



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

EFFECTIVIDAD DE EXTRACTOS DE CÁLCICES DE JAMAICA, MEZCLA DE VINAGRE-LIMÓN Y ÁCIDO LÁCTICO PARA ELIMINAR A *Salmonella* EN NOPAL VERDURA FRESCO SIN ESPINAS

CHRISTIAN ALBERTO MORENO RODAS

T E S I S

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

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Christian Alberto Moreno Rodas, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. Ana María Hernández Anguiano, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis EFFECTIVIDAD DE EXTRACTOS DE CÁLICES DE JAMAICA, MEZCLA DE VINAGRE-LIMÓN Y ÁCIDO LÁCTICO PARA ELIMINAR A SALMONELLA EN NOPAL VERDURA FRESCO SIN ESPINAS

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 18 de junio de 2019



Firma del
Alumno (a)



Dra. Ana María Hernández Anguiano
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Efectividad de extractos de cálices de jamaica, mezcla de vinagre-limón y ácido láctico para eliminar a *Salmonella* en nopal verdura fresco sin espinas**, realizada por el alumno: **Christian Alberto Moreno Rodas** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

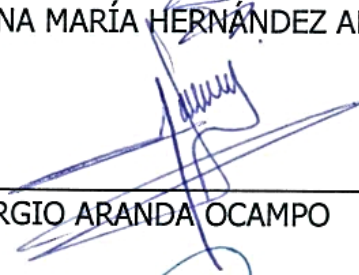
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. ANA MARÍA HERNÁNDEZ ANGUIANO

ASESOR



DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

ASESOR



DR. JAVIER SUÁREZ ESPINOSA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2019

EFFECTIVIDAD DE EXTRACTOS DE CÁLICES DE JAMAICA, MEZCLA DE VINAGRE-LIMÓN Y ÁCIDO LÁCTICO PARA ELIMINAR A *Salmonella* EN NOPAL VERDURA FRESCO SIN ESPINAS

Christian Alberto Moreno Rodas, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Durante la producción y el manejo postcosecha del nopal verdura se presentan numerosos riesgos de contaminación por patógenos como *Salmonella* que comprometen la inocuidad de este producto. Contar con una solución antimicrobiana (sanitizante) efectiva que elimine a estos patógenos es importante para asegurar que el consumo de nopal verdura fresco no represente un peligro para la salud humana. Por lo anterior el objetivo general de este trabajo fue identificar un sanitizante para eliminar a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (*Salmonella*) de nopal verdura fresco sin espinas. Para esto se evaluó la efectividad de extractos (acetónico, acuoso y metanólico y) de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), de una mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) y del ácido láctico al 1.5 % en cladodios de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura sin espinas inoculados con una mezcla de cepas de los serotipos Javiana (cepas N4 y N14), y Typhimurium (cepas N16 y Sal4) de *Salmonella*. Después del tratamiento por inmersión durante 10 min con los sanitizantes por separado se registró reducción significativa ($P \leq 0.05$) de 2.4 Log_{10} mL, en promedio, en la población de *Salmonella*. Aunque con la mezcla de vinagre y jugo de limón la luminosidad del tejido resultó afectada ($P \leq 0.05$) todos los sanitizantes aquí probados podrían ser una alternativa para la inocuidad microbiana del nopal verdura fresco sin espinas.

Palabras clave: Cactus, *Salmonella*, Sanitizantes, *Opuntia ficus-indica*

EFFECTIVENESS OF ROSELLE CALYX EXTRACTS, MIXING VINEGAR-LEMON AND LACTIC ACID TO ELIMINATE TO *Salmonella* IN FRESH CACTUS PADS WITHOUT SPINES.

Christian Alberto Moreno Rodas, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

During production and postharvest handling of in fresh cactus pads there is a risk of contamination by pathogens such as *Salmonella* that compromise the safety of this vegetable. Having an effective antimicrobial (sanitizer) solution that eliminates the pathogen population is important to ensure that the consumption of fresh cactus pads does not represent a danger to human health. The main goal of thies research was to identify a sanitizer to eliminate to *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in fresh cactus pads without spines. To fulfill this goal, (acetonic, aqueous and methanolic) of rosselle calyx extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.), a mixture of vinegar and lemon juice 1: 1 (v / v) and lactic acid 1.5% were evaluated on cladodes of Atlixco, Copena V1, Milpa Alta and Villanueva varieties of cactus pads without spines inoculated with a mixture of strains of the serotypes Javiana (strains N4 and N14), and Typhimurium (strains N16 and Sal4) of *Salmonella*. After an immersion of nopales in the treatments for 10 minutes it was observed that sanitizers significantly reduced ($P \leq 0.05$) by 2.4 Log_{10} mL, on average, *Salmonella* population. The mixture of vinegar and lemon juice reduced luminosity of the tissue ($P \leq 0.05$). The sanitizers tested are an alternative to assure the microbial innocuousness of the fresh cactus pads without spines.

Keywords: Cactus, *Salmonella*, Sanitizers, *Opuntia ficus-indica*

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por otorgarme por la beca 461807 para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados por abrirme las puertas y por el apoyo brindado.

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y por darme salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Al Sr. Marcos† y a la Sra. Fulvia por darme el don más grande; el de la vida.

A mis padres Rodolfo y Virginia por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano por su tiempo y reafirmarme lo que algún día dijo Albert Einstein “No es el resultado de la investigación científica que ennoblece a los seres humanos y enriquece su naturaleza, sino la lucha por entender mientras realiza un trabajo intelectual creativo y de mente abierta”.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo por alentarme, escucharme y sobre todo por los consejos que me dio durante mi estancia en el Colegio. Siempre admirare su calidad humana.

Al Dr. Javier Suárez Espinosa, por su asesoramiento y por darme parte de su conocimiento para que yo pudiera terminar este proceso en mi vida.

Al Dr. Serafin Cruz Izquierdo por todo el tiempo que ha compartido para mi formación, por su inmensa humildad y sobre todo por servirme como ejemplo para siempre colaborar con las personas que más lo necesitan. Es un gusto y honor haber coincidido con usted.

Al Dr. Javier Castro Rosas por donar los extractos de jamaica para mi investigación.

A la Dra. Patricia Landa por ayudarme en la parte fundamental de mi experimento, además por todos los “Tip´s” que me obsequio durante el tiempo que estuvimos en el laboratorio.

A la comunidad académica del COLPOS y de la UACH, en especial a Vicente López, Cristian Nava Díaz, Cesar Ramírez, Ma. Carmen Mendoza, Daniel Ochoa, Ángel Takeo por todas sus charlas y consejos.

A Ricardo, Edith y Aldo porque nunca me negaron su compañía en los días más oscuros, sus consejos cuando perdía el camino, su apoyo cuando no tenía un hombro donde llorar y sobre todo porque siempre tenían para mí amor y cariño.

A mis hermanos Ciro, Lupita y José por creer en mí.

A mis tíos: Mary, Armando, Ciro, Rodolfo, Lety, Aní y Jorge, por demostrarme que ser papá no implica concebir y dar a luz, ser papá va más allá de eso. Gracias a todos por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y por su incondicional apoyo para que yo culminara mis estudios de maestría ¡los amo!

A Karla y Gina por darme el “título de hermano mayor” y transmitirme siempre esa alegría.

A mis tías Aidi y Yanet que, por la admiración y aliento que me han demostrado.

A la familia Flores Almaraz y a Joselyn por toda su hospitalidad y amistad que me han ofrecido estos 6 años.

Al Ing. Arturo Alfaro Maldonado, porque desde que llegue a Chapingo siempre me ha dado apoyo y ha velado por mi bienestar, además me ha enseñado que la marca esencial que distingue a un hombre digno de llamarse así, es la perseverancia en las situaciones adversas y difíciles.

A mis amigos sobre todo a Marco, Blanca, Viridiana, Daniel G., Herminio, Marley, Coral, Honelver, Sneyder, Liz, José Ramón, Frinet, Diego, Eridani, Juan Arturo, Miguel, Jazmín, Isaí, Denisse, Tania, Rosario, Guillermo, Andrea, Isabel, Betty, Gabriel, Liliana, Laura, Miriam, Magaly, Ángel, Alfredo, Hylenne, Vero, Santiago, Janitzio, Verónica, Estrada, Lupita y Sandra por todos los gratos momentos, por su compañía y cariño que me demostraron en todo el camino, llamada vida ¡los quiero!

Al personal administrativo de Fitosanidad en especial a Hilda, Nancy, Ericka, Tania, Elvia, Claudia, Iris y Vero por todo el apoyo que me dieron durante mi estancia en el Colegio. ¡Siempre las recordare!

A los compañeros que coincidieron con mi estancia en el COLPOS durante la primavera de 2017 y verano 2019. Entre ellos Mariel y Mirna con las cuales conviví en el Laboratorio 222.

Y a todas esas personas que por motivo de memoria y espacio no mencione ¡gracias!

Christian

Dedicatoria:

A lo más importante y hermoso que tengo en esta vida; mi familia, en especial a los pequeños; Diego, Matías, Kenia Sofía, Alejandro Elías, Mariza Sofía, Anneli y sobre todo a mis ahijadas Keromi y Lía Valeria para que este logro sea motivo de inspiración para superarse, ser mejor cada día y luchar por su satisfacción personal.

