. de C.V.) contenidas en tanques presurizados de 6 m³ de capacidad conectados a un sistema de flujo controlado por un tablero que permite la dosificación de flujos en cámaras de intercambio gaseoso (AC). Estas cámaras fueron los recipientes de plástico previamente descritos, cada recipiente conteniendo cada uno un melón, se conectaron al tablero alimentado por el tanque presurizado que contenía la mezcla gaseosa (Figura 2.1). Las atmósferas probadas se denominaron: atmósfera controlada 1 [tratamiento 1 (**AC₁**)] conteniendo 3% CO₂, 12% O₂ y 85% N₂ (para balancear); atmósfera controlada 2 [tratamiento 2 (**AC₂**)], con 5% CO₂, 15% O₂ y 80% N₂) y **aire** [tratamiento 3] con 0.03% CO₂, 21% O₂ y 78% N₂. Cada tratamiento tuvo un flujo constante de 24 mL/min. Para cada experimento que se estableció en la cámara frigorífica se utilizaron veinticuatro melones, doce por

atmósfera probada. Cada melón se consideró como una unidad experimental (repetición).

2.4.4 Preparación de inóculo e inoculación de melones

Inóculo

El inóculo de *Salmonella* se preparó a partir de una colonia aislada crecida en AEH-Km⁵⁰ por 48 h. Del margen de la colonia se tomó un poco de masa bacterial la cual se depositó en un tubo de 15 mL con 5 mL de CST-Km⁵⁰. Después de la incubación a 37°C por 18 h sin agitación, la suspensión bacterial obtenida se depositó en tubos Eppendorf (1.5 mL) nuevos y esterilizados y se centrifugó a 8,000 X g por 10 minutos. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de APB a 0.1%. El lavado con APB se repitió dos veces y la pastilla se resuspendió en APB a 0.1%. La suspensión bacterial se mantuvo en hielo para ser utilizada durante las siguientes dos horas para la inoculación de melones. Previo a la inoculación, el número de UFC de la suspensión se estimó en cajas Petri con AEH-Km⁵⁰. Para esto se hicieron diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁸, en APB a 0.1%. De las diluciones 10⁻⁴ a 10⁻⁸ se depositaron, de cada una por separado, 100 µL en el medio, dispersándose con una varilla de vidrio estéril. Después de 48 h a 37°C se registraron las colonias desarrolladas.

Inoculación

Para la inoculación de los melones se utilizó la suspensión bacterial en APB a 0.1% o agua destilada estéril, para los controles (Testigos). En un costado de la superficie del melón, previamente delimitado con un marcador, se depositaron 100 µL

de suspensión bacteriana o agua. Después de la inoculación, se taparon los recipientes en donde se colocaron los melones y las mezclas de gases se activaron para generar la atmósfera de AC o aire bajo la cual se almacenaron los frutos a temperatura de refrigeración por ocho días.

2.4.5 Muestreo y análisis microbiológico

Muestreo

Durante ocho días cada 48 h se extrajeron seis melones, tres de AC y tres de aire. De cada melón se tomó una muestra de tejido de la región inoculada. Para esto, con un sacabocados de acero inoxidable de 5.8 cm de diámetro, previamente flameado, se extrajo un cilindro de tejido con cáscara (Figura 2.2) y se depositó sobre papel aluminio, previamente esterilizado con luz ultravioleta (UV) por 15 min. Del cilindro de tejido se extrajo por separado la corteza y el tejido de la parte interna, de 5 mm y de 10 mm de profundidad. Entre cada corte, el cuchillo y las pinzas, con los cuales se realizaron los cortes y se tomó el tejido, se desinfectaron con alcohol (70%) y flamearon para evitar la contaminación entre muestras.

Cada muestra de tejido se colocó por separado en una bolsa Ziploc® (16.5 cm x 14.9 cm), previamente esterilizada con luz UV por 15 minutos, se pesó en una balanza analítica y se colocó dentro de una hielera con hielo (Figura 2.2) donde se mantuvo hasta su procesamiento y análisis.

Análisis microbiológico

Las muestras de tejido, tres de cada atmósfera, se procesaron en una cámara de bioseguridad tipo II (ENVIRCO Corporation 805-5-65-98 PN 3137) de acuerdo al

método de diluciones (Amador *et al.*, 2000). Se adicionó APB a 0.1% a las bolsas Ziploc® conteniendo la muestra, en volumen de acuerdo al peso en g de la muestra (P/V). Después de frotar con las manos por 30 s, se realizaron diluciones de la suspensión obtenida en APB a 0.1%, previamente esterilizada; de 10^{-1} a 10^{-4} para corteza, y de 10^{-1} a 10^{-2} de tejido de 5 mm y 10 mm de profundidad. De cada suspensión se tomaron 100 μ L para sembrarse por separado en cajas Petri con AEH-Km⁵⁰ e incubándose a 37°C por 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación se registraron las UFC desarrolladas en las cajas que presentaron números entre 30 y 300 colonias.

°Brix del tejido

Para determinar los grados Brix (°Brix) durante el almacenamiento, se colectaron melones Cantaloupe, tres de AC y tres de aire, cada 48 h. De cada fruto se cortó una porción de pulpa, se le extrajo unas gotas de jugo y se depositaron en un refractómetro manual ATAGO® para registrar la lectura.

Determinación de temperatura y humedad relativa

La temperatura y la humedad relativa (HR) se registraron durante el almacenamiento y manejo de muestras en un medidor digital (datalogger, Hobo®). Un medidor digital se ubicó dentro de una de las cámaras, utilizadas para almacenar el melón. Y otro, dentro de la hielera donde se transportaron las muestras al laboratorio para ser procesadas.

Prueba preliminar

Se estableció una prueba preliminar para registrar el funcionamiento de las cámaras para establecer las AC, la duración de la mezcla de gases así como para

evaluar la metodología de inoculación, el muestreo y el procesamiento de las muestras. La prueba se estableció en **AC₁** y aire con dos repeticiones cada uno y durante cuatro días se realizó un muestreo cada 24 h. Para la toma de muestra de tejido se utilizó un sacabocado de metal de 1.8 cm de diámetro y se registró la sobrevivencia y el crecimiento de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium*.

2.4.6 Análisis estadístico.

Los datos de población bacteriana y °Brix se analizaron con el programa estadístico Statistical Analysis Software (SAS por sus siglas en inglés), en un arreglo de parcelas divididas, con prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia (α) de 0.05.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Cepas de *Salmonella* Typhimurium resistentes a kanamicina

Después de exponer gradualmente a *S. Typhimurium* ATCC2356 a las dosis de 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de Km en CST se obtuvieron cinco cepas resistentes al antibiótico. Estas cepas, denominadas: St-1^{km50}, St-2^{km50}, St-3^{km50}, St-4^{km50} y St-5^{km50}, presentaron curvas de crecimiento similares a la registrada por la cepa original, cuando se crecieron en CST-Km⁵⁰ a 37°C ó CST, respectivamente, sin agitación (Figura 2.5).

2.5.2 Relación entre densidad óptica y número de unidades formadoras de colonias

Cuando se graficaron los valores de densidad óptica (D.O a 560 nm) y los del número de unidades formadoras de colonias (UFC), de las cepas St-3^{Km50} y control, se registró una correlación positiva (Cuadro 2.1). Todas las cepas resistentes a kanamicina no tuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) tanto en forma de la curva (C) como el estimador de crecimiento (B) con la cepa nativa (Cuadro 2.4). Un incremento en la densidad óptica correspondió con un incremento en el número de UFC. Después de la fase lag la relación entre densidad óptica y absorbancia aumentó hasta alcanzar un máximo en proporción de 2.3, después de 4 h de crecimiento en CST a 37°C (Figura 2.6), Brock (1998) indica que, con el tiempo, la turbidez de un medio líquido de cultivo aumenta debido al incremento en el número de células. Estas originan que la luz se disperse cuando un rayo de luz se hace incidir a través del medio.

2.5.3 Supervivencia, crecimiento e Internalización de *Salmonella* Typhimurium en melón Cantaloupe

Prueba preliminar en AC₁.

La cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* sobrevivió tanto en AC₁ (3% CO₂, 12% O₂, 85% N₂), como en aire (0.03% CO₂, 21% O₂ y 78 N₂), por 96 h en la cámara frigorífica (5 ± 1.5°C). Durante el almacenamiento, la cepa St-3^{Km50} con población inicial de 7.5 log₁₀ UFC/melón sobrevivió en la superficie de melón con decremento aproximado de 1.7 log₁₀ UFC y de 0.6 log₁₀ UFC en la población bajo AC₁ y aire, respectivamente (Figura 2.7, Cuadro 2.5). La cepa St-3^{Km50} se detectó también en el tejido de 5 mm y 10 mm de profundidad. La mayor cantidad de UFC se recuperó de la corteza, seguido del tejido de 5 mm y 10 mm, de profundidad.

La detección de células de St-3^{km50} en los tejidos internos del melón sugirió en este caso, un problema de contaminación más que un fenómeno de internalización de la bacteria. Lo anterior debió originarse por el arrastre de las células bacterianas de la corteza al tejido interno al momento de tomar la muestra con el sacabocado. Madden (1992) demostró que cuando se corta un melón, las células bacterianas, presentes como contaminantes en la corteza, pueden ser arrastradas por el cuchillo a los tejidos internos del fruto; es decir, puede ocurrir contaminación cruzada. El sacabocado utilizado en este experimento tenía un diámetro tal que no permitió la toma de muestra sin acarrear células de la corteza al tejido interno. Por lo anterior para evitar problemas de contaminación durante el muestreo, para las prueba posteriores se utilizó un sacabocado de 5.8 cm diámetro.

En resumen los resultados de la prueba en AC₁ indicaron que: las cámaras de plástico permitieron el establecimiento de las AC sin pérdida de gases; la duración de un tanque de 6 m³ de capacidad con mezcla de gases es de ocho días, en promedio; para ubicar con facilidad el punto de inoculación en la corteza es importante marcar una zona en el fruto con plumón indeleble; y que un sacabocado mayor de 1.8 cm de diámetro sería más conveniente para evitar contaminación cruzada durante el muestreo.

En almacenamiento en frío bajo AC₁ y aire

La cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* sobrevivió tanto en AC₁ como en aire, por 192 h a 4.2°C (3.3°C y 4.3°C, mínima y máxima, respectivamente). Durante el almacenamiento, la cepa St-3^{km50}, con población inicial de 7.7 log₁₀ UFC/melón, en

promedio, sobrevivió en la superficie de melón con decremento aproximado de $3.7 \log_{10}$ UFC y de $5.3 \log_{10}$ UFC, en promedio, en la población bajo AC_1 y aire, respectivamente (Figura 2.7, Cuadro 2.5). Los resultados del análisis de los tejidos a 5 mm y 10 mm de profundidad sugirieron que durante el almacenamiento no ocurrió internalización de la bacteria en melón Cantaloupe.

En general los resultados obtenidos indican que el almacenamiento del melón Cantaloupe en una atmósfera con 3% O_2 y 12% CO_2 , recomendada para alargar la vida postcosecha de este producto (Kader, 2002) no tiene efecto significativo ni en la sobrevivencia ni en la internalización de *S. Typhimurium*. Los resultados muestran también que bajo las condiciones de las atmósferas evaluadas no ocurre crecimiento de la bacteria y que la principal reducción en la población, en la corteza de melón, se registra desde las primeras 48 h de almacenamiento en frío.

Diferentes investigadores reportan que las bacterias enteropatógenas se desarrollan mejor en almacenamiento cuando las temperaturas son superiores a las de refrigeración (Conway *et al.*, 2000; Daş *et al.*, 2005; Wade y Beuchat, 2003b). Por ejemplo, Eblen *et al.* (2004), reportaron que en naranjas para jugo los patógenos *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 sobreviven a 4°C pero que se desarrollan bien a 24°C. Por su parte Blackburn y McClure (2002) reportaron que la mayoría de los serotipos de *Salmonella* no crecen por debajo de 7°C. Annous *et al.* (2005) indican que la capacidad de *S. Typhimurium* para sobrevivir en melón en condiciones de refrigeración y sin disponibilidad nutrientes se debe a que las células de la bacteria pueden fácilmente embeberse en las grietas de la corteza quedando de esta manera protegidas del estrés del medio ambiente.

El riesgo que representa la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir bajo condiciones de estrés como son bajo atmósferas ricas en CO₂ y a temperaturas de refrigeración, las cuales serían perjudiciales para otros patógenos, es el de contaminar la parte edible de los melones durante el cortado para su consumo. Durante el cortado del fruto la bacteria puede ser arrastrada de la corteza contaminada hacia el tejido interno donde encuentra condiciones óptimas de crecimiento como son disponibilidad de nutrientes en ambiente acuoso (Ukuku y Sapers, 2001). Lo que es un riesgo grande para la salud del consumidor ya que se tienen documentados varios brotes de salmonelosis asociados a melón Cantaloupe (Ukuku y Sapers, 2006) cuando los frutos fueron cortados y guardados en refrigeración para su posterior consumo (Glagliardi *et al.*, 2003).

Cabe señalar que para una interpretación efectiva del efecto de las atmósferas en la sobrevivencia de la bacteria, durante el almacenamiento en frío del melón, también se debe considerar la pérdida en el número de células durante el proceso de análisis de tejido. Lo anterior se consideró para experimentos posteriores, cuantificando al tiempo cero el número de UFC por mL recuperadas de la superficie.

En almacenamiento en frío bajo AC₂ y aire

La cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* sobrevivió en AC₂ (5% CO₂, 15% O₂ y 80% N₂) y aire (0.03% CO₂, 21% O₂ y 78 N₂) por 192 h a 3.8°C (con 3.5°C y 4.1°C de temperatura mínima y máxima, respectivamente). El promedio de las UFC recuperadas durante el almacenamiento fue de 4.31 log₁₀ y de 4.21 log₁₀ de AC₂ y aire, respectivamente (Cuadro 2.6). A partir del segundo muestreo, los valores de las UFC

permanecieron relativamente constantes ($\alpha=0.05$). Estos resultados sugieren que ambas atmósferas tuvieron el mismo efecto en la sobrevivencia de la bacteria.

La reducción inicial de la población fue menor en AC₂ (3.3 log₁₀ UFC) que la registrada en aire (4.03 log₁₀ UFC); sin embargo, al final del almacenamiento, esta fue mayor en AC₂ (5.1 log₁₀ UFC), que la observada en aire (4.18 log₁₀ UFC). El análisis estadístico de los resultados no mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre atmósferas.