Con Todo Mi Amor

Christian

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2.MARCO DE REFERENCIA.....	3
2.1. Nopal.....	3
2.1.1. Descripción botánica y clasificación taxonómica del nopal.....	3
2.1.2. Composición química.....	6
2.1.3. Manejo postcosecha	8
2.2. Situación actual de <i>Salmonella</i>	8
2.2.1. Morfología y taxonomía	8
2.2.2. Hábitat	9
2.2.3. Brotes epidemiológicos.....	10
2.2.4. Sanitizantes empleados para eliminar a <i>Salmonella</i>	11
3.HIPÓTESIS	19
4.OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos particulares.....	20
5.MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Producción de cladodios	21
5.2. Cosecha de cladodios y estimación de parámetros	22
5.3. Reactivación de cepas de <i>Salmonella</i>	24
5.4. Inducción de resistencia a Kanamicina	25
5.5. Preparación de inóculo de <i>Salmonella</i>	25
5.6. Inoculación de cladodios con <i>Salmonella</i>	26
5.7. Sanitizantes.....	27
5.8. Tratamiento de cladodios	29

5.9. Evaluación microbiana	30
5.10. Efecto del sanitizante en el color del nopal verdura	31
5.11. Análisis estadístico.....	31
6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1. pH y características físicas.....	33
6.2. Efecto microbicida de sanitizantes en nopal verdura fresco.....	37
6.2.1. Variedad Atlixco	37
6.2.2. Variedad Copena V1.....	39
6.2.3. Variedad Milpa alta	41
6.2.4. Variedad Villanueva	43
6.3. Efecto microbicida de sanitizantes en variedades de nopal verdura	45
6.4. Efecto microbicida de sanitizantes en variedades de nopal verdura	55
7.CONCLUSIONES.....	61
8.BIBLIOGRAFÍA.....	62
A N E X O S	72
Anexo A: Medios	73
Anexo B: Composición de los extractos a base de cáliz de jamaica [‡]	75
Anexo C: Códigos de análisis estadísticos en el programa R.	76

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Propiedades fisicoquímicas de cladodios de <i>Opuntia ficus-indica</i> de 1 a 4 meses cosechados antes de las 10 de la mañana.	7
Cuadro 2.2. Características de antimicrobianos empleados en productos hortofrutícolas y superficies.	13
Cuadro 5.1. Relación de tratamientos aplicado al nopal verdura fresco sin espinas. ...	28
Cuadro 6.1. Valores comparativos de pH de tejido de cladodios evaluados de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva..	34
Cuadro 6.2. Valores mínimo, máximo y promedio de variables físicas y pH de cladodios de variedades de nopal verdura después de la cosecha.....	36
Cuadro 6.3. Análisis de correlación de longitud, peso y pH de los cladodios de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura, crecidas en invernadero.	36
Cuadro 6.4. Población de <i>Salmonella enterica</i> en cladodios de nopal variedad Atlixco tratados por inmersión.	38
Cuadro 6.5. Población de <i>Salmonella enterica</i> en cladodios de nopal variedad Copena V1 tratados por inmersión.	40
Cuadro 6.6. Población de <i>Salmonella enterica</i> en cladodios de nopal variedad Milpa alta tratados por inmersión.	42
Cuadro 6.7. Población de <i>Salmonella enterica</i> en cladodios de nopal variedad Villanueva tratados por inmersión.....	44
Cuadro 6.8. Comparación de la población de <i>Salmonella</i> recuperada y del efecto del tratamiento por variedad de nopal.	47
Cuadro 6.9. Comparación del efecto de la interacción sanitizante-variedad de nopal verdura en la reducción de la población de <i>Salmonella</i>	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Dendrograma elaborado para <i>Opuntia</i> por Valadez <i>et al.</i> (2015) donde se utilizó el coeficiente de Nei y Li / Dice y el método Bootstrap con 1,000 repeticiones	5
Figura 5.1. Variedades de nopal verdura a tres meses del trasplante en suelo composteado y macetas de polietileno en invernadero.	21
Figura 5.2. Cladodios de las variedades de nopal verdura fresco con espinas de tres semanas de crecimiento en invernadero.	23
Figura 5.3. Descripción grafica de la sección delimitada para la aplicación del inoculo y distribución del mismo..	27
Figura 5.4. Aplicación de mezcla bacteriana en nopal verdura en cámara de bioseguridad clase II (Thermo forma).	27
Figura 5.5. Colonias típicas de <i>Salmonella</i> en Agar entérico Hektoen con Km ⁵⁰ de 72 h de crecimiento.	31
Figura 6.1. Efectividad de tratamientos en la población de <i>Salmonella</i> en variedad Atlixco de nopal verdura sin espina..	39
Figura 6.2. Efectividad de tratamientos en la población de <i>Salmonella</i> en variedad Copena V1 de nopal verdura sin espinas..	41
Figura 6.3. Efectividad de tratamientos en la población de <i>Salmonella</i> en variedad Milpa alta de nopal verdura sin espinas.....	43
Figura 6.4. Efectividad de tratamientos en la población de <i>Salmonella</i> en variedad Villanueva de nopal verdura sin espina.	45
Figura 6.5 Luminosidad del tejido de nopal verdura después del tratamiento con sanitizante o agua destilada.	56
Figura 6.6. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Atlixco.	57
Figura 6.7. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre y jugo de	

limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Copena V1.....	58
Figura 6.8. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Milpa alta.	59
Figura 6.9. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre blanco y limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Villanueva.	60

1. INTRODUCCIÓN

En México se han descrito más de 100 especies de nopales silvestres y cultivados, de las cuales un alto porcentaje son aptas para el consumo humano como verdura fresca (nopalitos). En el año 2016 se cosecharon 798 mil toneladas de nopalitos (*Opuntia ficus-indica* L. (Mill.)) en 25 estados de la república, siendo Morelos y la Ciudad de México los más representativos (SIAP-SAGARPA, 2017). De los problemas que se enfrentan en la producción de nopal verdura son las múltiples fuentes de contaminación microbiológica durante la producción y manejo del cultivo. *Salmonella enterica* se encuentra entre los principales microorganismos enteropatógenos que contaminan el nopal verdura fresco (Hernández *et al.*, 2009). Esta bacteria es responsable de ocasionar numerosos brotes de enfermedades asociados al consumo de productos hortofrutícolas (Ramos *et al.*, 2013). En México en el año 2018 se reportaron 79 659 casos de salmonelosis, lo que sugiere la implementación de buenas prácticas agrícolas en la producción y manejo de alimentos mínimamente procesados (SSA, 2018). En el caso del nopal verdura es difícil asegurar su inocuidad por las numerosas fuentes de contaminación durante su producción y manejo postcosecha (corte, desespinado y empaque manual) por lo que se requiere un sanitizante efectivo que elimine a *Salmonella* y asegure que el consumo de nopalitos no represente un peligro para la salud humana. De los Santos *et al.* (2012) indicaron que el hipoclorito de sodio (200 ppm) y el ácido láctico (1.5 %) inhiben el crecimiento de *Salmonella in vitro*. Sin embargo, Hernández y Landa (2016) reportaron que el hipoclorito de sodio, así como otros productos comerciales a base de cítricos y plata coloidal fueron inefectivos para eliminar a *Salmonella* en cladodios de nopal verdura sin espinas inoculados artificialmente.

Contar con un sanitizante efectivo que elimine a *Salmonella* es deseable debido a que el nopal verdura se consume en fresco por sus beneficios a la salud de las personas. Varios autores coinciden que los cálices de jamaica tienen actividad sanitizante contra bacterias enteropatógenas (Jaroni y Ravishankar, 2012; Liu *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2017). Al respecto, Rangel *et al.* (2017) reportaron que extractos de jamaica redujeron la población entre 2 y 2.5 log₁₀ de *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, y *S. Montevideo* en Chile (*Capsicum annum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*). Por su parte, Hernández y Landa (2016) reportaron que el ácido láctico (1.5 %) redujo en 4.3 log₁₀ de UFC la población de *Salmonella* en cladodios de nopal verdura, variedad Milpa alta; y, Sengun y Karapinar (2004) encontraron que la mezcla de vinagre y jugo de limón (*Citrus latifolia* Tanaka) 1:1 (v/v) redujo la población de *S. Typhimurium* a nivel indetectable en vegetales para ensaladas. Por lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue identificar una sanitizante para eliminar a *Salmonella entérica* subespecie entérica de nopal verdura fresco sin espinas; y como objetivos específicos evaluar la efectividad de los extractos acuoso, metanólico y acetónico de cálices de jamaica al 1 % (*Hibiscus sabdariffa* L.), de una mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) y del ácido láctico al 1.5 % para eliminar a *S. entérica* en cladodios de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta, y Villanueva de nopal verdura fresco sin espinas.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. Nopal

El nopal (*Opuntia ficus-indica*) es una planta que se desarrolla en climas tropicales, subtropicales, áridos y semiáridos y que tiene gran capacidad de adaptación a condiciones adversas como temperatura extremas y tipos de suelo. Su distribución incluye el Continente Americano, Sudáfrica, Australia y países del Mediterráneo, siendo México el centro de origen y el mayor centro de diversidad de la especie (Barazarte *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2010).

De la planta del nopal se aprovechan los cladodios (tallos modificados), frutos y flores con fines culinarios, farmacéuticos e industriales (Reyes *et al.*, 2009; Peña-Valdivia *et al.*, 2012). Los cladodios comúnmente llamados “nopalitos” se encuentran incluidos en la dieta humana debido a que aportan bajo valor calórico, alto contenido de fibra y cualidades nutricionales y funcionales (Stintzing y Carie, 2005; Sáenz, 2004). Aunque tradicionalmente esta hortaliza se consume en México, actualmente su demanda se ha incrementado en Estados Unidos, Bélgica, Canadá, Corea del sur, Dinamarca y Países bajos. En el año 2016 México exportó 44 768 t equivalentes al 5.6 % de la cosecha total nacional y el doble del comercializado en el año 2010 (21 117 t). En producción nacional, Morelos se mantuvo como el principal productor con 45.3%, seguido por la Ciudad de México que aportó 25.2% del total nacional (SIAP, 2017).

2.1.1. Descripción botánica y clasificación taxonómica del nopal

Históricamente se han descrito entre 60 y 100 especies de nopales silvestres y cultivados (Conabio, 2010; Scheinvar y Gallegos, 2011). *Opuntia ficus-indica* es la especie de mayor importancia económica y alimenticia (6.4 kg per cápita anual). Esta especie cuenta

con un gran número de variedades entre las que se encuentran Milpa alta, Atlixco, Copena V1 y Villanueva utilizadas comúnmente para consumo humano como verdura o jugos (SIAP, 2017). Debido a la alta variación genética intraespecífica. se ha sugerido la revisión de la clasificación de las especies del género *Opuntia*. Valadez *et al.* (2015) estudiaron la variabilidad genética de 52 variedades de *Opuntia* clasificadas en 12 especies. En ese estudio se concluyó que las variedades mexicanas de *Opuntia* presentan una amplia variación genética además que los agrupamientos obtenidos no coincidieron con la clasificación taxonómica real de las especies. Las variedades como Atlixco y Copena V1, actualmente clasificadas en la misma especie no se ubicaron en el mismo grupo filogenético (Figura 2.1)

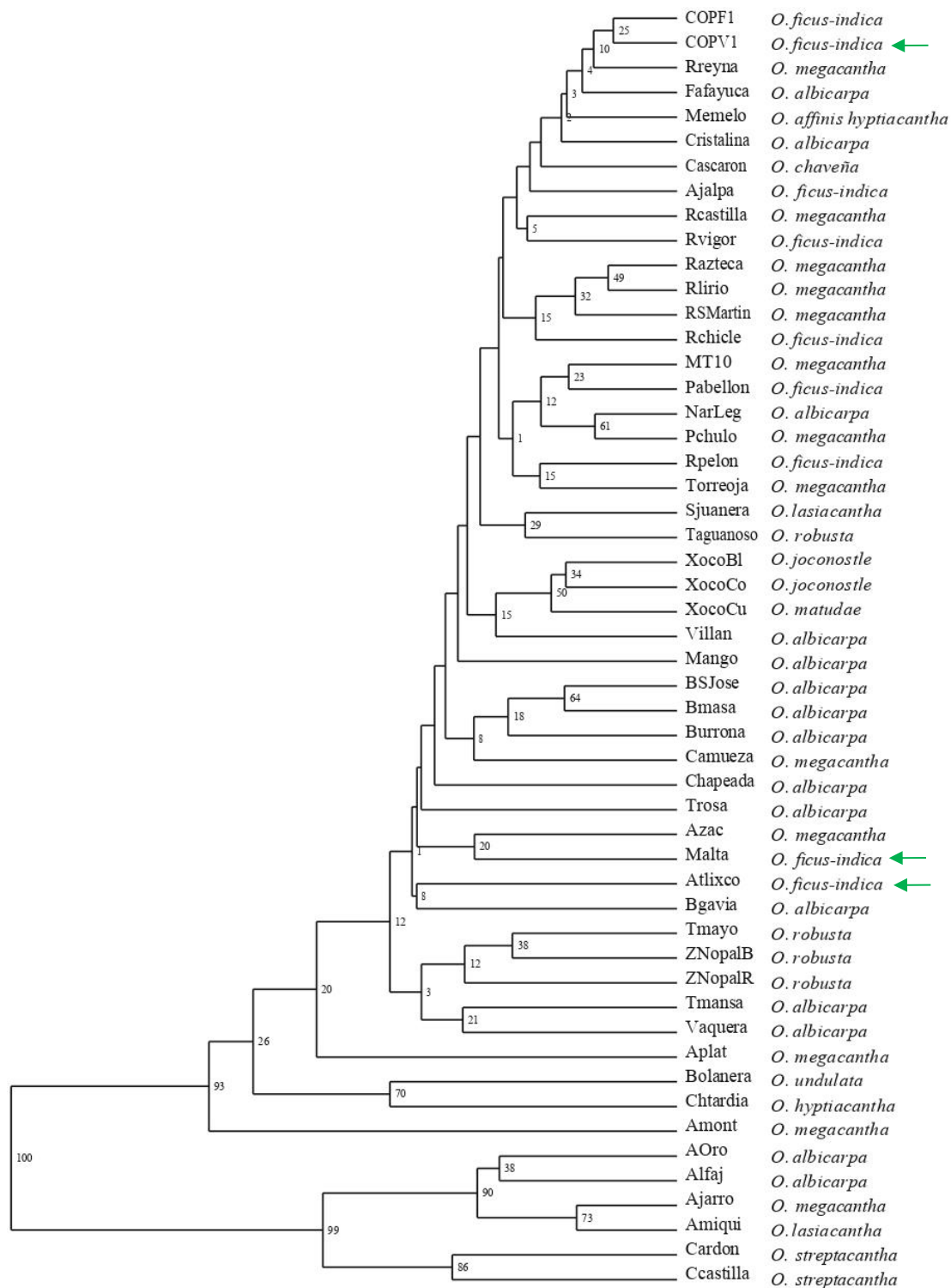


Figura 2.1. Dendrograma elaborado por Valadez *et al.* (2015) donde se utilizó el coeficiente de Nei y Li / Dice y el método Bootstrap con 1,000 repeticiones. Las flechas en verde señala las variedades empleadas en esta investigación.

En general los miembros de la especie *ficus-indica* son plantas arbustivas o arborescentes, erectas que alcanzan la altura de 1.7 a 3 m y cuentan con un tallo primario lignificado de aproximadamente 46 cm de largo y 20 cm de diámetro. Sus cladodios por lo general de color verde pálido a oscuro toman una forma elíptica, y en menor frecuencia, circulares, oblongos, oblanceolados o rómbicos. Sobre la superficie del cladodio se encuentran series de aréolas espirales, con una distancia entre series de 2.7 a 5 cm. En cladodios de 2 a 3 años se han encontrado una densidad de 52 a 69 aréolas por cada 100 cm². Los gloquidios generalmente son abundantes en las aréolas, pero algunas veces ausentes (Reyes *et al.*, 2005)

Las flores son de antesis diurna, sésiles, hermafroditas y solitarias, se desarrollan normalmente en el borde superior de las pencas. Su color es variable: hay rojas, amarillas, blancas, entre otros colores (Sudzuki *et al.*, 1993).

El fruto es una falsa baya con ovario ínfero simple y carnoso turbinado, algunas veces esférico, cilíndrico o elíptico, frecuentemente amarillo brillante (Sudzuki *et al.*, 1993; Reyes *et al.*, 2005).

2.1.2. Composición química

La composición química de los cladodios de *Opuntia ficus-indica* tiene una correlación directa entre la edad, disponibilidad de nutrientes y la variedad. Se ha observado que los valores más altos de nutrientes se obtienen en los cladodios jóvenes (Barazarte *et al.*, 2017). En el trabajo realizado por Barazarte *et al.* (2017) en cladodios de 1 a 4 meses de edad se describió la composición química de esta especie (Cuadro 2.1).

La variable pH en los cladodios es reconocida como una variable que depende de la hora de la cosecha debido al metabolismo de las cactáceas, los valores incrementan a medida que aumentan las horas del día (Flores *et al.*, 2004).

Cuadro 2.1. Propiedades fisicoquímicas de cladodios de *Opuntia ficus-indica*[†] de 1 a 4 meses cosechados antes de las 10 de la mañana.

Propiedad	Valor
Acidez titulable (g•ácido málico 100 g ⁻¹)	0.76
pH	4.52
Sólidos solubles totales (°Brix)	5.59
Ácido ascórbico (mg•100 g ⁻¹)	17.34
Humedad (g•100 g ⁻¹)	91.99
Proteína (g•100 g ⁻¹)	0.60
Grasa (g•100 g ⁻¹)	0.14
Cenizas (g•100 g ⁻¹)	1.32
Carbohidratos (g•100 g ⁻¹)	5.95
Pectina total (g AGA [§] •100 g ⁻¹)	0.24
Hierro (mg•100 g ⁻¹)	0.70
Calcio (mg•100 g ⁻¹)	126.06
Potasio (mg•100 g ⁻¹)	376.32

[†]Información tomada de: Barazarte *et al.* (2017)

[§]AGA= ácido anhidrogalacturónico.

Como otros polisacáridos estructurales de otras frutas y hortalizas, el contenido de mucílago en nopal es dependiente del cultivar, la especie, el manejo del cultivo y el ambiente (López *et al.*, 2012). Se ha demostrado que los valores de mucilago para nopal verdura oscilan entre 3.8 a 8.6 %. En una evaluación reciente de 11 variedades de nopal, se encontró que el contenido de mucilago en Atlixco, Copena V1 y Milpa alta es menor al 6 %, siendo la variedad Copena V1 la de mayor contenido, seguido de Milpa alta y con menor contenido la variedad Atlixco (Peña *et al.*, 2012).

2.1.3. Manejo postcosecha

La producción y el manejo tradicional del cultivo de nopal no contemplan la aplicación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manejo (BPM) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH), por lo que es altamente probable que se comprometa la calidad sanitaria de los cladodios con residuos químicos (CESVMOR, 2011) y agentes microbiológicos (Hernández *et al.*, 2009).

La vida de anaquel de los cladodios se ve afectada por diferentes factores, entre los que se encuentran el tipo de cosecha, tipo de empaque, así como la humedad relativa y la temperatura de almacenamiento. A 20 °C la pérdida de peso y las pudriciones son los problemas que limitan la vida útil del producto (Ramayo *et al.*, 1978; Rodríguez y Villegas, 1997) mientras que a temperaturas menores a 12 °C (almacenamiento refrigerado) puede existir daño por frío (Cantwell *et al.*, 1992).

2.2. Situación actual de *Salmonella*

2.2.1. Morfología y taxonomía

Salmonella es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, móvil, facultativa, catalasa positiva, citocromo oxidasa negativa, productora de dióxido de carbono a partir de glucosa, reductora de nitrato. El género *Salmonella* comprende dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez *S. enterica* se subdivide en seis subespecies enteropatógenas, entre las que se encuentra la subespecie *enterica* con numerosos serotipos como: *S. enterica* subsp. *enterica*, serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium* o *S. typhimurium*) y *S. Javiana* (CDC, 2011; McClelland *et al.*, 2001). Los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Javiana* son entoropatógenos responsables de provocar gastroenteritis en humanos, aunque el serotipo *S. Typhimurium* infecta tanto a humanos como a animales. En ciertos animales

para consumo, como pollos, no se manifiesta ningún tipo de síntomas. Los excrementos de estas aves son ampliamente empleados como materia prima en el composteo de residuos orgánicos (McClelland *et al.*, 2001; Gutiérrez, 2008). En estudios recientes se ha detectado un incremento en los brotes de *Salmonella* y de igual forma un aumento concurrente en las infecciones causadas por el serotipo *S. Javiana* en productos hortofrutícolas contaminados. El uso de abonos orgánicos durante la producción de estos productos podría estar relacionada con el incremento de brotes de salmonelosis (Jackson *et al.*, 2013).

2.2.2. Hábitat

El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto intestinal de mamíferos, reptiles, aves e insectos (Sánchez *et al.*, 2011). Los organismos portadores o infectados eliminan a *Salmonella* a través de sus heces y la ruta habitual de infección es a través de la transmisión oral (Morris y Potter, 2013). Se ha demostrado que algunos serotipos de *Salmonella* tienen la capacidad de subsistir por tiempo prolongado fuera de su hábitat natural y adaptarse a condiciones adversas del ambiente. Por ejemplo, en estudios recientes el serotipo *S. Typhimurium* presentó capacidad para persistir en nopal hasta por 14 días; aunque dicha capacidad dependió del tipo de tejido y de la condición fisiológica del cladodio (Landa *et al.*, 2013).

Numerosos serotipos de *Salmonella* se han encontrado no solo como epifitos sino también como endófitos de algunas plantas o bien como contaminante de un gran número de frutas y hortalizas (Brandl, 2006; Doyle y Erickson, 2008; Holden *et al.*, 2009; Tyler y Triplett, 2008, Hernández y Landa 2009).