Resultados de un análisis realizado al tiempo cero indicaron que la pérdida promedio de UFC durante el análisis de tejido es de 3.7 log₁₀. Considerando lo anterior el efecto real de las atmósferas en la reducción de la población fue de 1.26 log₁₀ UFC y de 0.87 log₁₀ UFC en AC₂ y en aire, respectivamente, durante el almacenamiento en frío.

Al comparar los resultados obtenidos de los experimentos establecidos con AC₁ y AC₂, se observa que la atmósfera AC₂ redujo en mayor porcentaje (58.06%) la población de *S. Typhimurium* que AC₁ (48.45%). Sin embargo, esta conclusión se debe tomar con reserva al comparar los obtenidos con aire (testigo), de 69.75% y 50.90%, para AC₁ y AC₂, respectivamente. Es probable que las diferencias en reducción de población, registradas entre tratamientos y experimentos, se deban a diferencias en el manejo de las muestras y a las diferencias en temperatura registradas durante el almacenamiento (4.2°C y 3.8°C para AC₁ y AC₂, respectivamente). Lo anterior contrasta con lo reportado por Amanatidou *et al.* (1999), quienes observaron que *S. Typhimurium* se desarrolla mejor en atmósferas de almacenamiento con mayor

proporción de CO₂, que de O₂, en donde la fase lag se prolonga pero el rendimiento de la población es mayor.

°Brix en melón Cantaloupe

Los °Brix registrados en los melones Cantaloupe permanecieron relativamente estables durante el almacenamiento a 4.2°C por 192 h. Los valores promedio registrados fueron de 8.55 y 8.96 en AC₁ y aire, respectivamente. No hubo diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre AC₁ y aire ni entre fechas de muestreo. Infoaserca (2000) indica que los °Brix aumentan en promedio 1.5 después de que el melón se ha cosechado. Pero en este caso, no se registró cambios en los °Brix, debido a las condiciones de temperatura y atmósfera en las que se mantuvo el melón.

2.6 CONCLUSIONES

1. La cepa *St-3*^{km50} de *Salmonella* Typhimurium, sobrevivió en la superficie de melón Cantaloupe bajo las atmósferas de AC₁ (3% de O₂ + 12% CO₂), y aire (0.03% CO₂, 21% O₂) durante el almacenamiento a 4.2°C por 192 h.
2. La cepa *St-3*^{km50} de *S. Typhimurium*, sobrevivió en la superficie de melón Cantaloupe bajo las atmósferas de AC₂ (5% de O₂ + 15% CO₂) y aire durante el almacenamiento a 3.8°C por 192 h.
3. La cepa *St-3*^{km50} de *S. Typhimurium* tuvo un decremento promedio de 1.1 y de 1.2 log₁₀ UFC durante el almacenamiento refrigerado bajo AC₂ y aire, respectivamente.
4. Bajo las condiciones de AC₁, AC₂ y aire, no se registró crecimiento ni internalización de la cepa *St-3*^{km50} de *S. Typhimurium* en melón Cantaloupe durante el almacenamiento refrigerado por 192 h.
5. Las atmósferas AC₁, AC₂ y aire no afectaron los °Brix (8.5 en promedio) de los melones Cantaloupe durante el almacenamiento refrigerado.

III. EFECTO DE *Rhizopus* EN LA INTERNALIZACIÓN DE *Salmonella* Typhimurium EN MELÓN CANTALOUPE

3.1 INTRODUCCIÓN

La internalización, condición por la cual un microorganismo se embebe en el tejido vegetal, puede ser el resultado de diverso factores como: presencia de otros microorganismos y de aberturas naturales, presión mecánica, daños físicos, diferencias en presión osmótica y temperatura, a la que se someten los productos hortofrutícolas frescos. Bajo esta condición el microorganismo está protegido del “estrés” del medio ambiente y del contacto con biocidas u otros desinfectantes de la superficie que pudieran afectar su viabilidad (Bartz y Showalter, 1981; Bartz, 1982; Penteado *et al.*, 2004; Bartz y Sapers 2006).

Específicamente, la micoflora natural, presente en la superficie de los productos hortofrutícolas frescos, además de favorecer la internalización también favorece el crecimiento y la sobrevivencia de patógenos de humanos, que pudieran contaminar estos productos, al inducir cambios en textura y pH del tejido infectado.

Entre los patógenos de humanos se encuentran varias especies de *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, que se han reportado favorecidos por especies de fitopatógenos como *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Stemphylium*, *Thielaviopsis*, *Colletotrichum*, *Monilia*, *Mycosphaerella* y *Penicillium* (Conway *et al.*, 2000; Draughon *et al.*, 1988; Riordan *et al.*, 2000; Wade y Beuchat, 2003 a, b y c; Wells y Butterfield, 1997; Wells y Butterfield, 1999).

Riordan et al. (2000) encontraron que en presencia de *Glomerella cingulata*, *Escherichia coli* O157:H7 sobrevive y crece en manzanas mantenidas a 4°C o a temperatura ambiente. Estos autores registraron un incremento en la población de 3.59 log₁₀ UFCg⁻¹ en el tejido infectado. Resultados similares en crecimiento de *Listeria monocytogenes* fueron obtenidos por *Conway et al.* (2000), trabajando con el sistema manzana, *G. cingulata*-*P. expansum*, bajo AC (0.5% O₂ y 15% CO₂) y aire. Estos investigadores registraron incremento del pH (a 6.5 y 7) en rebanadas de manzana inoculadas con *G. cingulata* pero reducción con *P. expansum* (de 4.7 a 3.7).

Richards y Beuchat (2004a) observaron que *S. Poona* sobrevive mejor en melón Cantaloupe en presencia de *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *G. candidum* y *P. expansum*, que en ausencia de estos hongos, a 4°C y 20°C. También las poblaciones de *S. Typhimurium* se han visto favorecidas en presencia de *Botrytis* y *Rhizopus* en rebanadas de tomate, papa y cebolla a temperatura ambiente (Wells y Butterfield, 1999).

Por otra parte, se han reportado pudriciones en la corteza de melón Cantaloupe por *Rhizopus* (Kader, 2002) que es un hongo que presenta actividad enzimática en tejido vegetal y que tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones de refrigeración y baja concentración de oxígeno (Mass, 1998). Por ejemplo, *R. stolonifer* puede crecer en condiciones de anaerobiosis usando vías metabólicas que le permiten fermentar la glucosa en ácido fumárico y ácido láctico (Foster, 1948; Waksman y Foster 1938). A bajas concentraciones de oxígeno (1%) se ha registrado crecimiento del hongo pero no germinación de sus esporangioesporas (Follstand, *et al.*, 1966; Wells, 1970) en

contraste a 80% de O₂ y 20% de CO₂ a 10°C se ha registrado reducción de crecimiento (Hoogerwer *et al.*, 2002)

Por sus características de crecimiento y supervivencia, *Rhizopus* en condiciones de refrigeración y baja concentración de oxígeno puede permitir o favorecer la sobrevivencia, crecimiento e internalización de patógenos de humanos como *Salmonella* Typhimurium en melón Cantaloupe. Por lo anterior y considerando que *Rhizopus* sp y *S. Typhimurium* se han aislado de melones Cantaloupe (Kader, 2002; Morales, 2006), este trabajo tuvo como objetivo el que a continuación se describe.

3.2 HIPOTESIS

Rhizopus sp., puede modificar el pH y la textura de la corteza de melón Cantaloupe, favoreciendo la sobrevivencia, crecimiento e internalización de *Salmonella* Typhimurium.

3.3 OBJETIVO

Evaluar el efecto de *Rhizopus* en la sobrevivencia, el crecimiento y la internalización de *Salmonella* Typhimurium en melón Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) en condiciones de refrigeración bajo atmósfera controlada.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Aislamiento y purificación de *Rhizopus*

El aislamiento de *Rhizopus* se obtuvo de melones Cantaloupe naturalmente infectados. Para esto se adquirieron doce melones, de un centro comercial en Texcoco, Edo. de México, los cuales se dividieron en dos lotes de seis melones cada uno. El primer lote se desinfectó con hipoclorito de sodio (NaClO) a 200 ppm por tres minutos; el segundo, se dejó sin desinfectar. Para favorecer el crecimiento de hongos, los melones se colocaron en cámara húmeda a temperatura ambiente (20°C). Después de seis días de incubación, se hicieron observaciones para detectar crecimiento de micelio en la superficie del melón. De los melones con crecimiento se realizaron preparaciones para observarse al microscopio e identificar al hongo de acuerdo a sus características morfológicas (Mass, 1998). Los aislamientos que resultaron positivos se crecieron en PDA a 20°C por cinco días. De estos cultivos se prepararon cultivos a partir de punta de hifa para realizar la purificación del hongo (Smith y Onions, 1994). Una vez purificado, el hongo se mantuvo en tubo inclinado con Papa-Dextrosa Agar (PDA) y glicerol a 50% a temperatura de refrigeración.

3.4.2 Preparación de inóculo e inoculación de melones

Preparación de inóculo de Rhizopus

Para la reactivación del hongo, una de las cepas de *Rhizopus*, aisladas de melón, se creció en PDA por cinco días a temperatura ambiente y se extrajo una rodaja con crecimiento del hongo con un sacabocado (1.8 cm de diámetro). La rodaja con crecimiento del hongo se depositó sobre la superficie de una caja Petri con PDA y se

incubo a 20°C por tres días. Transcurrida la incubación, se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril a la caja Petri con crecimiento de *Rhizopus*. Con un triangulo de vidrio estéril, se resuspendieron las esporangioesporas, deslizando suavemente el triangulo sobre el medio con crecimiento, la suspensión de esporas se pasaron a través de una gasa estéril, y se depositó en tubos Eppendorf estériles de un mililitro.

La suspensión de esporas se centrifugó a 16,000 X g por 5 min, el sobrenadante se decantó y las esporas se resuspendieron nuevamente en agua destilada estéril. El lavado y centrifugado se repitió una vez más para finalmente recuperar las esporas en 1 mL de agua destilada estéril. Previo a su utilización, se contó el número de esporangioesporas con un hematocitómetro y la suspensión se mantuvo todo el tiempo en hielo para ser utilizada durante las siguientes dos horas para la inoculación de los melones.

Preparación de inóculo de Salmonella

El inóculo de *Salmonella* se preparó a partir de una colonia aislada, crecida en AEH-Km⁵⁰ por 48 h. Del margen de la colonia se tomó un poco de masa bacterial la cual se depositó en un tubo de 15 mL con 5 mL de CST-Km⁵⁰. Después de la incubación a 37°C por 18 h sin agitación, la suspensión bacterial obtenida se depositó en tubos Eppendorf (1.5 mL) nuevos y esterilizados, y se centrifugó a 8,000 X g por 10 minutos. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 1 mL de APB a 0.1%. El lavado con APB se repitió dos veces y la pastilla se resuspendió en APB a 0.1%. La suspensión bacterial se mantuvo en hielo para ser utilizada durante las siguientes dos horas para la inoculación de los melones. Previo a la inoculación, se estimó el número de UFC en AEH-Km⁵⁰. Para esto se hicieron diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁸,

en APB a 0.1%. De las diluciones 10^{-4} a 10^{-8} se depositaron, de cada una por separado, 100 μL en AEH-Km⁵⁰, dispersándose con una varilla de vidrio estéril. Después de 48 h a 37°C se registraron las colonias desarrolladas en el medio.

Inoculación de melones con Rhizopus

Previo a la inoculación, en cada melón, desinfectado con NaClO a 200 ppm por tres minutos, se delimitaron en los costados del melón dos áreas de 6 cm de diámetro con un marcador indeleble. En cada una de las áreas se depositó una gota de 40 μL con 6.15×10^4 esporangioesporas. En total se inocularon 12 melones, los cuales se dividieron en dos lotes de seis melones, cada uno contenido en una cámara con tapa hermética. El primer lote se mantuvo bajo el tratamiento AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂) y el segundo en aire (21% O₂, 0.03% CO₂) en la cámara frigorífica a 5.5°C por 24 h.

Inoculación de melones con Salmonella

Después de 24 h de la inoculación con *Rhizopus*, los melones se inocularon con la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium*. En una de las dos áreas inoculadas con el hongo se depositó una gota de 100 μL de suspensión bacteriana (8.6 log₁₀ de UFC) en APB a 0.1%. Para los controles (Testigos) se depositó una gota de agua destilada estéril del mismo volumen. Después de la inoculación, las cámaras se taparon y las mezclas de gases se activaron para generar las atmósferas de AC₂ y aire. Bajo estas atmósferas los melones inoculados se mantuvieron en la cámara a 3.2°C por seis días.

3.4.3 Muestreo y análisis microbiológico

Muestreo

Durante seis días cada 48 h se extrajeron seis melones, tres de AC₂ y tres de aire. De una de las áreas inoculadas se extrajo un cilindro de tejido con un sacabocado de acero inoxidable de 5.8 cm de diámetro, (Figura 2.2) y se depositó sobre papel aluminio. Del cilindro de tejido se cortó, por separado, la corteza y el tejido de la parte interna, de 5 mm y de 10 mm de profundidad. Los cortes de tejido se colocaron cada uno en una bolsa Ziploc® (16.5 cm x 14.9 cm), se pesaron en una balanza analítica y se mantuvieron en una hielera con hielo (Figura 2.2) hasta su procesamiento y análisis.

Todos los materiales utilizados para la toma y conservación de muestra se esterilizaron previamente; el papel aluminio con luz ultravioleta (UV) por 15 min, y el sacabocado, cuchillo y pinzas con alcohol (70%) y flama de mechero.

Análisis

Las muestras de tejido, tres por atmósfera, se procesaron en una cámara de bioseguridad tipo II (ENVIRCO Corporation 805-5-65-98 PN 3137) de acuerdo al método de diluciones de Amador *et al.* (2000). Se adicionó APB a 0.1% a las bolsas Ziploc® en volumen de acuerdo al peso en g de la muestra (P/V). Después de frotar con las manos por 30 s, se realizaron diluciones de la suspensión obtenida en APB a 0.1%, esterilizada; de 10⁻¹ a 10⁻⁴ para corteza, y de 10⁻¹ a 10⁻² para tejido de 5 mm y 10 mm de profundidad. De cada suspensión se tomaron 100 µL para sembrarse, por separado, en cajas Petri con AEH-Km⁵⁰. Transcurrido el tiempo de incubación a 37°C por 48 h se registraron las UFC desarrolladas en los medios, con números entre 30 y 300 colonias.

Previo al muestreo de los melones, se hicieron observaciones en las áreas inoculadas para registrar germinación y crecimiento micelial de *Rhizopus*. Posteriormente, de la suspensión obtenida en APB estéril a 0.1%, se tomaron 100 µL para sembrarse, por separado, en cajas Petri con PDA acidificado con ácido cítrico a 10% (14 mL/L) e incubándose por 48 h a 20°C. Transcurrido el tiempo de incubación se hicieron observaciones visuales para registrar características del micelio desarrollado (color y forma de crecimiento), y al microscopio compuesto, la presencia de esporangióforos con rizoide y esporangioesporas para su identificación (Mass, 1998).