2.2.3. Brotes epidemiológicos

Existen evidencias que a lo largo de la historia de la humanidad se han desarrollado numerosos brotes epidemiológicos causados por diferentes organismos, entre ellos por serotipos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*. Entre los años de 1545 a 1548 se reportó una importante epidemia, la cual causó la muerte de 12 a 15 millones de personas en México. A esta epidemia se le nombro como el “cocoliztli” (de la lengua náhuatl que significa peste). Hasta el día de hoy no se conoce concretamente el agente causal de dicha peste, pero según la sintomatología descrita y los trabajos que recientemente se han llevado acabo existe una alta probabilidad de que alguno de los serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* estuvo involucrado en ese catastrófico acontecimiento (Puente, 2017).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año enferman alrededor de 550 millones de personas de los cuales el 40 % son niños menores de 5 años (OMS, 2017). En el año 2018 en México se reportaron 79 659 casos de salmonelosis de los cuales 20 496 fueron identificados en el estado de Chiapas (SSA, 2019). La mayoría de los casos están ligados al consumo de alimentos de origen animal, principalmente huevos, carne y lácteos contaminados, pero también a hortalizas y frutas contaminadas en algún punto de su sistema productivo (OMS, 2017).

La contaminación de frutas y hortalizas frescas o mínimamente procesadas puede ocurrir en cualquier punto de la cadena productiva como lo es en cosecha, lavado, acondicionamiento, empackado o en la distribución del producto final. Los productos hortofrutícolas plantean un mayor riesgo para la salud del consumidor cuando se hace uso de la aplicación de estiércol fresco, agua contaminada o existe la presencia de

animales domésticos y silvestres en algún punto de la producción (Rangel *et al.*, 2017; OMS, 2017). En el año 2009, Hernández y colaboradores reportaron la presencia de los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Javiana* en cladodios de nopal verdura, así como en suelo y agua de uso agrícola en una zona productora de este cultivo en Morelos, México.

El desarrollo de brotes de salmonelosis se ha incrementado en las últimas décadas por el consumo de frutas y verduras contaminadas. Los productos hortofrutícolas que se han visto implicados como portadores de *Salmonella* son diferentes tipos de coles (*Brassica oleracea*), alfalfa (*Medicago sativa*), alcachofa (*Cynara scolymus*), melón cantaloupe (*Cucumis melo*), mango (*Mangifera indica*), hojas de remolacha (*Beta vulgaris*), apio (*Apium graveolens*), coliflor (*Brassica oleracea*), espinacas (*Spinacia oleracea*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), sandía (*Citrullus lanatus*), cebolla (*Allium cepa*), berenjena (*Solanum melongena*), escarola (*Cichorium endivia*), hinojo (*Foeniculum vulgare*) y algunas variedades de chile (*Capsicum annuum*) (Ramos *et al.*, 2013).

El último brote de salmonelosis descrito por la FDA y en el cual estuvo involucrado un producto hortofrutícola fue en septiembre del 2017 por el consumo de papaya Maradol proveniente de tres granjas; dos en Estados Unidos de América y una ubicada en Campeche, México. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) reportó 220 casos, 65 hospitalizaciones y una muerte en 23 estados de EUA (FDA, 2017; CDC, 2017).

2.2.4. Sanitizantes empleados para eliminar a *Salmonella*

En la actualidad existen un gran número de productos con actividad antimicrobiana conocidos como germicidas, desinfectantes y sanitizantes, que reducen las poblaciones de microorganismos patógenos como *Salmonella* (Ramos *et al.*, 2013) (Cuadro 2.2). A

pesar de las similitudes entre estos productos, existen ciertas diferencias en su naturaleza y actividad antimicrobiana; diferencias que se ponen de manifiesto cuando se analizan las definiciones de cada uno de éstos términos.

Germicida. - Agente químico o físico que destruye microorganismos especialmente patógenos para el hombre, pero no necesariamente incluye la capacidad de destrucción de esporas.

Desinfectante. - Sustancia química o proceso utilizado para destruir o irreversiblemente inactivar los hongos y bacterias, pero no sus esporas, en superficies duras.

Sanitizante. - Sustancia o proceso que reduce microorganismos de importancia para la salud pública, basados en parámetros establecidos, sin afectar negativamente la calidad del producto ni su seguridad. La característica principal de un sanitizante es que este no necesita eliminar el 100 por ciento de todos los organismos para ser efectivo (Pfundner, 2011; NOM-181-SSA1-1998).

Por el antecedente descrito, en este trabajo se consideró conveniente utilizar el término sanitizante para referirse a los productos cuya actividad se probó en nopal verdura fresco sin espinas.

Cuadro 2.2. Características de antimicrobianos empleados en productos hortofrutícolas y superficies†.

SANITIZANTE	MODO DE ACCIÓN	VENTAJA	DESVENTAJA	EFICACIA
Hipoclorito de sodio (NaClO)	<ul style="list-style-type: none"> -Daña membrana externa - Provoca pérdida en permeabilidad y lisis celular -Inhibe enzimas -Destruye ADN 	<ul style="list-style-type: none"> -Bajo costo -Considerado por EPA† como GRAS‡ -Sin límite de tolerancia 	<ul style="list-style-type: none"> -Se inactiva con sólidos orgánicos -Corrosivo de metales -Produce vapores tóxicos y productos clorados - Factores ambientales afectan sus propiedades. -Perjudica el ambiente - Se inactiva con sólidos orgánicos -Sensible a cambios de pH -Corrosivo de metales -Produce productos tóxicos -Impacta calidad del producto -Costo mayor en comparación con otros sanitizantes - Explosivo 	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce carga microbiana de 1 a 2 Log₁₀ a 50 y 200 ppm y tiempo de contacto de 1 a 2 min
Hipoclorito de calcio (Ca(ClO) ₂)	<ul style="list-style-type: none"> - Provoca pérdida en permeabilidad -Inhibe enzimas Destruye ADN 	<ul style="list-style-type: none"> -Bajo costo -Sin límite de tolerancia 	<ul style="list-style-type: none"> -Se inactiva con sólidos orgánicos -Sensible a cambios de pH -Corrosivo de metales -Produce productos tóxicos -Impacta calidad del producto -Costo mayor en comparación con otros sanitizantes - Explosivo 	<ul style="list-style-type: none"> - Elimina <i>E. coli</i> O157: H7 y <i>L. monocytogenes</i>
Dióxido de cloro (ClO ₂)	<ul style="list-style-type: none"> -Reacciona con ARN, proteínas y ácidos grasos de membrana celular -Ocasiona pérdida de control de la permeabilidad y alteración de la síntesis de proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> -Eficaz en baja concentración en comparación con hipocloritos - Efectivo a diferente pH -Menor inhibición por compuestos orgánicos -No forma subproductos -Relativamente seguro en solución 	<ul style="list-style-type: none"> -Se inactiva con sólidos orgánicos -Sensible a cambios de pH -Corrosivo de metales -Produce productos tóxicos -Impacta calidad del producto -Costo mayor en comparación con otros sanitizantes - Explosivo 	<ul style="list-style-type: none"> - Elimina <i>E. coli</i> O157: H7 y <i>L. monocytogenes</i>

Ácido peroxiacético (CH ₃ CO ₃ H)	-Altera los enlaces químicos de la membrana celular	-Efectivo contra esporas bacterianas -Funciona a pH de 1 a 9 -Es ecológico -Tolera cargas orgánicas -Elimina biopelículas	-Mayor efectividad a pH ácido -Reduce calidad del producto por conferir olor a ocre -Riesgoso para el ser humano -Difícil de manejar en comparación de los hipocloritos	-A 80 ppm (máximo permitido) la reducción no es significativa
Ácido láctico y otros ácidos orgánicos	-Degradan membrana celular desnaturalizan proteínas	-Exentos de tolerancia -Amigables con medio ambiente	-Ineficaces contra ciertas bacterias, levaduras y mohos -Irritantes de ojo y piel	- Reducción significativa con tiempos de 5 a 15 min
Ozono (O ₃)	-Oxida componentes celulares vitales	-Sustancia GRAS por EPA y FDA -Oxidante ecológico -Efectivo contra amplio número de patógenos	- Requiere de cuidados necesarios para el trabajador -Tiempos de contacto variables de acuerdo al patógeno y el producto a sanitizar -Puede afectar la calidad del producto	- Forma gaseosa más efectiva que la líquida
Clorito de sodio acidificado (ASC [±]) (HClO ₂)	-Oxida los componentes celulares	-Retrasa maduración de frutas o vegetales. -Puede aumentar el contenido de calcio en el producto	-El cloro debe estar entre 1200 y 5000 ppm a pH de 2.3 a 2.9 -Pueden quedar trazas en el producto	-Se carece de datos precisos
Iodóforos (C ₆ H ₉ I ₂ NO)	- Inactivan y dañan la pared celular al adherirse al azufre de proteínas (cisteína)	-Efecto de liberación sostenida, provocando mortalidad microbiana continúa -No efecto significativo sobre medio ambiente	-Mayor eficiencia a pH ligeramente ácido -Manchan fácilmente algunas superficies	-Más efectivo contra células que con las esporas se las bacterias
Agua electrolizada (H ₃ O ⁺)	-Reduce y oxida las células	-Inactiva sustancias nocivas (cianuros)	-Reduce la calidad del producto	-

Compuestos de amonio cuaternario	- Bloquean la absorción de nutrientes y la descarga de desechos celulares al adherirse a los ácidos grasos de la pared celular	-Eficaz contra varios patógenos de importancia sanitaria - Suelen ser inodoros, incoloros, no corrosivos y relativamente no tóxicos - Su mayor actividad es a temperaturas cálidas y en medios alcalinos	-Toleran baja concentración de compuestos orgánicos -Pueden no funcionar adecuadamente en aguas duras	-Concentraciones de 1 a 15 % reducen de 0 a 6 Log ₁₀
----------------------------------	--	--	--	---

†Fuente: Pfunter, 2011; Ramos *et al.*, 2013; Pfunter *et al.*, 2017.

§Acrónimo del inglés “Generally related (recognized) as safe”.

‡Acrónimo del inglés “Acidified Sodium Chlorite”

†Acrónimo del inglés “Environmental Protection Agency”

Además de los sanitizantes descritos anteriormente, se han reportado algunas soluciones con actividad microbicida para el tratamiento de frutas y hortalizas frescas. Estas soluciones, elaboradas principalmente con productos naturales, tienen efectividad contra bacterias enteropatógenas como *Salmonella enterica*; mayor información sobre estas soluciones se da a continuación:

Extractos de cálices de jamaica: Se ha reportado actividad antimicrobiana en los cálices de jamaica, actividad atribuida a compuestos tales como el ácido protocatecuico y antocianinas (Liu *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2017). Liu *et al.* (2005) demostraron que los cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y el ácido protocatecuico inhiben eficazmente el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, siendo la actividad antibacteriana del ácido protocatecuico significativamente mayor que la actividad de la solución preparada con cálices de jamaica y agua destilada estéril 1:1(p/v). Posteriormente Jaroni y Ravishankar (2012) demostraron que los cálices de jamaica poseen actividad antimicrobiana sobre *Salmonella enterica* serotipo Newport en hojas de lechuga romana y espinaca. Entorno a *Salmonella enterica* se han desarrollado una serie de investigaciones las cuales han sido promisorias. Rangel *et al.* (2017) compararon los extractos de jamaica acuoso, etílico, metanólico y acetonico con sanitizantes de uso tradicional como plata coloidal, ácido acético e hipoclorito de sodio, los cuales se experimentaron contra una mezcla de los serotipos *S. Typhimurium*, *S. Typhi* y *S. Montevideo* (resistentes a múltiples antibióticos) aislados de cilantro y zanahoria (*Daucus carota*). El ensayo arrojó que en el cilantro los extractos de cálices de jamaica redujeron el doble de unidades formadoras de colonias (UFC) (promedio entre 2 y 2.5 Log₁₀) en comparación con los sanitizantes de

uso común que solo lograron reducir alrededor de 1 Log₁₀ en la población de cepas de *Salmonella*. La reducción de las poblaciones (2 Log₁₀) fue similar a la obtenida cuando los extractos se probaron en zanahorias contaminadas artificialmente con la mezcla bacteriana (Rangel *et al.*, 2017; Gutierrez *et al.*, 2016).

Mezcla de vinagre y jugo de limón: El tratamiento con jugo de limón o con vinagre de manzana ha demostrado también ser efectivo para reducir las poblaciones de *Salmonella*. El poder sanitizante de estas soluciones se atribuye a los ácidos cítrico y acético contenidos en ellas. El éxito de estos ácidos frente a bacterias patógenas se debe a la reducción del pH en el medio, a la interrupción del transporte y / o permeabilidad de la membrana, acumulación de aniones, o a la reducción en el pH interno de la célula por la disociación de iones de hidrógeno del ácido. Se ha evidenciado la eficacia del jugo de limón en la reducción de la población de *S. Typhi* en cubos de papaya (*Carica papaya*) y (*Pachyrhizus erosus*) inoculados artificialmente. De igual manera se ha probado la eficacia del ácido acético al 2 % para eliminar bacterias patógenas en hojas de perejil (Parish, *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2000). Sengun *et al.* (2004) evaluaron la actividad a diferentes tiempos (10, 20 y 30 min) del jugo de limón, del vinagre y la mezcla de estos dos productos en zanahoria inoculada artificialmente con cepas de *S. Typhimurium*. Estos investigadores encontraron que la mezcla de vinagre y jugo de limón después de 30 min reduce la población de *Salmonella* a un nivel indetectable en comparación a cuando los productos se evaluaron de manera individual.

La información anterior indica que se requiere continuar con las investigaciones para contar con al menos un producto sanitizante eficaz para nopal verdura fresco. Los extractos metanólico, acetónico y acuoso de jamaica, así como la mezcla de vinagre y

jugo de limón 1:1 (v/v) pueden ser una alternativa para reducir o eliminar poblaciones de *Salmonella* en este producto hortofrutícola en caso de contaminación accidental. Lo anterior debido a que actualmente se carece de un tratamiento 100 % efectivo para eliminar a *Salmonella* de nopal verdura para consumo en fresco.

3. HIPÓTESIS

Los extractos metanólico, acetónico y acuoso a base de cálices de jamaica (1 %), el ácido láctico al 1.5 % y la mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) reducen a niveles no cuantificables la población de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en nopal verdura fresco sin espinas, sin afectar las características de color del tejido vegetal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar un sanitizante efectivo para eliminar a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* de nopal verdura fresco sin espinas.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar la efectividad de cinco soluciones sanitizantes para eliminar a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* en las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura fresco sin espinas artificialmente inoculadas con la bacteria.
- Comparar la efectividad de tres extractos a base de cálices de jamaica (metanólico, acetónico y acuoso al 1 %), del ácido láctico al 1.5 % y de una mezcla de vinagre blanco y jugo de limón 1:1 (v/v) para eliminar a *S. enterica* subsp. *enterica* de las cuatro variedades de nopal verdura fresco sin espinas.
- Determinar el efecto de las cinco soluciones sanitizantes en el color del tejido de las cuatro variedades de nopal verdura fresco sin espinas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Producción de cladodios

Durante la primavera de 2017 se estableció una plantación con las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para la producción de cladodios frescos. La plantación se estableció en un invernadero de 150 m² construido con plástico blanco, malla antiáfidos y piso de tezontle, en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Para establecer la plantación, cladodios “madre” obtenidos del banco de germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo, en el estado de Zacatecas, se sembraron en bolsas negras de polietileno de 45 x 45 cm con una mezcla de suelo-composta con 14.5 % de materia orgánica y pH de 7.1 (Figura 5.1).



Figura 5.1. Variedades de nopal verdura a tres meses del trasplante en suelo composteado y macetas de polietileno en invernadero.

Las plantas se regaron con agua de pozo (un riego por semana) y se mantuvieron para la producción de cladodios durante las estaciones de primavera, verano y otoño de 2018. Las condiciones ambientales promedio registradas en el invernadero, durante dicho periodo, fueron: temperatura ambiente de 25 ± 2 °C y humedad relativa de 51.2 %.

5.2. Cosecha de cladodios y estimación de parámetros

La cosecha se estableció durante los primeros estados de crecimiento para contar con cladodios de 16 a 20 cm de largo y de 50 a 100 g de peso, en promedio, por variedad de nopal. Cladodios con estas medidas corresponden a cladodios de nopal verdura fresco comercializados como “nopalitos” para consumo en fresco (Rodríguez-García *et al.*, 2007). La cosecha de cladodios dependió principalmente de la época de mayor producción de la variedad durante el año de 2018 en el invernadero. En primavera se cosecharon y procesaron los cladodios de Milpa alta y Villanueva; en verano-otoño, los de Atlixco; y en otoño, los de Copena V1.

Independientemente de la variedad, los cladodios se cosecharon por la mañana (08:00 – 08:30 h) con un cuchillo desinfectado con alcohol. Después de la cosecha los cladodios se transportaron en charolas de plástico limpias al laboratorio de Enfermedades en Postcosecha, del Edificio de Fitosanidad-Fitopatología para ser procesados durante las siguientes 24 h.

Una vez en el laboratorio se estimó el peso en gramos y la longitud en centímetros de cada uno de los cladodios cosechados para seleccionar aquellos con las características más cercanas a las de nopalitos (Figura 5.2). También se midió el pH del tejido de los cladodios con un medidor portátil Mettler Toledo, SevenGO™ pH.

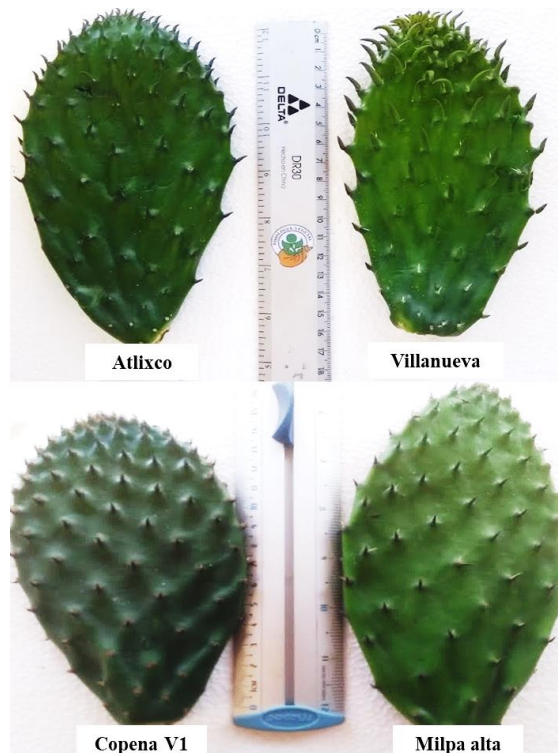


Figura 5.2. Cladodios de las variedades de nopal verdura fresco con espinas de tres semanas de crecimiento en invernadero.

Con la finalidad de conocer y detectar diferencias en el pH del tejido que pudieran tener un efecto en el inóculo de *Salmonella* se estableció un ensayo preliminar con cladodios cosechados durante el otoño de 2017. En cada cladodio se midió el pH en la parte inferior, media y superior. Debido a que las determinaciones de pH del tejido fueron similares en todo el cladodio de las cuatro variedades, se decidió que para los ensayos de evaluación de sanitizantes el inóculo se iba a depositar en la parte media y solo se iba a registrar el pH de esa parte del tejido, esto para contar con valores de pH actualizados y correspondientes al periodo en el que se cosecharon los cladodios de nopal para su inoculación con *Salmonella* y tratamiento con sanitizante. Previo a la inoculación, los cladodios de nopal se lavaron con agua de la llave, desespinaron con

cuchillo estéril y enjuagaron con agua destilada estéril. Después se secaron sobre toallas de papel Sanitas® estéril en charolas de plástico desinfectadas con alcohol absoluto.