3.4.4 Determinación de textura, pH y °Brix

Durante el almacenamiento de los melones en AC₂ y aire se determinó la textura, pH y °Brix. Estos parámetros se determinaron en el tejido del área marcada e inoculada solo con *Rhizopus*.

Las lecturas de textura se registraron en un texturómetro (Stable Micro System, TA-XT2i, Textura Analyser, England) con una sonda tipo aguja (Needle probe, Bate No. 3426) y los datos se procesaron con un programa automatizado (Windows software, textura expert, stable microsystems Ltd, versión 1.20, versión en español) (Figura 3.1).

El texturómetro se programó con los siguientes parámetros:

Velocidad de pre-ensayo 1.5 mm/s

Velocidad de ensayo 5 mm/s

Distancia de penetración 20 mm

Pps 200

Las lecturas de pH se estimaron en un potenciómetro con electrodo tipo aguja (pH/°C meter with GCP portable; Hanna instruments HI 98230, Rumania). Para esto el electrodo se introdujo a través del tejido de la cáscara para registrar la lectura (Figura 3.1).

Las lecturas de °Brix se registraron en un refractómetro manual ATAGO® De cada fruto se cortó una porción de pulpa, se exprimió para extraer unas gotas de jugo las que se depositaron en el refractómetro para registrar la lectura.

El experimento se repitió bajo las mismas condiciones de atmósfera y temperatura. También el muestreo, análisis microbiológico de tejido y registro de parámetros también se llevaron a cabo de la misma forma.

3.4.5 Análisis estadístico

Los datos de población bacteriana, pH, textura y °Brix se analizaron con el programa estadístico Statistical Analysis Software (SAS por sus siglas en inglés), en un arreglo de parcelas divididas, con prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia (α) de 0.05.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Sobrevivencia, crecimiento e internalización de *Salmonella*

La cepa St-3^{km50} de *Salmonella* Typhimurium sobrevivió en las dos atmósferas probadas: AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂) y aire (21% O₂, 0.03% CO₂) a 3.2°C por 144 h. El promedio de UFC recuperadas fue 4.19 log₁₀ UFC y de 3.93 log₁₀ UFC de AC₂ y aire,

respectivamente (Figura 3.2). Los valores de UFC recuperadas de la superficie se mantuvieron relativamente constantes durante los muestreos ($\alpha=0.05$). Estos resultados indican que la reducción de la población fue de $4.41 \log_{10}$ y de $4.47 \log_{10}$ UFC en AC₂ y aire, respectivamente.

Resultados de análisis al tiempo cero indicaron que la reducción promedio en la población por efecto de muestreo fue de $3.7 \log_{10}$ UFC y de 0.49 y $0.23 \log_{10}$ UFC por efecto de AC₂ y aire, respectivamente.

3.5.2 Sobrevivencia y crecimiento de *Rhizopus*

En las áreas inoculadas con el hongo, se observó ligero crecimiento micelial oscuro en la superficie del melón. Observaciones al microscopio compuesto de la suspensión de tejido en APB a 0.1 % indicaron que la mayoría de las esporangioesporas permanecieron sin germinar durante el almacenamiento a 3.2°C por 144 h bajo AC₂ y aire. Sin embargo, las esporangioesporas germinaron y produjeron abundante micelio cuando se sembraron en PDA acidificado (ácido cítrico a 10%) y se incubaron a 20°C. Lo anterior sugiere que la baja concentración de oxígeno no influyó en la inhibición de la germinación de la mayoría de las esporangioesporas y debió ser otro factor como adaptación (Mass, 1998) lo que evitó que el hongo pudiera germinar y crecer en la superficie del melón.

3.5.3 Textura, pH y °Brix

Textura

Bajo el tratamiento AC₂, los melones inoculados y sin inocular con *Rhizopus* registraron una textura promedio similar, de 638.61 gramos fuerza (gf) y de 686.11 gf,

respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en textura en melones inoculados (707.87 g_f) y sin inocular (679.98 g_f) mantenidos en aire por 192 h. Los resultados anteriores indican que el tipo de atmósfera no afectó la textura de los melones, ya que no hubo diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre ambos tratamientos (AC₂ y aire). García-Sahagún *et al.* (2005) reportaron que la madurez a la que los melones son cosechados y la temperatura a la que se almacenan afectan la textura. Melones cosechados maduros presentan textura de 2510 g_f, pero cuando se almacenan entre 2°C y 5°C esta disminuye a 810 y 1300 g_f respectivamente. En este trabajo los melones registraron valores iniciales de 650 g_f, previo al almacenamiento indicando con esto que la temperatura (3.2°C) a la cual se mantuvieron los melones no afectó significativamente ($\alpha=0.05$) la textura. Sin embargo bajo AC₂ se observó un ligero incremento en textura durante el almacenamiento, en presencia y ausencia de *Rhizopus* (Cuadro 3.2)

pH

Bajo AC₂, el pH promedio de los melones inoculados y sin inocular con *Rhizopus* fue en promedio de 6.42 y 6.39, respectivamente; en tanto que en los almacenados en aire, de 6.43 y 6.28 respectivamente. En aire el pH de los melones fue ligeramente más ácido respecto al registrado en AC₂; sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$). Lo anterior indica que la composición de la atmósfera no afectó el pH de los tejidos ni la presencia del hongo de melones almacenados a 3.2°C por 192 h.

Conway *et al.*, (2000), reportó que el cambio en pH del tejido de manzana bajo AC (0.5% O₂ y 15% CO₂) y aire está relacionado con el tipo de hongo que infecta el tejido. Por ejemplo, registró incremento de pH de 4.7 a 6.75 cuando el tejido se inoculó con *G. cingulata* pero reducción de 4.70 a 3.70 con *P. expansum*

En la mayoría de los estudios de las asociaciones de patógenos de humanos con hongos se han reportado cambios en pH del tejido inoculado (Conway *et al.*, 2000; Draughon *et al.*, 1988; Richards y Beuchat, 2004 a, b; Riordan *et al.*, 2000; Wade y Beuchat., 2003 a, b, c). Esto contrasta con lo registrado en este trabajo donde no se registraron cambios significativos en pH en el tejido inoculado con *Rhizopus* bajo AC₂ y aire. Lo anterior puede estar relacionado con la baja germinación de las esporangioesporas en la superficie y por consiguiente con una pobre o nula infección de los tejidos internos. Cabe señalar que el hongo no se recuperó de suspensiones de tejido a 5 mm y 10 mm de profundidad.

°Brix

Bajo AC₂, los °Brix promedio de los melones inoculados con *Rhizopus* fue de 10.75 en tanto que en los almacenados en aire, de 10.09; sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$). Lo anterior indica que la composición de la atmósfera no afectó los °Brix de los melones almacenados a 3.2°C por 192 h. De acuerdo a Infoaserca (2000) un melón se considera de muy buena calidad con 11 °Brix mientras que uno con 9 °Brix. Los melones utilizados en este estudio presentaron 10.4 °Brix, en promedio, lo que los ubica entre melones con muy buena y buena calidad comercial.

3.6 CONCLUSIONES

1. La inoculación con *Rhizopus* sp. no favoreció la sobrevivencia, el crecimiento ni la internalización de la cepa *St-3^{km50}* de *Salmonella* Typhimurium en melón Cantaloupe almacenado bajo las atmósferas de AC₂ (5% de O₂ + 15% CO₂), y aire (0.03% CO₂, 21% O₂) a 3.2°C por 144 h.
2. La cepa *St-3^{km50}* de *S. Typhimurium*, sobrevivió en la superficie de melón Cantaloupe bajo las atmósferas de AC₂ y aire a 3.2°C por 144 h.
3. La población de la cepa *St-3^{km50}* de *S. Typhimurium* decreció en promedio 0.49 y 0.23 log₁₀ UFC en melones mantenidos bajo AC₂ y aire, respectivamente por 144 h a 3.2°C.
4. *Rhizopus* sp. no afectó la textura, el pH ni los °Brix de melones Cantaloupe mantenidos bajo AC₂ y aire a 3.2°C. Los valores promedio registrados en estas atmósferas fueron de 678.1 g_f, 6.38 y 10.42, en textura, pH y °Brix, respectivamente.
5. La mayoría de las esporangioesporas de *Rhizopus sp* no germinaron en la superficie de melón Cantaloupe mantenido bajo AC₂ y aire a 3.2°C, pero mantuvieron su viabilidad por 144 h y germinaron cuando se sembraron en medio sólido e incubaron a 20°C.

LITERATURA CITADA

- Agrored. <http://agro-red.net/> Consultada en Julio 2007.
- Amador L. R., Avilés R. D., Eusebio H. M. G., Fernández R. R., Mota de la G. L., Quiñónez R. E. I., Rodríguez M. R. 2000. Manual de laboratorio de microbiología sanitaria. 2da. Edición. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología.
- Amanatidou A., Smid, E. J., and Gorris L. G. M. 1999. Effect of elevated oxygen and carbon dioxide on the surface growth of vegetable-associated micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 86:426-438.
- Annous B. A., Solomon E.B., Cooke P. H., Burke A. 2005. Biofilm formation by *Salmonella* spp., on cantaloupe melons. *Journal of Food Safety* 25: 276-286.
- Ayhan Z., Chism, G. W., and Richter, E. R. 1998. The shelf-life of minimally processed fresh cut melons. *Journal Food Quality* 21, 29.
- Barak J. D., Chue, B., and Mills, D. C. 2003. Recovery of surface bacteria from and surface sanitization of cantaloupes. *Journal of Food Protection* 66, 1805.
- Bartz J. A., Showalter R. K. 1981. Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. *Phytopathology* 71: 515-518.
- Bartz J. A. 1982. Infiltration of tomatoes immersed at different temperatures to different depths in suspensions of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Plant Diseases* 66: 302-305.
- Bartz J. A. 2006. Internalization and infiltration. *In: Microbiology of fruits and vegetables*. Sapers G. M., Gorny J. R., Yousef A. E. (eds). CRC. pp: 75-94.

- Bell C. and Kyriakides A. 2002. *Salmonella*. In: Foodborne pathogens hazards, risk analysis and control. Blackburn C. and McCure J. P., (eds). CRC. pp. 11.1-11.10.
- Beuchat L. R. and Scouten A. J. 2004. Factors affecting survival, growth, and retrieval of *Salmonella* Poona on intact and wounded cantaloupe rind and in stem scar tissue. *Food Microbiology* 21: 683-694.
- Blackburn C. W. and McClure P. 2002. Foodborne pathogens, hazards, risk analysis and control. CRC Press. Cambridge England.
- Brackett R. E. 1992. Shelf stability of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *Journal of Food Protection* 55:808-814.
- Brock M., Martinko M., Parker J. 1998. *Biología de los microorganismos*. 8va, Edición revisada. Prentice Hall.
- Buchanan R. L., Edelson S. G., Miller, R. L., and Sapers, G. M. 1998. Contamination of intact apples after inmersión in an aqueous environment containing *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 62:444-450.
- Buck J. W., Walcott, R. R., Beuchat, L. R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress* 10: 10-94.
- Burnett S. L., Chen J., Beuchat, L.R. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4679-4687.
- Clement Z., Rudolph K., Sands D. C. 1990. *Methods in Phytopathology*. Akademiai, Kiado. Budapest. Hungary. 98-99 p.

- Conway W. S., Leverentz B., Saftner R. A., Janisiewics, W. J., Sams C. E. and Leblane E. 2000. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. Plant Diseases 84: 177-181.
- Daş E., Gürakan, G. C., Bayındırlı A. 2005. Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella* Enteritis on cherry tomatoes. Food Microbiology 23: 430-438.
- Draughon F. A., Chen, S., and Mundt J. O. 1988. Metabiotic association of *Fusarium*, *Alternaria*, and *Rhizoctonia* with *Clostridium botulinum* in fresh tomatoes. Journal of Food Science 53:120-123.
- Eblen S. B., Walderhaug M. O., Edelson-Mammel S., Chirtel S. J., De Jesus A., Merker R. I., and Miller A. J. 2004. Potential for internalization, grow, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* 0157:H7 in oranges. Journal of Food Protection 67: 1578-1584.
- FAO/OMS. 2003. Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos. <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s00.htm>. Fecha de consulta julio 2007.
- Follstad M. N. 1966. Mycelial growth rate and sporulation of *Alternatia tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, and *Rhizopus stolonifer* in low-oxygen atmospheres. Phytopathology 56:1098-1099.
- Foster J. W. and Davis J. B. 1948. Anaerobic formation of fumaric acid by the mold *Rhizopus nigricans*. Journal Bacteriology 56:329-338.

- Gagliardi J. V., Millner, P. D., and Ingram, D. 2003. On-Farm and postharvest processing sources of bacterial contamination to melon rinds. *Journal of Food Protection* 66: 82-87.
- García-Sahagún M. A., Vargas-Arispuro I., Gardea-Béjar A. A., Tiznado M. H. and Martínez-Tellez M. A. 2005. Chilling injury in cantaloupes melons at two maturity stages. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28: 161-170.
- Hoogerwert, S.W., Kets, E.P.W. and Dijksterhuis J. 2002. High-oxygen and high-carbon dioxide containing atmospheres inhibit growth of associated moulds. *Letters in Applied Microbiology* 35:419:422.
- Ibarra-Sánchez L. S., Alvarado-Casillas S., Rodríguez-García, M. O., Martínez-González E., and Castillo A. 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomato and their control by select chemicals. *Journal of Food Protection* 67: 1353-1358.
- IICA Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <http://www.iica.int>. Fecha de consulta, julio, 2007.
- Infoaserca 2000 "El melón mexicano; ejemplo de tecnología aplicada". *Claridades Agropecuarias*: ASERCA 84:1-32. <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas.asp>. Fecha de consulta julio, 2007.
- Kader A. A. 2002. *Postharvest technology of horticultural crops*. Third edition. University of California. Agriculture and Natural Resources. 135-144 p.