5.3. Reactivación de cepas de *Salmonella*

Se utilizaron cuatro cepas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (*S. enterica*) de los serotipos Javiana, cepas N4 y N14, y Typhimurium, cepas N16 y Sal4. Las cepas N4, N14 y N16 se aislaron de cladodios de nopal verdura fresco cosechados en la región productora de Tlanepantla, Morelos, México (Hernández *et al.*, 2009); y Sal4 corresponde a una cepa de laboratorio del serotipo Typhimurium ATCC23564, donada por el Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz del Centro de Investigación y Desarrollo A. C., Culiacán, México. Después de un periodo de 2 años y 6 meses de almacenamiento en solución de agua-glicerol (50:50) a -26 °C, las cepas N4, N14, N16 y Sal4 de *Salmonella* se reactivaron por separado en tubos de ensaye (14 x 2.5 cm) con 5 mL de caldo soya tripticaseina (CST, BD BIOXON®) se incubaron por 18 h a 35 ± 2 °C, sin agitación, en una incubadora Imperial IV Lab-line Instrument, Inc. De los tubos con crecimiento bacteriano se tomaron 100 µL para la inducción de resistencia al antibiótico Kanamicina (SIGMA-ALDRICH®) A, referido solo como Kanamicina (Km) por mutación espontánea como se describe a continuación. La Kanamicina es un antibiótico producido por *Streptomyces kanamycetus*, del grupo de los aminoglucósidos, de amplio espectro, bactericida, y activo sobre bacterias Gram positiva, Gram negativa y *Mycobacterium*. El contar con cepas con resistencia a éste antibiótico permitió cuantificar y dar seguimiento del tamaño de la población de *Salmonella in vivo* del presente estudio en nopal verdura fresco.

5.4. Inducción de resistencia a Kanamicina

Cien μL de cada una de las suspensiones de las cepas N4, N14, N16 y Sal4 de *Salmonella* se depositaron por separado en tubos de ensaye con 5 mL de CST adicionados con 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de Km e incubados por 22 h sin agitación a 25 ± 2 °C. Posteriormente de los tubos con crecimiento se tomaron 100 μL y se depositaron en nuevos tubos con 5 mL de CST adicionados con 25 $\mu\text{g/mL}$ de Km e incubaron sin agitación a 29 ± 2 °C por 22 h. Transcurrida la incubación se tomaron 100 μL de suspensión bacteriana y se depositaron en nuevos tubos de ensaye con 5 mL de CST adicionados con 50 $\mu\text{g/mL}$ de Km e incubaron por 18 h sin agitación a 32 ± 2 °C. Simultáneamente, conforme se iba avanzando en la generación de resistencia, se preparó una colección de cepas de *Salmonella* (“cultivos stock”) con resistencia a 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de Km ($\text{Km}^{12.5}$, Km^{25} y Km^{50} , respectivamente). Para esto de cada tubo con crecimiento en CST+Km se tomaron 600 μL y se depositaron por separado en microtubos SARSTEDT® de 2 mL con 400 μL de glicerol al 50 % (p/p). Todos los “cultivos stock” se almacenaron a -20 °C, pero solamente los cultivos con resistencia Km^{50} se utilizaron para preparar el inóculo de *Salmonella*.

5.5. Preparación de inóculo de *Salmonella*

El inóculo de *Salmonella* consistió de una mezcla preparada a partes iguales con suspensiones bacterianas con 8.6 Log_{10} UFC/mL de las cepas N4, N14, N16 y Sal4. Para preparar esta mezcla se procedió como se describe brevemente a continuación. Con la ayuda de un asa estéril se transfirió por separado suspensión bacteriana de cada uno de los “cultivos stock” Km^{50} a cajas Petri con medio agar soya tripticaseina (AST, BD BIOXON®) adicionado con Km^{50} (AST+ Km^{50}). Después de 72 h de crecimiento, las

células bacterianas se resuspendieron en agua peptonada amortiguada (APA, DIFCO™) estéril al 0.1 % y se ajustó el nivel de inóculo a 8.6 Log₁₀ UFC/mL adicionando más masa bacteriana o diluyendo con APA al 0.1 %. El nivel de inóculo se determinó por densidad óptica a 560 nm en un espectrofotómetro (Génesis ® UV, Thermo Spectromic) considerando una lectura de 0.520 de absorbancia equivalente a 8.6 Log₁₀ UFC/mL, previamente establecida (Landa *et al.*, 2013). Una vez ajustado el nivel de inóculo, de cada cepa se tomaron 2 mL de suspensión bacteriana, se depositaron en un solo tubo de ensaye esterilizado y se agitó por unos segundos en un agitador vortex (MIXER ®) para formar la mezcla bacteriana.

5.6. Inoculación de cladodios con *Salmonella*

Inmediatamente después de preparar la mezcla con las cepas N4, N14, N16 y Sal4 de *Salmonella* se procedió a la inoculación de los cladodios. Para esto se seleccionaron 24 cladodios frescos, con características de nopalitas, cortados ese mismo día, previamente lavados, desespinaados y secados como se describió anteriormente.

En el centro de cada cladodio se delimitó superficialmente una sección (“rodaja”) de 4.5 cm de diámetro (5 g de peso, aproximadamente) y en el centro de esa sección del cladodio se depositaron 100 µL de mezcla bacteriana (8.6 Log₁₀ UFC/mL) o 100 µL de APA 0.1 % (Figura 5.3). En total se inocularon 21 cladodios con mezcla de cepas de *Salmonella* y tres cladodios con APA al 0.1 %. Después de la inoculación los cladodios se mantuvieron en una cámara de bioseguridad clase II (Thermo forma) a temperatura ambiente (22 ± 2 °C en promedio) por 18 h para permitir el secado del inóculo y la adherencia de las células bacterianas al tejido. (Figura 5.4)

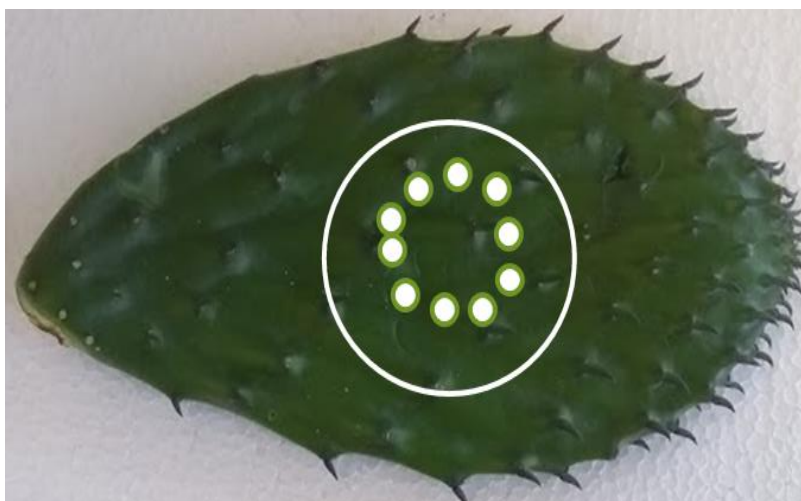


Figura 5.3. Descripción grafica de la sección delimitada para la aplicación del inóculo y distribución del mismo. El inóculo (100 μ L) consistió de una mezcla de cuatro cepas de *Salmonella enterica*.



Figura 5.4. Aplicación de mezcla bacteriana en nopal verdura en cámara de bioseguridad clase II (Thermo forma).

5.7. Sanitizantes

En total se probó el efecto de cinco sanitizantes: tres extractos (acetónico, acuoso y metanólico) de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* variedad criolla de Oaxaca), una mezcla de vinagre blanco de alcohol de caña (La Costeña®) y jugo de limón (*Citrus latifolia* Tanaka) 1:1 (v/v) y una solución de ácido láctico (FERMONT® 85 %) al 1.5 % (Cuadro 5.1)

Cuadro 5.1. Relación de tratamientos aplicado al nopal verdura fresco sin espinas.

# Tratamiento	Tratamiento*	Concentración	pH‡	Tiempo min
Con <i>Salmonella</i> Km^{50†}				
T1	Ácido láctico	1.5 %	2.2	10
T2	Extracto metanólico de cálices de jamaica	1.0 %	2.1	10
T3	Extracto acetónico de cálices de jamaica	1.0 %	2.1	10
T4	Extracto acuoso de cálices de jamaica	1.0 %	2.5	10
T5	Mezcla de vinagre + jugo de limón	1:1 (v/v)	2.3	10
T6	Agua destilada estéril		6.5	10
T7	Sin sanitizante ni agua destilada estéril			
Sin <i>Salmonella</i> Km⁵⁰				
T8	Sin sanitizante ni agua destilada estéril			

†8.6 Log₁₀ UFC/mL

*Los sanitizantes o agua destilada estéril se aplicaron por inmersión en el tiempo indicado.

‡Potenciómetro portable HANNA Instruments, modelo 213 HI 98230.

Los extractos de jamaica los proporcionó el Dr. Javier Castro Rosas, Profesor-Investigador de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, del Área Académica de Química Microbiología e Inocuidad Alimentaria. Originalmente los extractos de jamaica se prepararon con la finalidad de desinfectar zanahoria (*Daucus carota*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) contaminados con *Salmonella*. En el Anexo 2 se da mayor información del contenido de cada extracto de jamaica. El vinagre blanco y los limones se adquirieron en un centro comercial de Texcoco y la mezcla se preparó minutos antes

del tratamiento. El vinagre blanco de alcohol de caña (La Costeña®) contiene agua, vinagre de alcohol de caña al 5 % de acidez, y metabisulfito de sodio como conservador. En México el vinagre blanco se utiliza para preparar vinagretas o para marinar carnes. La solución de ácido láctico se preparó también al momento de su utilización. Para esto se diluyó un volumen de ácido (FERMONT ® 85 %) en un volumen de agua destilada estéril para tener la solución al 1.5 % de concentración final.

Los valores de pH registrados por cada sanitizante y el agua destilada estéril se indican en el Cuadro 5.1. La lectura de pH se determinó en un volumen de 100 mL de sanitizante o de agua destilada estéril con un potenciómetro portable, marca HANNA Instruments (pH/°C meter with GCP; Modelo 213 HI 98230, Rumania)

5.8. Tratamiento de cladodios

Transcurridas 18 h después de la inoculación con la mezcla de cepas de *Salmonella* o con APA al 0.1 %, se procedió a aplicar los tratamientos (Cuadro 5.1). Para esto de cada cladodio se extrajo (cortó) la rodaja donde se aplicó el inóculo y se sumergió individualmente en un recipiente de plástico de 100 mL (Bosco® México) con 45 mL de solución sanitizante (tratamientos T1 a T5) o agua destilada estéril (tratamiento T6) por 10 min. Inmediatamente después, cada rodaja se transfirió a un nuevo recipiente con 45 mL de agua destilada estéril para enjuagar el tejido tratado y detener la reacción del tratamiento. El volumen de sanitizante o agua destilada usado fue suficiente para cubrir la rodaja completa de tejido. Entre cada tratamiento y repetición, el sacabocado y las pinzas utilizadas se sumergieron en alcohol absoluto y pasaron por la flama de un mechero con alcohol para su esterilización. Por cada tratamiento se establecieron dos repeticiones; cada repetición constó de una rodaja de cladodio.