- Kenney S. J., Burnett, S. L., and Beuchat, L. R. 2001. Location of *Escherichia coli* O157:H7 on and in apples as affected by bruising, washing, and rubbing. *Journal of Food Protection* 64: 1528-1533.
- Mass J. L. 1998. *Compendium of Strawberry Diseases*. Ed. APS Press. St. Paul Minnesota. USA. 98 p.
- Madden J. M. 1992. Microbial pathogens in fresh produce-the regulatory perspective. *Journal of Food Protection* 55:821-823.
- Martínez V. 2006. Rechaza E.U. melón. Periódico Reforma. 28 de noviembre, 2006.
- Materon L. A. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 applied to cantaloupes and the effectiveness of chlorinated water and lactic acid as disinfectants. *World Journal Microbiology. Biotechnology*: 19-867.
- Morales H. L. 2006. Detección e identificación de *Salmonella* en pre y postcosecha del melón Cantaloupe en Zirándaro de los Chávez, Guerrero. Tesis de maestría. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. 104 p.
- Nychas G. J. E. and Tassou C.C. 1996. Growth/survival of *Salmonella enteritis* on fresh poultry and fish under vacuum or modified atmosphere. *Letters in Applied Microbiology* 23: 115-119.
- Park C. M. and Beuchat, L. R. 1999. Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus, *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. 19-842.

- Penteado A. L., Eblen B.S. and Miller A. J. 2003. Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect disinfestation procedures. *Journal of Food Protection* 67:181-184.
- Phillips C.A. 1996. Modified atmosphere packing and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology* 31: 463-479.
- Prusky D., Perez A., Zutkhi Y. and Ben-Arie R. 1997. Effect of modified atmosphere for control of black spot caused by *Alternaria alternata*, on stored persimmon fruits. *Phytopathology* 87: 203-208.
- Richards G. M. and Beuchat L. R. 2004a. Metabiotic associations of molds and *Salmonella* Poona on intact and wounded cantaloupe rind. *International Journal of Food Microbiology* 97: 327-339.
- Richards G. M., Buck J. W. and Beuchat L. R. 2004b. Survey of yeast for antagonistic activity against *Salmonella* Poona in cantaloupe juice and wounds in rinds coinfecting with phytopathogenic molds. *Journal of Food Protection* 67: 2132-2142.
- Riordan D. C. R., Sapers G. M., and Annous B. A. 2000. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of *Penicillium expansum* and *Glomerella cingulata* in wounds on apples surfaces. *Journal of Food Protection* 63:1637-1642.
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad, y Calidad. <http://www.senasica.sagarpa.gob.mx>. Fecha de consulta julio 2007.

SIAP Servicio de información agroalimentaria y pesquera
<http://www.siea.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/anmelon.html> fecha de
consulta julio 2007.

Silliker J. H. and Wolfe, S. K. 1980. Microbiological safety considerations in controlled atmosphere storage of meats. Food Technology 34: 59-63.

Smith D. and Onions A. H. S. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. International Mycological Institute. IMI Technical Handbooks No. 2. CAB international.

Suslow T. V., Cantwell M., Mitchell J. T.
<http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/MelonCantaloup.e.shtml>. Fecha de consulta julio 2007

Sutton D. B., and Harmon N. P. 2004. Fundamentos de ecología. Limusa Editores. 293 p.

Terragno R., Caffer M. A. I., Bruno S. y Binsztein N. 2003. Parte I: Aislamiento Identificación y Serotipificación de *Salmonella*. Manual de Procedimientos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Departamento de Bacteriología. Buenos Aires, Argentina. pp.56.

Ukuku D. O. 2005. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. Food Microbiology 23: 289-293.

Ukuku D. O. and Sapers G. M. 2001. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella* Satanley attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. Journal of Food Protection 64:1286-1291.

- Ukuku D.O. and Sapers G. M. 2006. Microbiological safety issues of fresh melons: *In* Microbiology of fruits and vegetables. Sapers G. M., Gorny J. R., Yousef A. E. (eds). CRC. pp: 231-250.
- Wade W. N. and Beuchat L. R. 2003a. Metabiosis of proteolytic moulds and *Salmonella* in raw, ripe tomatoes. *Journal of Applied Microbiology* 95:437-450.
- Wade W. N. and Beuchat L.R. 2003b. Proteolytic fungi isolated from decayed and damaged raw tomatoes and implications associated with changes in pericarp pH favorable for survival and growth of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 66:911-917.
- Wade W. N., Vandinnyi R., Deak T. and Beuchat L. R. 2003c. Proteolytic yeast isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 86: 101-111.
- Waksman S. A., and Foster J. W. 1938. Respiration and lactic acid production by fungus of the genus *Rhizopus*. *Journal Agricultural Research* 57:873-900.
- Wei C. I., Huang, T.S., Kim, J. M., Lin, W. F., Tamplin, M. L., and Bartz, J. A. 1995. Growth and survival of *Salmonella montevideo* on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *Journal of Food Protection*. 58:829-836.
- Wells J. M. and Uota, M. 1970. Germination and growth of five fungi in low oxygen and high carbon dioxide atmospheres. *Phytopathology* 60: 50-53.
- Wells J. M. and Butterfield J. E. 1997. *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Diseases* 81: 867-872.

- Wells J. M. and Butterfield J. E. 1999. Incidence of *Salmonella* on fresh fruits and vegetables affected by fungal rots of physical injury. *Plant Diseases* 83: 722-726.
- Wikipedia. 2007. Enciclopedia libre. <http://es.wikipedia.org>. Fecha de consulta agosto, 2007.
- Wills R. H. H., Graham L. D., McGlasson W. B., and Hall E. G., 1980. Postharvest, an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. Ed. New South Wales University Press Limited, Kensington. N.S.W. Australia.
- Wuytack E. Y., Duong thi Phuong L., Aertsen A., Reyns K. M. F., Marquenie D., De Ketelaere B., Masschalck B., Van Opstal I., Diels A. M. J. and Michiels C.W. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection* 66: 31-37.
- Zhuang R.Y., Beuchat L.R. and Angulo F.J. 1995. Fate of *Salmonella* Montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2127-2131.

CUADROS

Cuadro 2.1 Datos de densidad óptica (560 nm) de cepas de *Salmonella* Typhimurium ATCC23564, en CST, incubadas a 37°C sin agitación.

Cepa	Tiempo (h)				
	0	2	4	6	8
Salmonella ^a	0.09	0.72	0.92	0.92	0.92
St ^b					
St-1 ^{km50}	0.05	0.53	0.71	0.79	0.83
St-2 ^{km50}	0.07	0.61	0.91	0.97	0.97
St-3 ^{km50}	0.05	0.56	0.85	0.91	0.90
St-4 ^{km50}	0.04	0.55	0.85	0.89	0.89
St-5 ^{km50}	0.05	0.55	0.89	0.88	0.85

^aCepa original, sin resistencia a kanamicina.

^bCepas de *S. Typhimurium* ATCC23564 resistentes a kanamicina (50 µg/mL).

Cuadro 2.2 Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* crecida en CST por 18 h a 37°C sin agitación.

Dilución ^a	UFC/mL ^b		Promedio UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
	Repetición 1	Repetición 2		
10 ⁻⁴	DNPC ^c	DNPC ^c		
10 ⁻⁵	539	251	395	8.5
10 ⁻⁶	38	22	30	8.4
10 ⁻⁷	5	3	4	8.6
10 ⁻⁸	0	0	0	

^a En agua peptonada buferada a 0.1 % .

^bDensidad óptica (560 nm) de suspensión en CST sin diluir: Repetición 1= 0.827 y Repetición 2=0.871.

^cDemasiado Numerosas Para Contarse.

Cuadro 2.3 Relación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) con la densidad óptica^b de la suspensión bacterial. Los datos corresponden a la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* crecida en CST por 18 h a 37°C sin agitación.

Dilución ^a	Repetición						Promedio	
	1		2		3		\log_{10} UFC/ml	D.O
	UFC	D.O ^a	UFC	D.O	UFC	D.O		
10 ⁻⁵	293	0.26	387	0.28	339	0.24	10.06	0.26
10 ⁻⁶	156	0.14	112	0.19	214	0.13	9.68	0.15
10 ⁻⁷	115	0.08	70	0.09	181	0.09	10.08	0.085

^aAgua peptonada a 0.1 %

^b $\lambda = 560$ nm

Cuadro 2.4 Valores de los parámetros de la forma de curva de crecimiento (C) y del estimador de velocidad de crecimiento (B) entre la cepa nativa de *Salmonella* Typhimurium ATCC23564 y cinco cepas resistentes a kanamicina. Los datos se analizaron con el método de Weibull.

Cepa	Coeficiente de correlación (r^2)	C			B		
		Rango inferior	Valor de C	Rango superior	Rango inferior	Valor de B	Rango superior
0 ^a	0.998	-0.21	0.63	1.45	-0.49	1.25	3.00
1 ^b	0.998	0.34	0.63	0.92	2.19	3.02	3.85
2 ^b	0.998	0.38	1.28	2.18	1.50	2.08	2.67
3 ^b	0.990	0.30	0.92	1.53	1.41	2.34	3.26
4 ^b	0.988	0.27	0.88	1.48	1.38	2.39	3.40
5 ^b	0.965	-0.13	0.80	1.73	0.54	2.28	4.02

^aCepa original, sin resistencia a kanamicina.

^bCepas de *S. Typhimurium* ATCC23564 resistentes a kanamicina (50 μ g/mL).

Cuadro 2.5 Crecimiento, sobrevivencia e internalización de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en melón Cantaloupe^a, durante el almacenamiento en AC₁ y aire a 4.2°C (Prueba preeliminar).

Atmósfera de almacenamiento	Tejido muestreado ^d	Tiempo de almacenamiento (h)			
		24	48	72	96
AC^b					
<i>Salmonella</i>	Superficie	5.7 ^e	5.7	6.8	5.8
	5 mm	-	5.2	5.8	3.5
	10 mm	-	4.7	4.5	0
Agua	Superficie	0	0	0	0
	5 mm	-	0	0	0
	10 mm	-	0	0	0
Aire^c					
Salmonella	Superficie	6.0	6.7	6.5	6.9
	5 mm	-	5.2	3.8	3.7
	10 mm	-	4.6	4.9	0
Agua	Superficie	0	0	0	0
	5 mm	-	0	0	0
	10 mm	-	0	0	0

^aEn cada melón se depositó una gota de 100 µL de una suspensión bacteriana (7.5 log₁₀ UFC) o agua destilada estéril.

^bAC = 3% O₂, 12% CO₂, y 85% N

^cAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^dTejido de 2 cm de diámetro muestreado en el lugar donde se depositó la gota. El tejido de la superficie y el de 5 mm y 10 mm de profundidad se procesaron por separado.

^eCada valor representa el promedio de tres repeticiones.

-Dato no estimado.

Cuadro 2.6 Supervivencia de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en la corteza de melón Cantaloupe^a, durante el almacenamiento en AC₁^b y aire^c a 4.2°C.

Tiempo (h)	AC ₁		Aire	
	UFC ¹	UFC ²	UFC ¹	UFC ²
48	4.30	5.30	-	4.42
96	4.32	4.94	2.6	4.27
144	4.20	4.21	1.86	2.22
192	4.11	3.83	1.56	3.09

^aEn cada melón se depositó una gota de 100 µL de una suspensión bacteriana con 7.7 log₁₀ UFC, o agua destilada estéril.

^bAC₁ = 3% O₂, 12% CO₂, y 85% N₂

^cAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^{1,2}= UFC Recuperadas de la superficie de melón en la primera y segunda repetición respectivamente.

-Dato no estimado.

Cuadro 2.7 Sobrevivencia de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en corteza de melón Cantaloupe^a, durante el almacenamiento en AC₂^b y aire^c a 3.8°C.

Tiempo (h)	AC ₂		Aire	
	UFC ¹	UFC ²	UFC ¹	UFC ²
48	4.52	6.48	3.41	6.13
96	3.01	5.77	2.97	5.21
144	1.5	5.77	2	5.32
192	2	5.37	3.6	5.04

^aEn cada melón se depositó una gota de 100 µL de una suspensión bacteriana con 8.8 log₁₀ UFC, o agua destilada estéril.

^bAC₂ = 5% O₂, 15% CO₂, y 80% N₂

^cAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^{1,2}= UFC Recuperadas de la superficie de melón en la primera y segunda repetición respectivamente.

Cuadro 2.8 Sólidos soluble totales (°Brix) en melones Cantaloupe, almacenados en AC y aire a 4°C, registrados en un refractómetro ATAGO® manual.

Tiempo (h)	°Brix			
	AC		Aire ^a	
	AC ₁	AC ₂	1 ^b	2
48	8.48	7.98	8.75	7.3
96	8.47	8.83	8.98	8.5
144	8.45	9.13	8.86	9.10
192	8.38	8.27	9.25	7.53

AC₁ = 3% O₂, 12% CO₂, y 85% N₂

AC₂ = 5% O₂, 15% CO₂, y 80% N₂

^aAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^b1= Atmósfera de aire que se estableció con AC₁; 2= Atmósfera de aire que se estableció con AC₂.

Cuadro 3.1 Supervivencia de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en la corteza de melón Cantaloupe, inoculado con *Rhizopus*^a sp., durante el almacenamiento en AC₂^b y aire^c a 3.8°C.

Tiempo (h)	AC ₂		Aire	
	UFC ¹	UFC ²	UFC ¹	UFC ²
48	3.81	4.64	4.23	4.18
96	4.52	4.45	3.63	5
144	3.55	4.18	2.7	3.86

^aInóculo= gota de 40 µL con 6.5 X 10⁴ esporangioesporas.

^bInóculo= gota de 100 µL de una suspensión bacteriana con 8.6 log₁₀ UFC, o agua destilada estéril.

^cAC₂ = 5% O₂, 15% CO₂, y 80% N₂

^cAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^{1,2}= UFC Recuperadas de la superficie de melón en la primera y segunda repetición respectivamente.

Cuadro 3.2 Sólidos solubles totales (°Brix), pH y textura en melones Cantaloupe, previamente inoculados con *Rhizopus* sp., y mantenidos bajo AC₂^a y aire^b.

Atmósfera	Tiempo (h)	°Brix	pH		Textura (g _f)	
			SI ^c	I ^d	SI ^c	I ^d
AC ₂	48	11.2	-	6.4	495.7	630.1
	96	10.1	6.3	6.4	639.0	674.4
	144	11.0	6.5	6.6	704.1	721.7
Aire	48	10.2	-	6.2	826.1	619.5
	96	10.4	6.4	6.3	667.2	690.5
	144	9.6	6.4	6.3	694.5	685.0

^aAC₂ = 5% O₂, 15% CO₂, y 80% N₂

^bAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^cSin Inocular: Tejido control que no se inoculo con *S. Typhimurium* o *Rhizopus* sp.

^dInoculado: Tejido inoculado con la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* después de 24 h de haber sido inoculado con *Rhizopus* sp. (3% de O₂ + 12% CO₂).