5.9. Evaluación microbiana

Para evaluar el efecto de los tratamientos con sanitizante en la población de *Salmonella*, se procesaron primero los tres cladodios inoculados con APA 0.1 % (T8, testigo), después los tres cladodios restantes inoculados con *Salmonella* (T7, testigo), seguidos de los cladodios del tratamiento T6 (testigo) (Cuadro 5.1) como se describe a continuación. Cabe señalar que los tratamientos T7 y T8 se incluyeron como referencia para determinar el efecto del tejido de nopal y del proceso de extracción en el número total de células de *Salmonella* y para detectar la presencia natural de células de *Salmonella* resistentes a Km en los cladodios de nopal, respectivamente.

Inmediatamente después del tratamiento, cada rodaja de tejido se colocó en una bolsa de plástico Ziploc® (17.7 x 19.5 cm) con 45 mL de APA al 0.1%, y se maceró en un Stomacher (SEWARD® 400 circulator) a 300 unidades g por 120 s. Previamente las bolsas de plástico se habían esterilizado con luz UV por 30 min. De cada macerado de tejido se tomaron dos volúmenes: un volumen de 100 µL para siembra directa en agar entérico Hektoen (BD BIOXON®) adicionado con Km⁵⁰ (AEH-Km⁵⁰) y otro de 1000 µL para hacer diluciones seriales. De cada dilución se tomaron 100 µL y se depositaron en una caja Petri con AEH-Km⁵⁰. Todas las cajas sembradas se mantuvieron a 33 ± 2 °C por 72 h y después de la incubación se examinaron para determinar y cuantificar colonias presuntivas de *Salmonella* (Colonias con centro oscuro y halo transparente) (Figura 5.5).

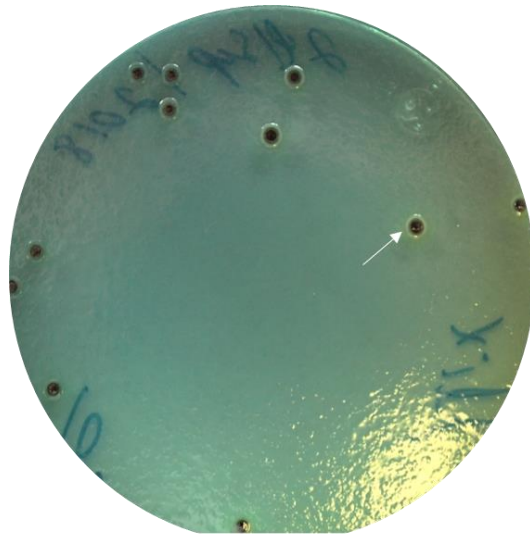


Figura 5.5. Colonias típicas de *Salmonella* en Agar entérico Hektoen con Km⁵⁰ de 72 h de crecimiento. La flecha indica colonia típica con centro oscuro y halo transparente.

5.10. Efecto del sanitizante en el color del nopal verdura

Con la finalidad de determinar el efecto del tratamiento en el color del cladodio se registró el color del tejido antes y después de aplicar cada tratamiento con sanitizante o con agua destilada estéril (testigo) con un colorímetro HunterLab, MiniScan™ (serie 5348, modelo XE Plus No. 45/ O-L USA). El sistema de clasificación de color Hunter se basa en evaluar las variables L*, a* y b*; donde L* indica el índice de oscurecimiento o luminosidad, a* el color rojo y b* el amarillo. Los valores de L* varían de 0 a 100 donde un valor de 0 indica blanco y el de 100 negro (McGuire, 1992; Carvajal *et al.*, 2011).

5.11. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de correlación entre las variables peso, longitu y pH. En el análisis estadístico para la evaluación de carga microbiana se realizó una regresión de Poisson y la comparación de efectos de tratamientos ($p < 0.05$); también se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para conocer la existencia de diferencias significativas en

el pH de las variedades; y un análisis de varianza para un diseño estadístico completamente al azar y prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0.05$) para conocer el efecto de los sanitizantes en el color de los cladodios de nopal. Para todos los análisis se empleó el software estadístico R x64 3.4.1. Los datos de carga microbiana empleados en el análisis estadístico para conocer diferencias entre tratamientos fueron analizados en UFC posteriormente las medias de las en los tratamientos y variedades se transformaron en Log_{10} UFC/mL.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. pH y características físicas

Valores similares de pH se registraron en la parte inferior, media o superior de los cladodios de Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva, cosechados durante el otoño de 2017. Los valores de la media de pH oscilaron entre 4.1 a 4.4 (Cuadro 6.1). Cuando el pH se determinó únicamente en la parte media del cladodio se observaron diferencias en los valores de las variedades de nopal verdura cosechadas durante el 2018. En ese año los cladodios registraron valores de pH entre 4.1 y 5.3 (Cuadro 6.2). Los resultados anteriores coinciden parcialmente con los reportados por Aguilar *et al.* (2007) quienes registraron valores de 4.28 para Atlixco, 4.33 para Copena V1, 4.1 para Milpa alta y 4.42 para Villanueva.

El pH de los cladodios de nopal se ve afectado por diversos factores. En un estudio realizado por Betancourt *et al.* (2006) se señala que el pH está relacionado con la variedad y el tamaño del cladodio. Nopalitos de 14, 17 y 22 cm registraron valores de pH entre 4.05 a 4.55 con el valor más alto registrado en los cladodios de 17 cm de largo. Similarmente Barazarte *et al.* (2017) indicaron que el pH se ve afectado significativamente por la edad del cladodio. Estos investigadores reportaron que cladodios de *Opuntia ficus-indica* de 1 a 4 meses, cosechados antes de las 10:00 h, registraron pH más alto (promedio de 4.52) que los de 5 a 8 meses (promedio 4.08). Los estudios anteriores concuerdan parcialmente con lo reportado en esta investigación.

Cuadro 6.1. Valores comparativos de pH de tejido de cladodios evaluados de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva. Los cladodios se obtuvieron de plantas crecidas en invernadero durante la estación de otoño de 2017.

Variedad / cladodio	pH [†] en posición del cladodio			Media de pH por cladodio
	Inferior	Media	Superior	
Atlixco				
1	4.1	4.2	4.3	4.2
2	4.1	4.1	4.2	4.1
3	4.1	4.1	4.1	4.1
4	4.4	4.3	4.1	4.2
5	3.9	3.9	3.9	3.9
6	4.1	4.0	4.1	4.1
7	4.3	4.3	4.1	4.2
Media posición	4.1	4.1	4.1	4.1
Copena V1				
1	4.6	4.3	4.5	4.4
2	4.2	4.1	4.4	4.2
3	4.0	4.0	4.1	4.0
Media posición	4.3	4.1	4.3	4.2
Milpa alta				
1	4.3	4.2	4.2	4.2
2	4.1	4.0	4.0	4.0
3	4.0	4.0	4.1	4.0
Media posición	4.1	4.1	4.1	4.1
Villanueva				
1	4.4	4.3	4.3	4.4
2	4.3	4.4	4.5	4.4
3	4.4	4.2	4.0	4.2
4	4.4	4.3	4.6	4.4
5	4.4	4.3	4.3	4.4
Media posición	4.4	4.3	4.3	4.3

[†]Valores determinados con un medidor portátil Mettler Toledo, SevenGo™ pH.

Por otra parte, Flores *et al.* (2004) concluyeron que el pH en los cladodios depende de la hora de la cosecha debido al metabolismo de las cactáceas, en el cual los valores se incrementan a medida que aumentan las horas del día. Alvarado *et al.* (2016) señalan que el tipo de suelo donde se produce el nopal verdura también tiene un efecto directo en los valores de pH de los nopalitas ya que se encontró que cladodios de plantas cultivadas con composta y estiércol fresco muestran un pH menor (4.7) que los de plantas sin composta y regadas con agua de pozo (pH 5.1).

Las características de longitud y peso de los cladodios de las cuatro variedades de nopal verdura aquí estudiadas tienen sus diferencias y particularidades. La variedad Atlixco presentó el mayor peso mientras que Copena V1 y Villanueva el menor. Atlixco presentó cladodios de longitud entre 16.5 y 20 cm con peso de 124 g como máximo y 78 g como mínimo, en comparación con las variedades Copena V1, Milpa alta y Villanueva que con el mismo rango de longitud alcanzaron un peso máximo de 80.5, 87.0 y 94.0 g y un peso mínimo de 55.0, 58.5 y 61.5 g, respectivamente (Cuadro 6.2).

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Apodaca *et al.* (2016) quienes, en un estudio de descripción de los cladodios de Atlixco, Copena F1, Copena V1 y Villanueva de *O. ficus-indica* encontraron que los cladodios de Copena V1 eran discoides y con pocas espinas. Estos autores mencionan que los cladodios de Milpa alta y Atlixco de la misma edad al corte presentan longitudes similares. Atlixco y Copena V1 en el estudio resultaron ser variedades con el mayor y el menor peso respectivamente. El grosor de los cladodios de Copena V1 fue mayor y el de los de Milpa alta fue el menor.

Cuadro 6.2. Valores mínimo, máximo y promedio de variables físicas y pH de cladodios de variedades de nopal verdura después de la cosecha.

Variedad [‡]	Variable								
	Longitud (cm)			Peso (g)			pH [†]		
	min.	máx.	media [§]	min.	máx.	media	min.	máx.	media
Atlixco	16.5	20.0	18.6	78.0	124.0	100.1	4.2	5.1	4.5ab
Copena V1	15.5	20.0	17.5	55.0	80.5	68.2	4.6	5.3	4.9a
Milpa alta	16.5	20.0	18.0	51.5	87.0	75.6	4.1	4.2	4.2bc
Villanueva	17.0	20	18.0	61.5	94.0	95.0	4.0	4.3	4.1c

[‡] Cosechada durante el verano-otoño (Atlixco), otoño (Copena V1) y primavera (Milpa alta y Villanueva).

[†] Del centro del cladodio estimado con medidor portátil Mettler Toledo, Seven GO™ pH.

[§]Representa la media de 12 repeticiones.

El análisis de correlación entre longitud y pH o peso y pH de los cladodios, de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura, mostró que no existen correlaciones altas entre esas variables (Cuadro 6.3).

Cuadro 6.3. Análisis de correlación de longitud, peso y pH de los cladodios de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura, crecidas en invernadero.

	Longitud	Peso	pH
Longitud	1.0 [§]	0.6	0.1
Peso	0.6	1.0	0.3
pH	0.1	0.3	1.0

[§]Valor cercano a 1.0 indica alta correlación positiva entre variables.