-Dato no estimado

FIGURAS



Figura 2.1 Establecimiento de cámara con atmósfera controlada (AC) y aire para almacenar melones en frigorífico (UACH). **A**, Tanques con mezcla estándar de AC (3-5% O₂, 12-15% CO₂, y 85-80% N₂) y con aire comprimido (aire) (21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂); **B**, Humidificador con mezcla de glicerol-agua (8:2); **C**, Tablero de alimentación de flujo de AC y aire; y **D**, Cubeta con tapa y mangueras rígidas de entrada y salida de gases (cámara) en AC o aire; **E**, Multiconector para concentrar la mezcla y el aire de salida de las cámaras.

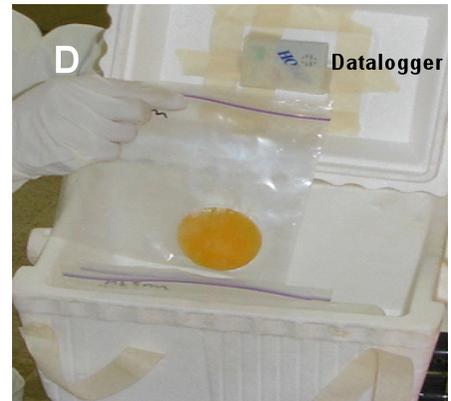
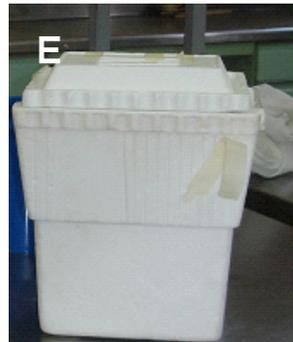
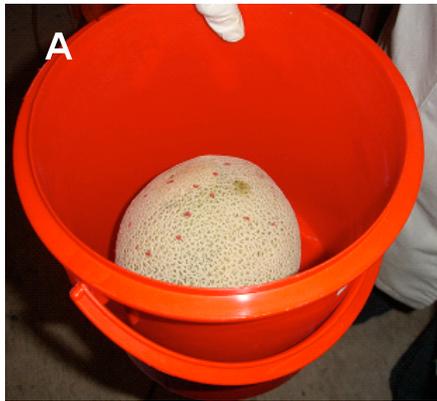


Figura 2.2 Muestreo de tejido de melón almacenado en atmósfera controlada (AC) o aire. **A**, Melón en cámara previo al muestreo de tejido; **B**, Muestreo de tejido de melón con sacabocado de 5.8 cm de diámetro; **C**, Corte de tejido de corteza y tejido a diferentes profundidades; **D**, Bolsa Ziploc® estéril con muestra de tejido; y **E**, Hielera para transportar en hielo bolsas con tejido.

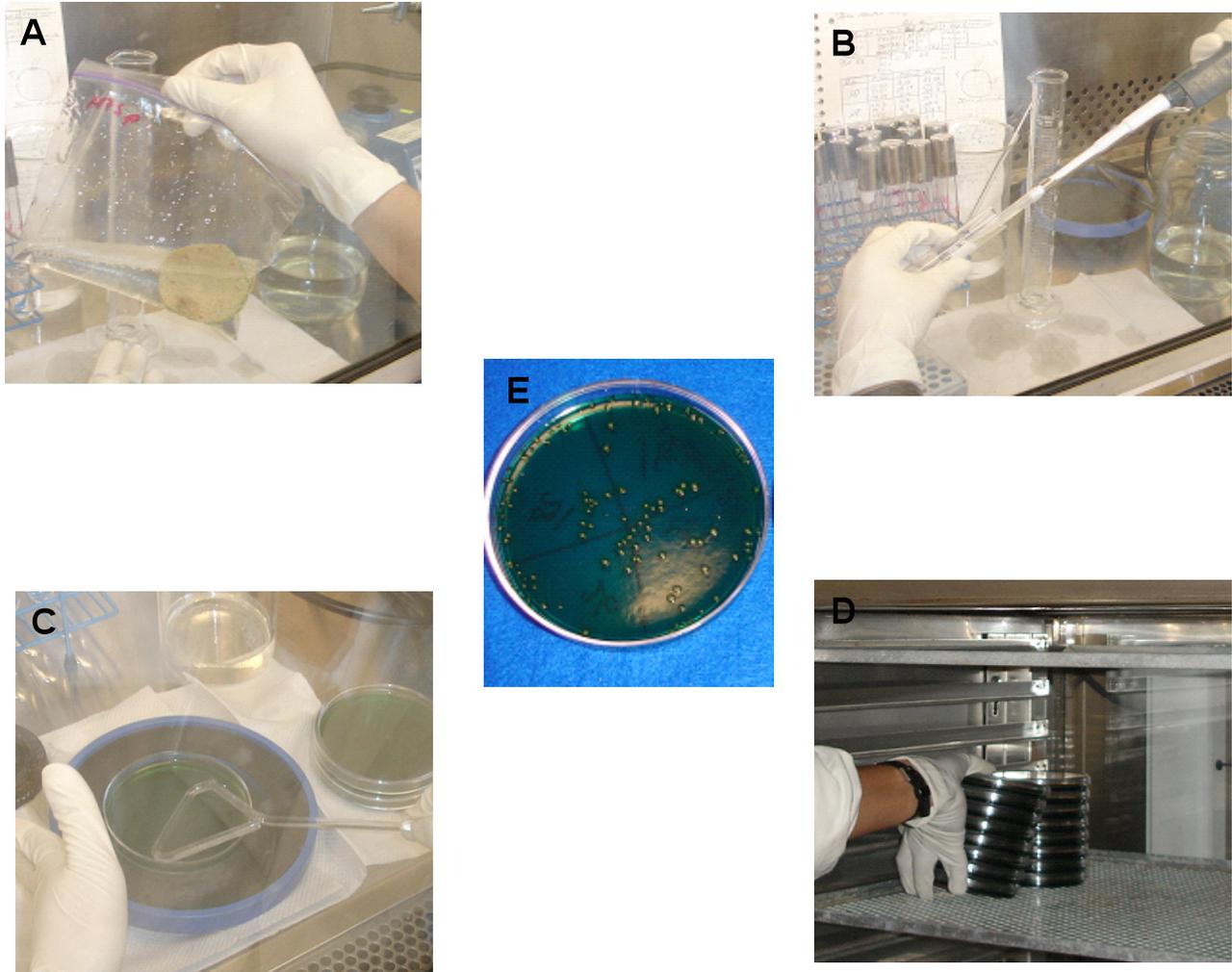


Figura 2.3 Procesamiento de muestras de melón para la detección y aislamiento de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium*. **A**, Bolsa con corteza de melón y APB a 0.1% para recuperación de células mediante lavado tejido; **B**, Dilución de suspensión de lavado de tejido en APB a 0.1 %; **C**, Dispersión de suspensión de lavado AEH-Km⁵⁰; **D**, Cajas Petri inoculadas en incubadora a 37°C; **E**, Cajas con crecimiento de la cepa St-3^{Km50} de 48 h.

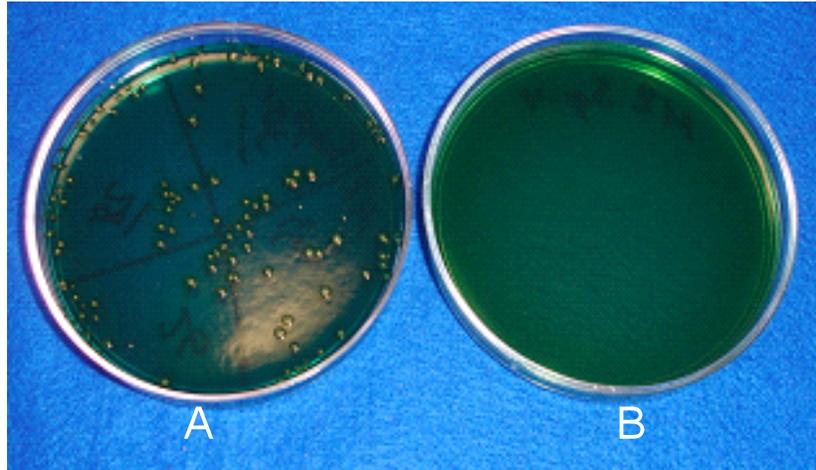


Figura 2.4 Aislamiento en Agar Entérico Hektoen + kanamicina (50 mg/mL) de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* de melón Cantaloupe, inoculado con $8.8 \log_{10}$ UFC, y almacenado en AC₂ (5% O₂, 15% CO₂, y 85% N₂) a 4°C por 96 h. Cajas con y sin crecimiento de colonias en las que se depositaron 100 μ L de **(A)** Suspensión de lavado de corteza y **(B)** Tejido interno (5 mm de profundidad).

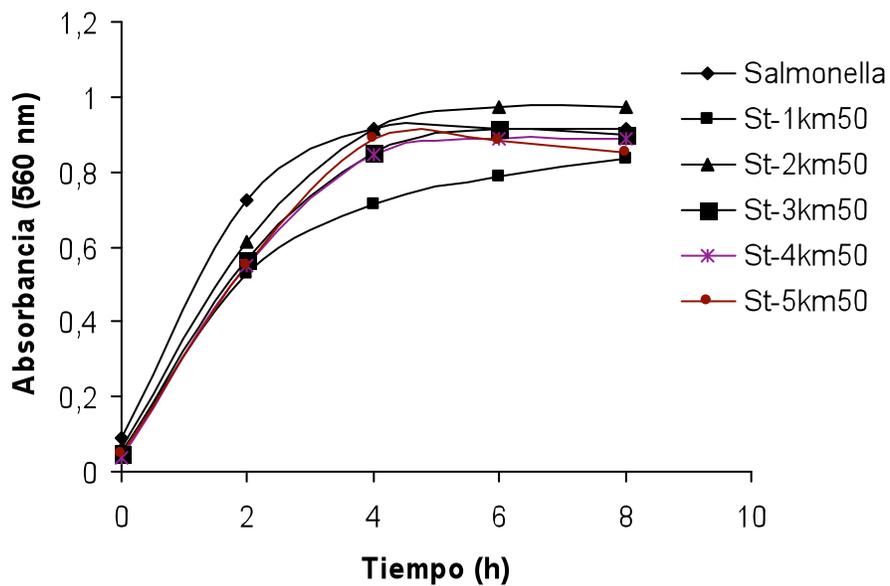


Figura 2.5 Crecimiento de cepas de *Salmonella* Typhimurium en caldo soya tripticaseína a 37°C sin agitación. Donde: *Salmonella* corresponde a *S. Typhimurium* ATCC2356; y, St-1^{Km50}, St-2^{Km50}, St-3^{Km50}, St-4^{Km50} y St-5^{Km50} corresponden a cepas resistentes a kanamicina (50µg/mL).

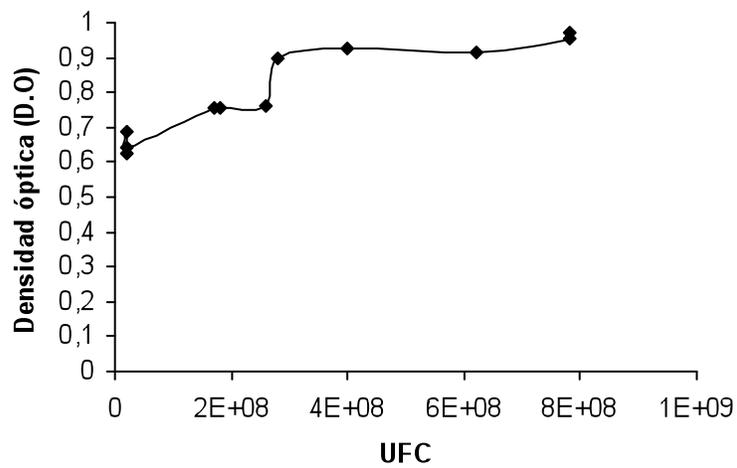


Figura 2.6 Proporción entre densidad óptica y población. Los datos corresponden al promedio de cinco repeticiones. Las cepas de *S. Typhimurium* se incubaron en CST con Km sin agitación a 37°C por ocho horas.

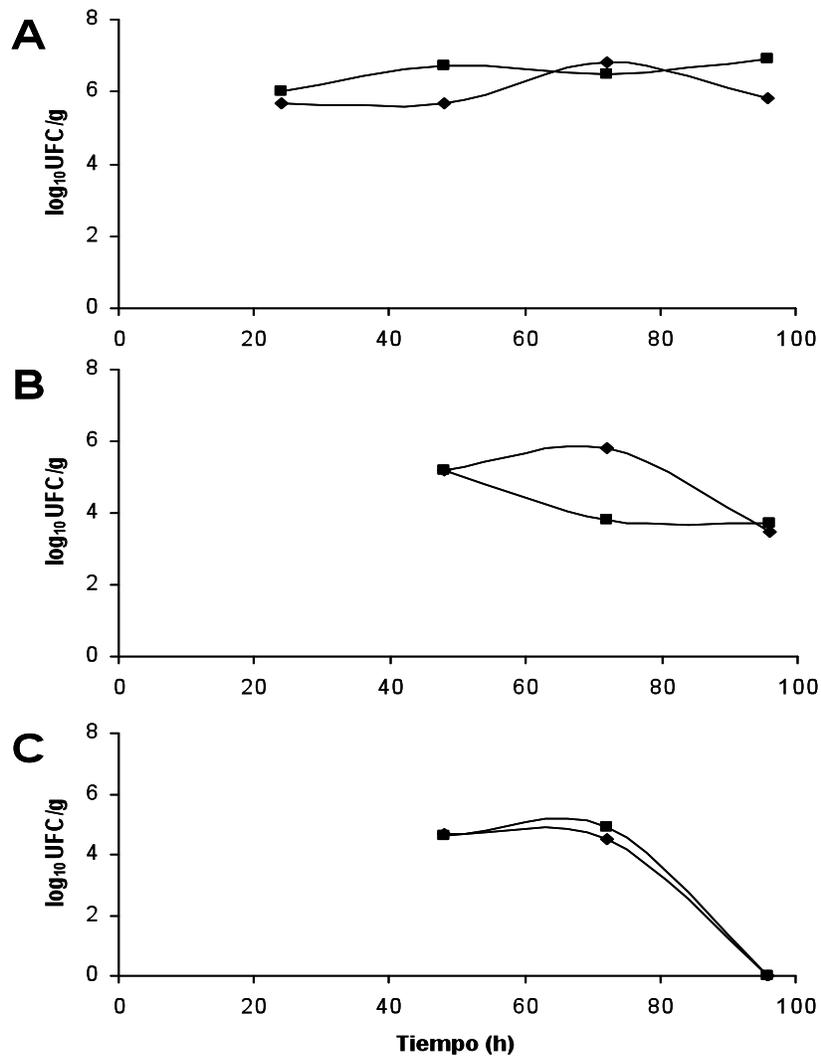


Figura 2.7 Supervivencia de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* en melón Cantaloupe inoculado con 7.5 log₁₀ UFC, almacenado en AC (3% O₂ y 12% CO₂, 85% N₂, línea-rombos) o aire (línea-cuadros) a 4.2°C. **A**, Valores de UFC registrados en corteza; **B**, en tejido de 5 mm; y, **C** en tejido de 10 mm de profundidad, respectivamente. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones, cada repetición constó de un melón.

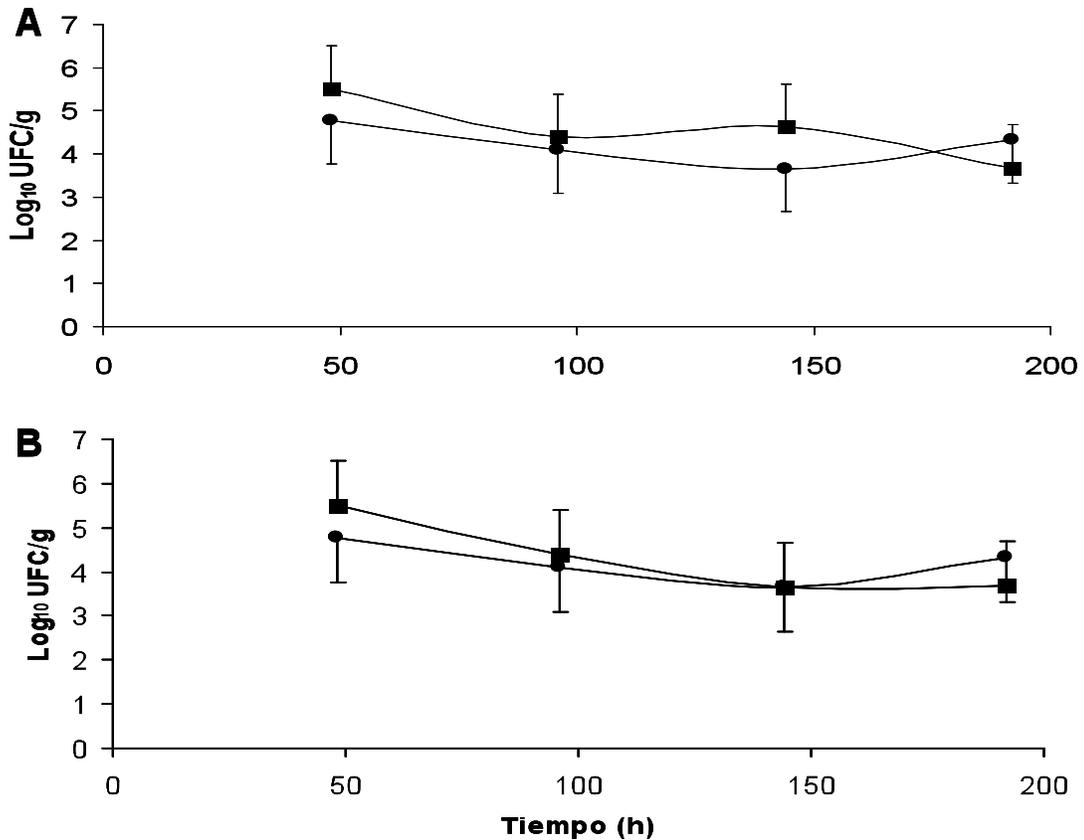


Figura 2.8 Sobrevivencia de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe almacenados a 3.7°C y 98.8% de HR. Los valores se registraron en melones almacenados en: **A**, AC₁ (3% O₂ y 12% CO₂, 85% N₂, (línea-cuadros) o aire (línea-círculos); y **B**, AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂, línea-cuadros) o aire (línea continua-círculos). Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos; cada uno constó a su vez de tres repeticiones. En **A** los melones se inocularon con 7.7 log₁₀ UFC y en **B** con 8.8 log₁₀ UFC, en promedio. Las barras representan el error estándar entre los valores.



Figura 3.1 A, Texturómetro utilizado para medir textura de melones Cantaloupe inoculados con *Rhizopus* sp., y cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium*, almacenados bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂) y aire. **B**, Potenciómetro digital con electrodo tipo aguja utilizado para medir pH del punto de inoculación sobre la superficie de melón Cantaloupe. Las mediciones de pH se hicieron después de medir la textura.

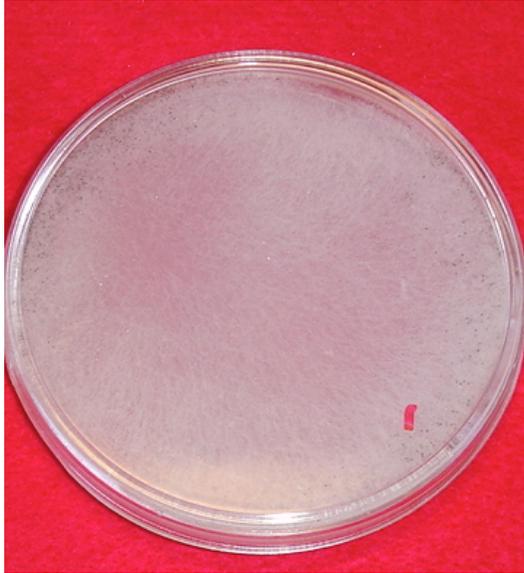


Figura 3.2 Aislamiento de *Rhizopus* sp., de 48 h de crecimiento en PDA acidificado. El hongo se recuperó de la superficie de melón Cantaloupe, después de 192 h de incubación a 3.2°C bajo AC₂.

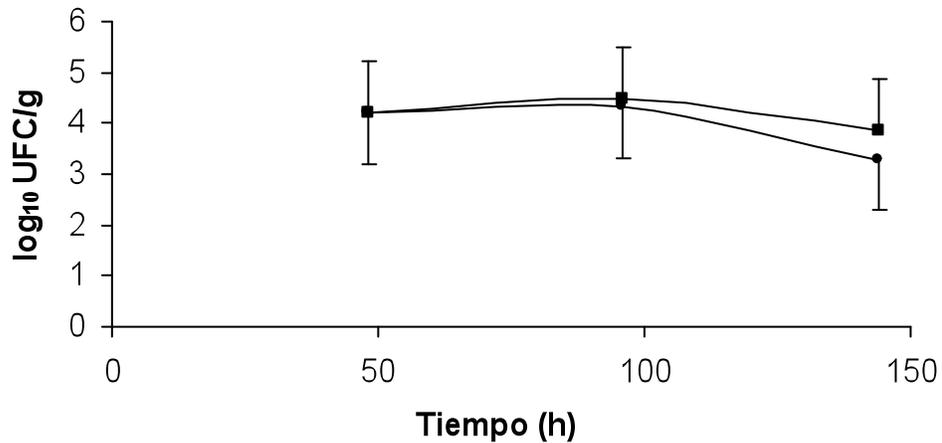


Figura 3.3 Sobrevivencia de la cepa St-3^{Km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe, previamente inoculados con 6.15×10^4 esporangioesporas, y almacenados a 3.2°C y HR 99.6% bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂, línea-cuadros) o aire (línea-círculos). Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos; cada experimento constó a su vez de tres repeticiones. Los melones se inocularon con 8.6 log₁₀ UFC en promedio. Las barras representan el error estándar entre valores.

ANEXO 1

Medios de cultivo

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Soya Trypticaseína con kanamicina (AST-Km50)

Suspender 40 g de AST (BD, Bioxón®) medio preparado en 1 L de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Enfriar a 45°C y agregar 1000 µL de la solución stock de kanamicina (50 µg/mL), agitar y vaciar en cajas Petri.

Agar entérico Hektoen con kanamicina (AEH-Km50)

Suspender 76 g de medio AEH (BD, Bioxón®) preparado en 1 litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Enfriar a 45°C y agregar 1000 µL de la solución stock de kanamicina (50 µg/mL), agitar y vaciar en cajas Petri.

Agua Peptonada Buferada a 0.1%

Suspender 0.2 g de Agua Peptonada Buferada (APB, Difco®) en 1 L de agua destilada. Mezclar bien y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Medio PDA acidificado

Pesar 200 g de papa cortada en trozos y vaciarlos en un matraz de 1 L con 500 ml de agua destilada. Colocar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Pasar el sobrenadante a

través de una gasa y recuperar en un matraz. Adicionar al sobrenadante 20 g de agar-agar y 20 g de dextrosa, mezclar bien y separar en partes iguales en dos matraces de 1 L y aforar a 500 mL. Colocar la suspensión en autoclave a 121°C por 15 minutos. Dejar enfriar a 45°C y agregar 7 mL de ácido tártrico a 10% a cada matraz.

Preparación de solución stock de kanamicina

Para preparar una solución stock de Kanamicina a 50 mg/mL, adicionar 250 mg de Kanamicina a 5 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 10 mL, previamente esterilizado, y mezclar. Filtrar la solución de kanamicina a través de un filtro Millipore® estéril. Utilizar portafiltro y aguja previamente esterilizados.

Preservación de cepas de *Salmonella* en glicerol

Crece una colonia en tubos con 5 mL de Caldo Soya Tripticaseína (TSB) con agitación a 37°C por 18 h. Después de la incubación adicionar 600 µL de la suspensión bacteriana a tubos Eppendorff con 400 µL de glicerol a 50%, previamente esterilizado. Almacenar los tubos con la bacteria a -10°C.

Pruebas de humidificación de cámara

Para humidificar mezclas de gases con 80-95% de humedad relativa (HR), se establecen pruebas preliminares con aire comprimido y mezclas con agua, glicerol y sulfato de cobre (Cu_2SO_4) en matraces Erlenmeyer de 2 L. La cantidad de agua y glicerol se va variando manteniendo constante la cantidad de Cu_2SO_4 (5 g). Para hacer la humidificación de las mezclas, los matraces con la mezcla se tapan con tapones de

caucho, cada uno con dos perforaciones, y se sellan al matraz con cinta de teflón. A través de cada perforación se conecta una varilla de vidrio (una más larga que la otra). La varilla más larga se conecta a una piedra difusora (1.5 cm x 2.5 cm) para obtener burbujas de tamaño pequeño y crear mayor eficiencia en la humidificación de las mezclas de gases. Debido a la viscosidad de la mezcla agua-glicerol, los matraces se colocan sobre parrillas para tener la mezcla en agitación constante y evitar la formación de fases, acuosa y glicerol. La varilla corta se coloca para permitir la salida del aire hacia el exterior y evitar presión dentro del matraz.

Caldo Soya Trypticaseína (CST) con kanamicina (Km) a diferentes concentraciones

Para esto se utilizan tubos de ensaye de 20 mL con 5 mL de CST y la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

a) Primera serie de tubos con CST + 12.5 µg/mL de Km

$$V_1 = \frac{(12.5 \mu\text{g} / \text{mL})(5000 \mu\text{L})}{50000 \mu\text{g} / \text{mL}} = 1.25 \mu\text{L}$$

b) Segunda serie de tubos con CST + 25 µg/mL de Km

$$V_1 = \frac{(25 \mu\text{g} / \text{mL})(5000 \mu\text{L})}{50000 \mu\text{g} / \text{mL}} = 2.5 \mu\text{L}$$

c) Tercera serie de tubos con CST + 50 µg/mL de Km

$$V_1 = \frac{(50 \mu\text{g} / \text{mL})(5000 \mu\text{L})}{50000 \mu\text{g} / \text{mL}} = 5 \mu\text{L}$$

ANEXO 2.

Cuadros

CUADROS

Cuadro 1.1 Índice respiratorio de Melón Cantaloupe a diferente temperatura de almacenamiento.

Temperatura (°C)	Respiración (ml CO ₂ /Kg-h)
0	2-3
5	4-5
10	7-8
15	17-20
20	23-33
25	65-71

Tomada de Kader (2002)

Cuadro 1.2 Composición química del aire.

Componente	Símbolo	Concentración aproximada % en volumen
Nitrógeno	N	78.03
Oxígeno	O	20.99
Dióxido de Carbono	CO ₂	0.03
Argón	Ar	0.94
Neón	Ne	0.00123
Helio	He	0.0004
Criptón	Kr	0.00005
Xenón	Xe	0.000006
Hidrógeno	H	0.01
Metano	CH ₄	0.0002
Óxido nitroso	N ₂ O	0.00005
Vapor de Agua	H ₂ O	Variable
Ozono	O ₃	Variable
Partículas		Variable

Tomada de Wikipedia, 2007.

Cuadro 1.3 Ejemplos de brotes de enfermedades causadas por diferentes serotipos de *Salmonella* asociados al consumo de productos hortofrutícolas frescos.

Serotipo de <i>Salmonella</i>	Año	País	Producto involucrado	# Casos
Chester	1990	USA	Cantaloupe	295
Javiana	1990	USA	Tomates frescos	176
Poona	1991	USA	Cantaloupe	>400
Montevideo	1993	USA	Tomates	100
Bovismorbificans	1994	Finlandia	Germinados	210
Stanley	1995	USA y Finlandia	Alfalfa	242
Newport	1995	USA y Canadá	Alfalfa	133
Saphra	1997	USA	Cantaloupe	>20
Poona	2000	USA	Cantaloupe	>19
Enteritis	2000	USA	Germinado de frijol Mung	45
Kottbus	2001	USA	Alfalfa	32

Tomados de Bell y Kyriakides, 2002.

Cuadro 2.1 Sólidos soluble totales (°Brix) en melones Cantaloupe, almacenados en AC₁^a y aire^b a 4.2°C, registrados en un refractómetro ATAGO® manual.

Tiempo (h)	AC		Aire	
	°Brix ¹	°Brix ²	°Brix ¹	°Brix ²
48	8.8	7	7	10.6
	8	8.9	11.4	6.2
	6.6	8.6	7.4	9.9
96	8.2	8.4	9.5	8.4
	13	5	12	7.8
	7	11.4	7.2	9
144	10.8	5.4	11.4	9
	11	7.8	8	9.6
	8.6	11.2	6.6	8.6
192	10	6	11	7.6
	9	10.8	8.8	8.9
	8	5.8	8.8	10.4

^aAC₁ = 3% O₂, 12% CO₂, y 85% N₂

^bAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^{1, 2} Sólidos solubles (°Brix) obtenidos de muestras obtenidas de la primera y segunda repetición respectivamente.

Cuadro 2.2 Sólidos soluble totales (°Brix) en melones Cantaloupe, almacenados en AC₂ y aire a 3.2°C, registrados en un refractómetro ATAGO® manual.

Tiempo (h)	AC ^a		Aire ^b	
	°Brix ¹	°Brix ²	°Brix ¹	°Brix ²
48	7.8	7	8.8	7.4
	9.7	8.4	6.9	8
	6.6	8.2	7.3	5.4
96	5.8	9.6	10.4	8
	12	7.2	7	8.6
	9	7.2	10.4	6.6
144	9.8	8	10.2	7
	6.6	9.4	7	8
	9.4	7.5	13.4	9
192	9	7.8	9.4	6.8
	9.2	6.2	6	7
	11.6	6.5	9	7

^aAC₂ = 5% O₂, 15% CO₂, y 80% N₂

^bAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^{1, 2}°Brix obtenidas de la primera y segunda repetición respectivamente.

Cuadro 3.1 Sólidos solubles (°Brix), pH y textura de melones Cantaloupe inoculados con *S. Typhimurium* + *Rhizopus* sp y sin inocular, almacenados en AC₂^a y aire^b a 3.8 °C. Se indican las UFC de *Salmonella* obtenidas y la recuperación del hongo después del almacenamiento, al tiempo indicado. Cada 48 h se analizaron tres melones.

Tiempo (h)	°Brix	pH		Textura		log ₁₀ UFC	Recuperación Hongo ^c
		Sin inocular	Inoculado ^c	Sin inocular	Inoculado ^c		
AC₂							
48	10.8	**	**	**	**	3.0	Si
48	10.8	**	**	**	**	4.3	Si
48	13.6	**	**	**	**	4.2	Si
96	11.0	**	6.3	773.0	877.7	3.6	
96	12.8	**	6.2	414.0	475.6	3.5	Si
96	11.0	**	6.3	592.0	582.5	3.5	Si
144	13.2	**	6.7	748.6	617.7	4.0	
144	13.4	**	6.9	502.9	722.6	4.0	Si
144	8.6	**	6.8	869.5	889.4	2.6	Si
Aire							
48	12.6	**	**	**	**	3.5	Si
48	12.0	**	**	**	**	5.1	Si
48	10.2	**	**	**	**	3.0	
96	11.4	**	6.2	718.6	771.5	3.9	Si
96	10.0	**	6.3	478.2	544.1	4.0	Si
96	11.8	**	6.4	786.5	804.5	3.0	
144	10.4	**	6.4	596.0	411.2	2.3	Si
144	12.2	**	6.3	557.2	641.5	2.9	Si
144	8.4	**	6.2	1049.5	1083.7	2.9	

^aAC₂ = 5% O₂, 15% CO₂, y 80% N₂

^bAire = 21% O₂, 0.03% CO₂ y 75% N₂

^c=Gota de 40 µL con 2.15x10⁶ esporas/mL, y gota de 100 L con 8.6 log₁₀UFC

^d = En PDA acidificado

Cuadro 3.2 Sólidos solubles (°Brix), pH y textura de melones Cantaloupe inoculados con *S. Typhimurium* + *Rhizopus* sp y sin inocular, almacenados en AC₂^a y aire^b a 3.8 °C. Se indican las UFC de *Salmonella* obtenidas y la recuperación del hongo después del almacenamiento, al tiempo indicado. Cada 48 h se analizaron tres melones y HR.

Tiempo	°Brix	pH		Textura		log ₁₀ UFC	Recuperación Hongo ^d
		Sin inocular	Inoculado ^c	Sin inocular	Inoculado		
AC₂							
48	10.0	**	6.6	311.0	680.6	4.4	Si
48	11.8	**	6.4	1036.3	647.6	5.1	Si
48	10.2	**	6.4	139.1	562.1	4.4	Si
96	8.4	6.4	6.5	640.2	830.4	4.9	Si
96	9.6	6.2	6.4	746.3	689.0	3.5	Si
96	7.6	6.4	6.4	668.7	591.0	4.1	Si
144	9.8	6.6	6.4	647.1	685.7	3.7	Si
144	11.8	6.5	6.3	891.2	662.6	5.0	Si
144	9.0	6.4	6.3	565.0	752.3	3.8	Si
Aire							
48	7.2	**	6.2	860.1	470.7	4.0	Si
48	10.6	**	6.2	791.9	809.7	4.0	Si
48	8.8	**	6.1	826.4	578.0	4.6	Si
96	7.6	6.6	6.1	451.3	454.4	5.0	Si
96	9.6	6.1	6.2	712.0	672.0	5.2	Si
96	12.2	6.5	6.2	856.3	896.5	4.8	Si
144	8.4	6.4	6.5	636.9	397.9	3.4	Si
144	8.8	6.3	6.2	724.1	965.5	4.6	Si
144	9.4	6.4	6.4	603.5	610.2	3.6	Si

^aAC₂ = 5% O₂, 15% CO₂, y 80% N₂

^bAire = 21% O₂, 0.03%CO₂y 75% N₂

^c=Gota de 40 µL con 4.64 x10⁶ esporas/mL, y gota de 100 L con **8.6 log₁₀UFC**

^d=En PDA acidificado

ANEXO 3.

Figuras

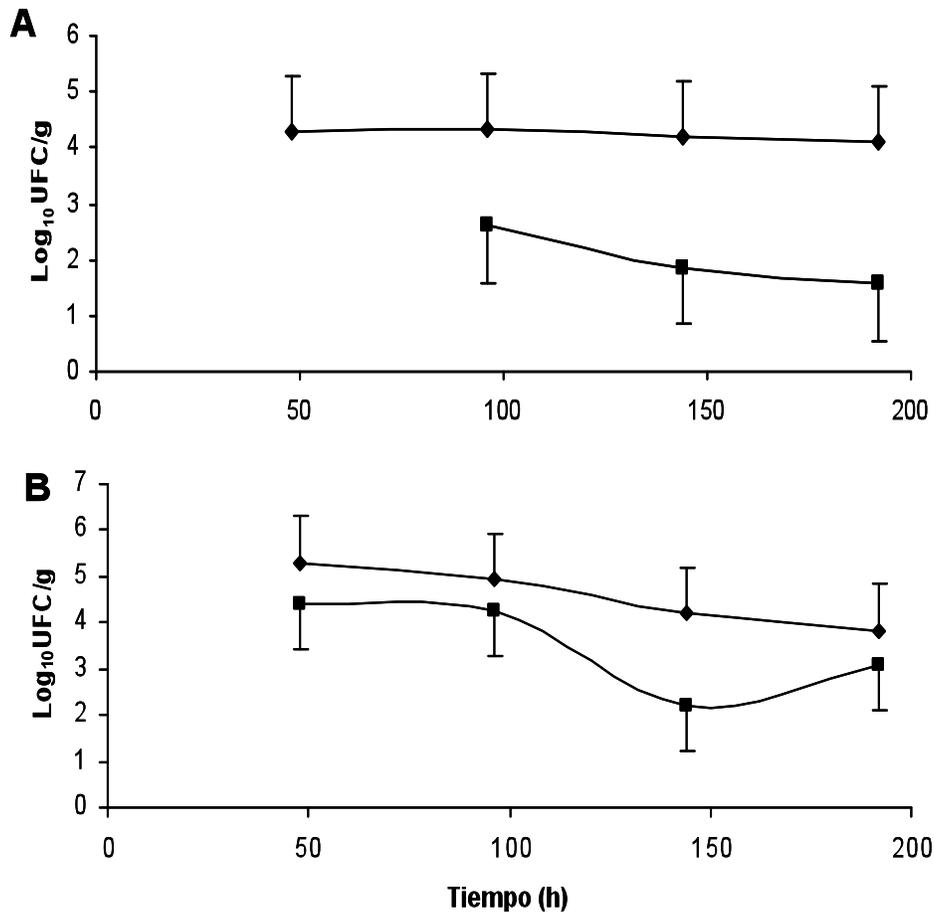


Figura 2.1 Sobrevivencia de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe almacenados a 4.2°C y 99.28% de HR. Los valores se registraron en melones almacenados bajo AC₁ (3% O₂ y 12% CO₂, 85% N₂, línea-rombos) o aire (línea-cuadros). **A** y **B** representan los valores obtenidos en el primer y segundo experimento, cada experimento constó de tres repeticiones. En **A** los melones se inocularon con 7.7 log₁₀ UFC y en **B** con 8.8 log₁₀ UFC, en promedio. Las barras representan el error estándar entre valores.

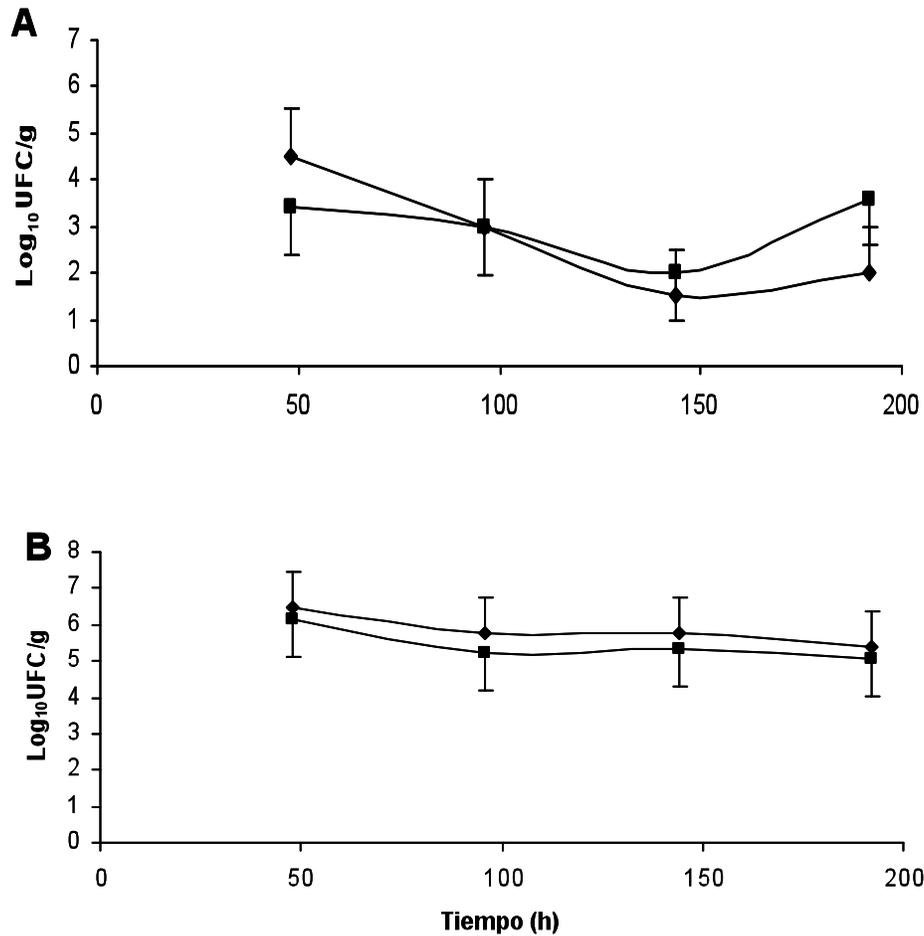


Figura 2.2 Sobrevivencia de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe almacenados a 3.2°C y 98.3% de HR. Los valores se registraron en melones almacenados bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂, línea-rombos) o aire (línea-cuadros). **A** y **B** representan los valores obtenidos en el primer y segundo experimento, cada experimento constó de tres repeticiones. En **A** los melones se inocularon con 7.7 log₁₀ UFC y en **B** con 8.8 log₁₀ UFC, en promedio. Las barras representan el error estándar entre valores.

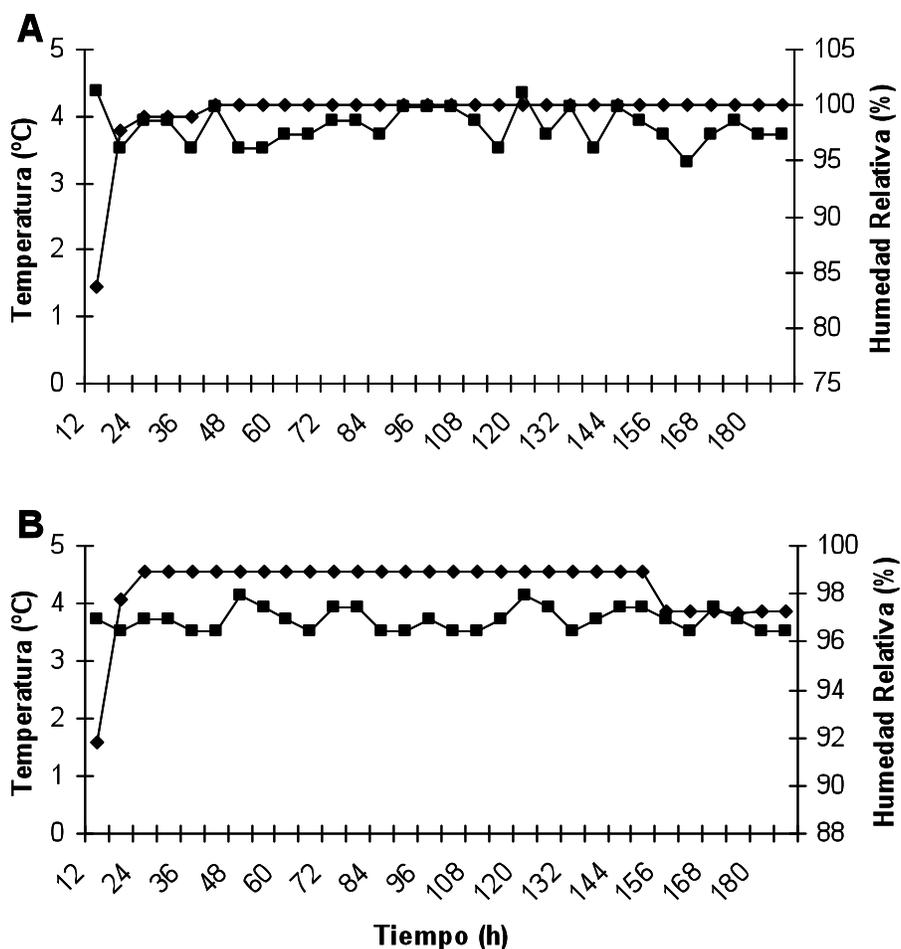


Figura 2.3 Temperatura (cuadros) y humedad relativa (rombos) promedio dentro de las cámaras donde se colocaron los melones Cantaloupe. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada seis h por ocho días. En **A** se muestran los valores promedio registrados en cámaras con AC₁ (3% O₂ y 12% CO₂ y 85% de N₂); y en **B**, los valores promedio registrados en cámaras con AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂ y 80% de N₂). Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos.

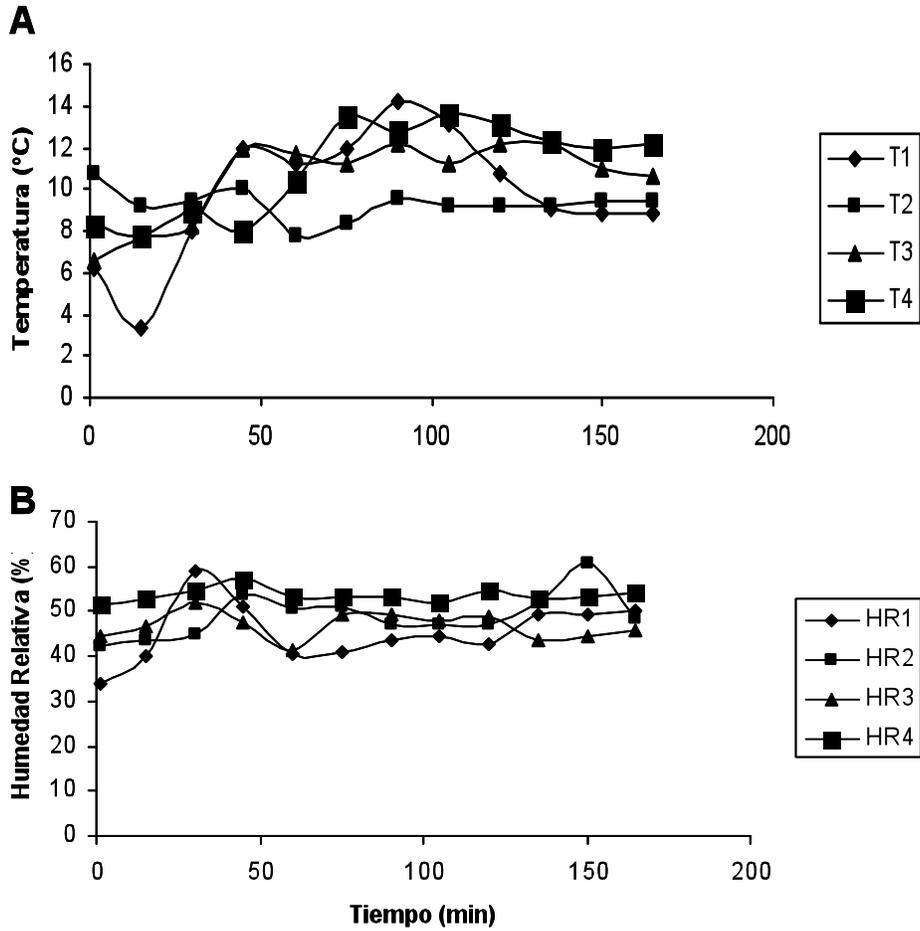


Figura 2.4 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de la hielera para transportar en hielo bolsas con tejido de melón Cantaloupe, almacenado bajo AC₁ (3% O₂ y 12% CO₂, 85% N₂) a 3.8 °C y 99.3% de HR. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada 15 min. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos. T₁, T₂, T₃, y T₄, y HR₁, HR₂, HR₃ y HR₄, representan los valores promedio obtenidos de los muestreos realizados a las 48, 72, 144 y 192 h, en cada experimento.

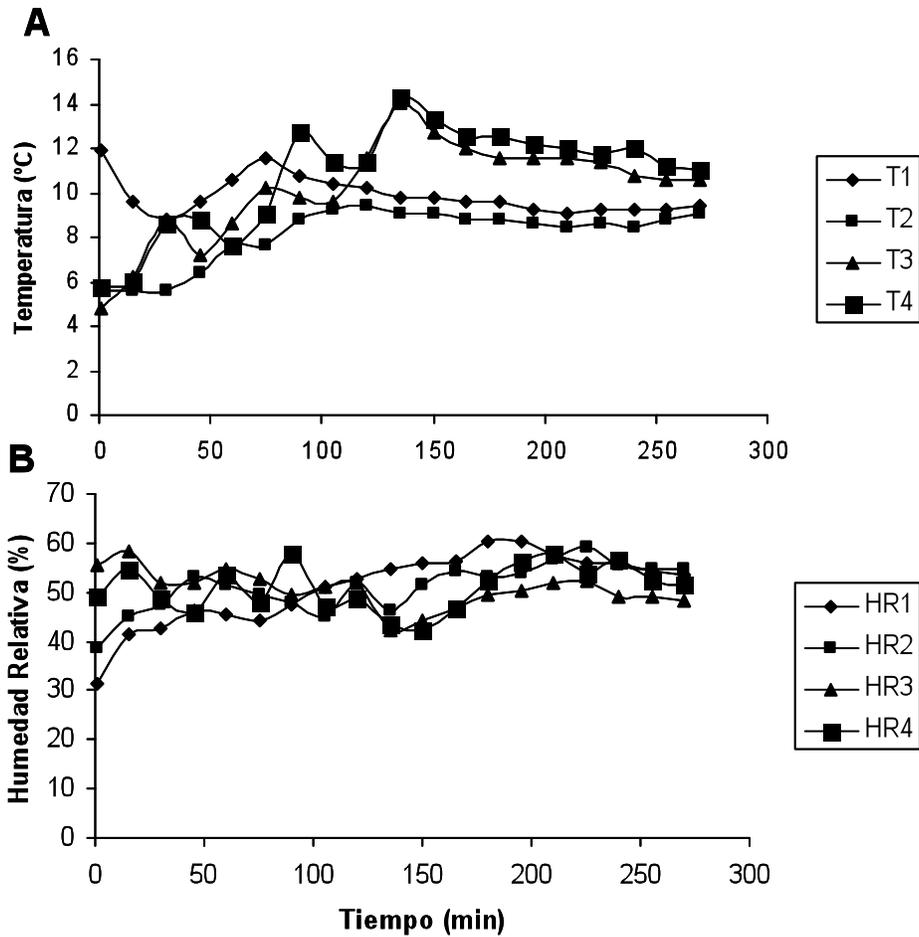


Figura 2.5 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de la hielera para transportar en hielo bolsas con tejido de melón Cantaloupe, almacenados bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂) a 4°C y 98.3% de HR. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada 15 min. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos; y, T₁, T₂, T₃, y T₄, y HR₁, HR₂, HR₃ y HR₄, los valores promedio registrados de los muestreos realizados a las 48, 72, 144 y 192 h, en cada experimento.

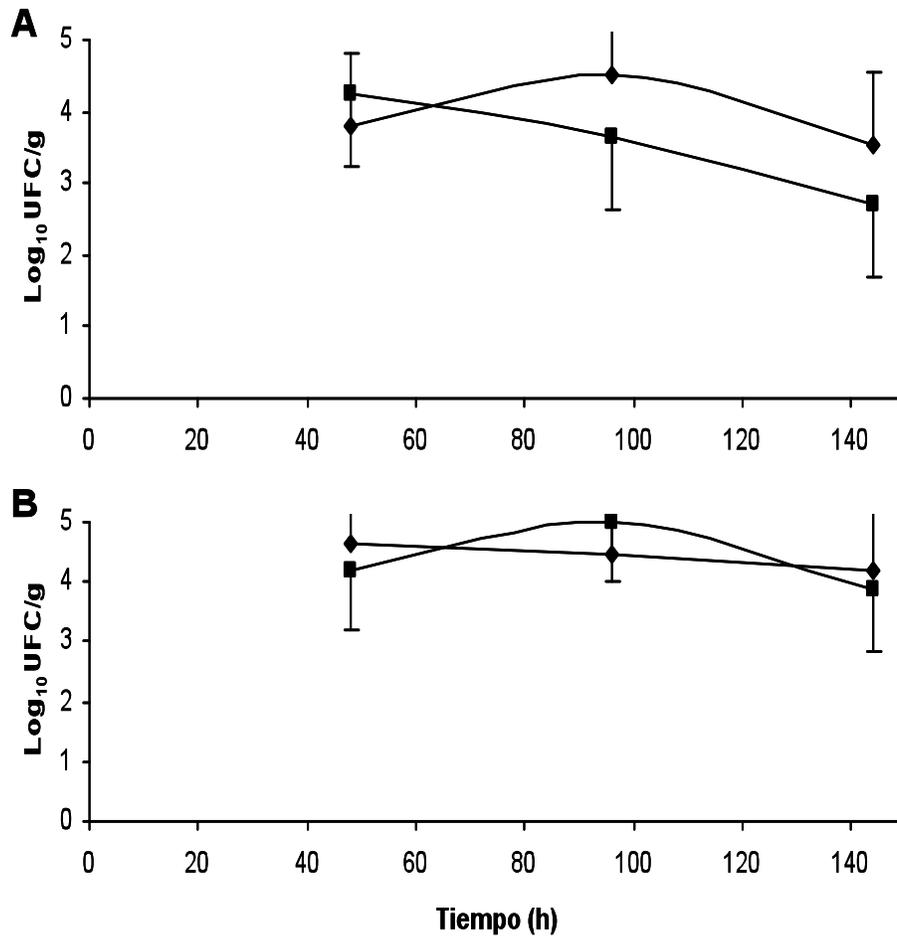


Figura 3.1 Sobrevivencia de la cepa St-3^{km50} de *S. Typhimurium* en la superficie de melones Cantaloupe, previamente inoculados con 6.14×10^4 esporas, y almacenados a 3.8°C bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂, línea-rombos) o aire (línea-cuadros). A y B representan los valores obtenidos en el primer y segundo experimento respectivamente, cada experimento constó a su vez de tres repeticiones. Los melones se inocularon con 8.6 log₁₀ UFC en promedio. Las barras representan el error estándar entre los valores.

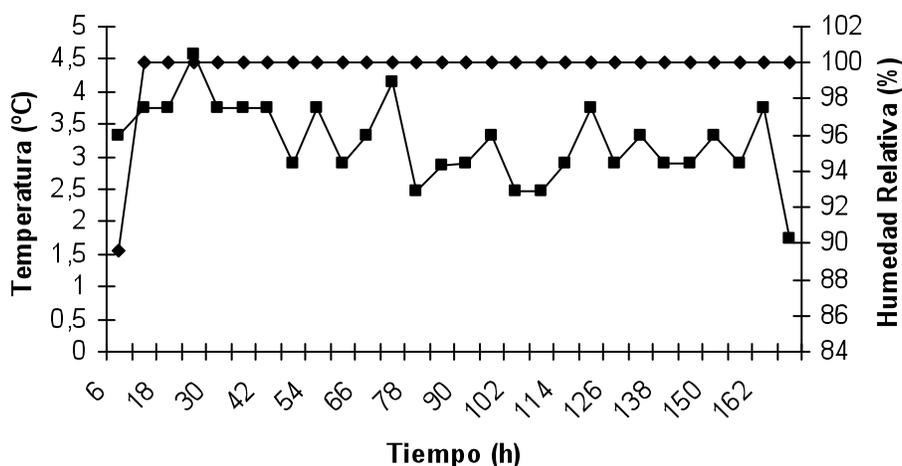


Figura 3.2 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de las cámaras donde se colocaron los melones Cantaloupe inoculados con *S. Typhimurium* y *Rhizopus* sp., y mantenidos bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂ y 80% de N₂). Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada seis h por ocho días. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos y, T₁, T₂, y T₃; y HR₁, HR₂ y HR₃, los valores promedio registrados de los muestreos realizados a las 48, 72 y 144 h, en cada experimento.

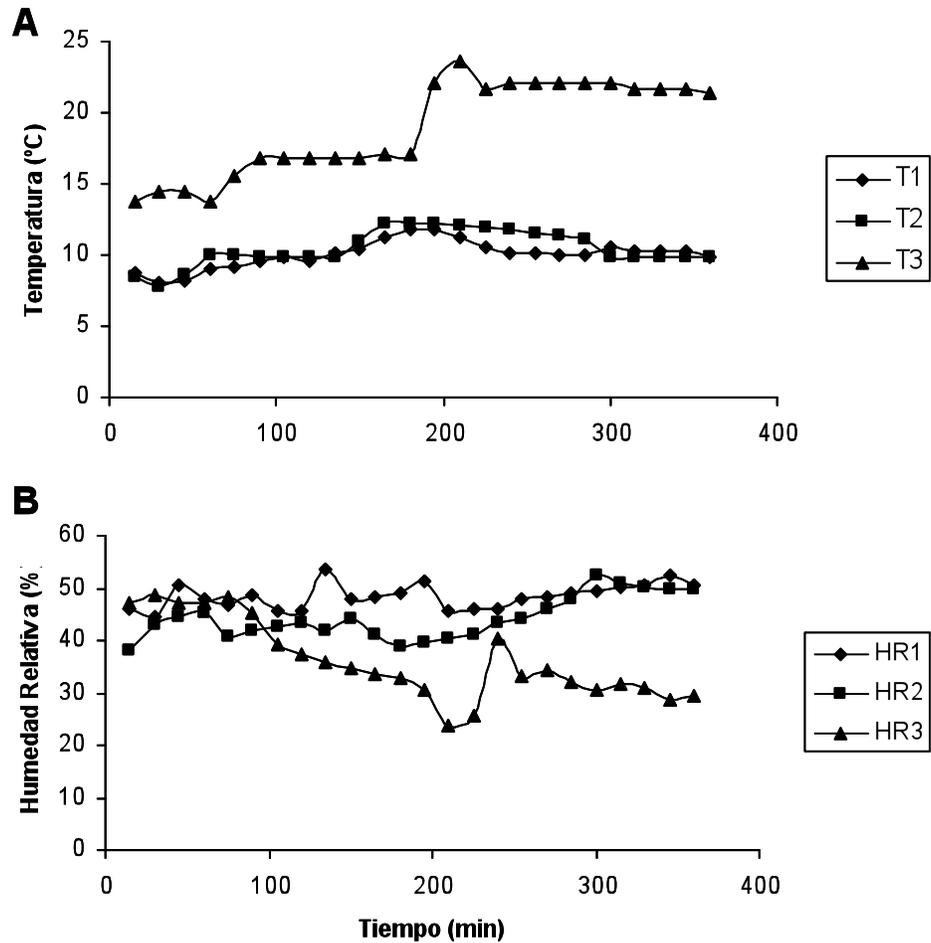


Figura 3.3 Temperatura y humedad relativa (HR) promedio dentro de la hielera para transportar en hielo bolsas con tejido de melón Cantaloupe inoculados con *S. Typhimurium* y *Rhizopus* sp mantenidos bajo AC₂ (5% O₂ y 15% CO₂, 80% N₂) a 3.8°C y 99.6% de HR. Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HR (datalogger HOBO®) programado para tomar lecturas cada 15 min. Cada valor representa el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos y, T₁, T₂, y T₃; y HR₁, HR₂ y HR₃, los valores promedio registrados de los muestreos realizados a las 48, 72 y 144 h, en cada experimento.