6.2. Efecto microbicida de sanitizantes en nopal verdura fresco

A continuación, se describen los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad de los extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, del ácido láctico al 1.5 % (T1) y de la mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) (T5) para eliminar a *Salmonella enterica* en cladodios de las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura, sin espinas, tratados por inmersión.

6.2.1. Variedad Atlixco

Los sanitizantes evaluados redujeron la población de la mezcla de los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Javiana*, resistentes a Km⁵⁰ (Figura 6.1). Los extractos T2, T3 y T4 de jamaica disminuyeron entre 1.8 y 2.1 Log₁₀ UFC/mL la población bacteriana, siendo el T3 extracto acetónico de jamaica el de mayor efecto. Sin embargo, de todos los sanitizantes utilizados en este ensayo el T1 ácido láctico al 1.5 % fue el que mayor reducción tuvo en la población de *Salmonella entérica* (2.2 Log₁₀ UFC/mL). El testigo T7 sin sanitizante ni agua destilada estéril se diferenció estadísticamente del testigo T6 agua destilada estéril el cual se distinguió del grupo de sanitizantes (Cuadro 6.4). Entre los extractos T2 metanólico, T3 acetónico y T4 acuoso de jamaica (1 %), el T1 ácido láctico al 1.5 % y T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) no existieron diferencias significativas (P<0.05). En la Figura 6.1 se ilustra el número de colonias de *Salmonella* recuperadas en AEH-Km⁵⁰, después del tratamiento.

Cuadro 6.4. Población de *Salmonella enterica*[†] en cladodios de nopal variedad Atlixco tratados por inmersión.

Tratamiento	Población [‡]		Reducción
	UFC/mL	Log ₁₀ UFC/mL	Log ₁₀
Con <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T7 Sin sanitizante ni agua destilada estéril	17250.0 a	4.2	
T6 Agua destilada estéril	10400.0 b	4.0	0.2
T2 Extracto metanólico de jamaica 1.0%	250.0 c	2.4	1.8
T5 Mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v)	250.0 c	2.4	1.8
T4 Extracto acuoso de jamaica 1.0 %	166.7 c	2.2	2.0
T3 Extracto acetónico de jamaica 1.0 %	133.3 c	2.1	2.1
T1 Ácido láctico 1.5 %	100.0 c	2.0	2.2
Sin <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T8 Sin sanitizante ni agua destilada estéril	0.0 c		

[†]Javiana N4, N14 y Typhimurium N16, Sal4. Inóculo inicial: 8.6 Log₁₀ UFC/mL.

[‡]Los valores representan la media de dos experimentos establecidos por variedad; cada experimento constó de tres repeticiones (tres cladodios) por tratamiento.

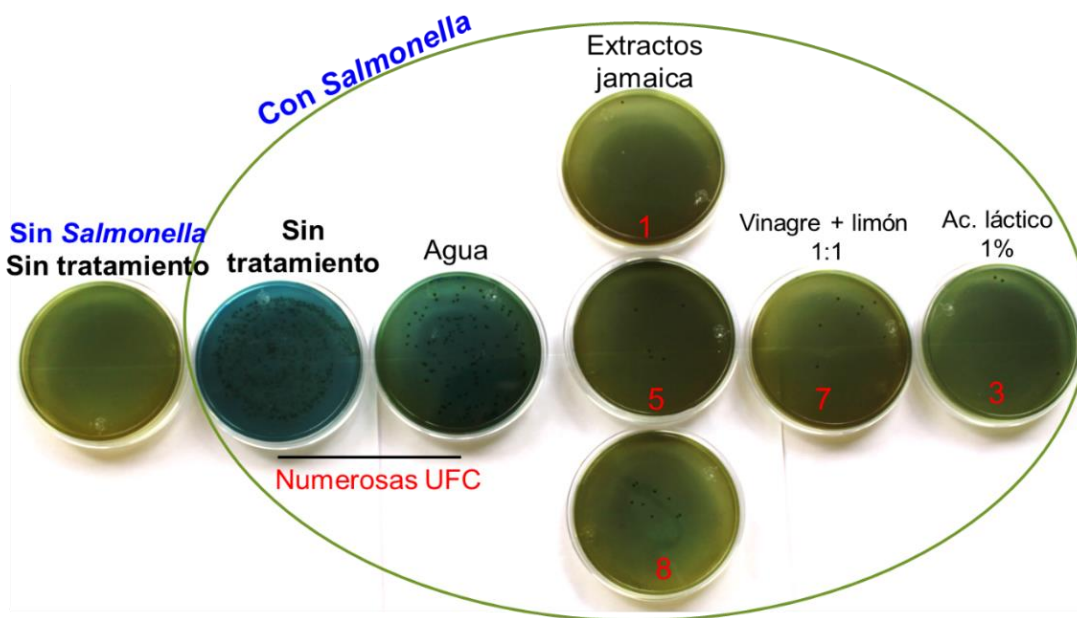


Figura 6.1. Efectividad de tratamientos en la población de *Salmonella* en variedad Atlixco de nopal verdura sin espina. Los números y letras en rojo indican las UFC desarrolladas en AEH-Km⁵⁰ por caja.

6.2.2. Variedad Copena V1

En la variedad Copena V1 el T2 extracto metanólico de jamaica y T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) obtuvieron el mejor efecto en la reducción de la población de *Salmonella* (2.4 Log₁₀ UFC/mL), seguido del T3 extracto acetónico de jamaica (2.1 Log₁₀ UFC/mL), T1 ácido láctico al 1.5 % (1.8 Log₁₀ UFC/mL) y el T4 extracto acuoso de jamaica (1.6 Log₁₀ UFC/mL). La comparación de efectos de tratamientos mostró que el testigo T7 sin sanitizante ni agua destilada estéril se diferenció del testigo T6 con agua destilada estéril y a su vez este último se distinguió de los dos grupos conformados por los sanitizantes (Cuadro 6.5). En la Figura 6.2 se ilustran las colonias de *Salmonella* desarrolladas en AEH-Km⁵⁰, después del tratamiento.

Cuadro 6.5. Población de *Salmonella enterica*[†] en cladodios de nopal variedad Copena V1 tratados por inmersión.

Tratamiento	Población [‡]		Reducción
	UFC/mL	Log ₁₀ UFC/mL	Log ₁₀
Con <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T7 Sin sanitizante ni agua destilada estéril	17800.0 a	4.3	
T6 Agua destilada estéril	11700.0 b	4.1	0.2
T4 Extracto acuoso de jamaica 1.0 %	483.3 c	2.7	1.6
T1 Ácido láctico 1.5 %	350.0 c	2.5	1.8
T3 Extracto acetónico de jamaica 1.0 %	150.0 d	2.2	2.1
T2 Extracto metanólico de jamaica 1.0 %	83.3 d	1.9	2.4
T5 Mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v)	83.3 d	1.9	2.4
Sin <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T8 Sin sanitizante ni agua destilada estéril	1.0 d		

[†]Javiana N4, N14 y Typhimurium N16, Sal4. Inóculo inicial: 8.6 Log₁₀ UFC/mL.

[‡]Los valores representan la media de dos experimentos establecidos por variedad; cada experimento constó de tres repeticiones (tres cladodios) por tratamiento.

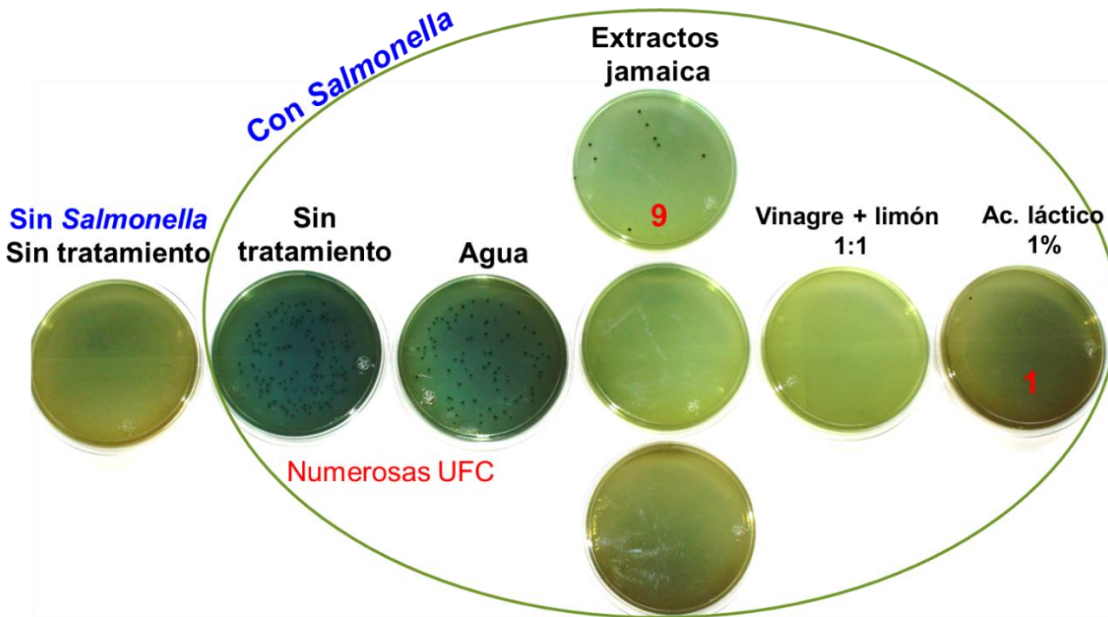


Figura 6.2. Efectividad de tratamientos en la población de *Salmonella* en variedad Copena V1 de nopal verdura sin espinas. Los números y letras en rojo indican las UFC desarrolladas en AEH-Km⁵⁰ por caja.

6.2.3. Variedad Milpa alta

El tratamiento T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) y el T4 extracto acuoso de jamaica fueron los sanitizantes con el mayor (2.9 Log₁₀ UFC/mL) y menor (1.9 Log₁₀ UFC/mL) efecto inhibitorio de la población de *Salmonella enterica* en los cladodios de nopal verdura de la variedad Milpa alta después del tratamiento. Los extractos T3 acetónico y T2 metanólico de jamaica y el T1 ácido láctico al 1.5 % resultaron en reducción de 2.1 a 2.7 Log₁₀ UFC/mL en la población de *Salmonella* (Cuadro 6.6).

El testigo T7 con *Salmonella*, sin sanitizante ni agua destilada estéril fue diferente (P<0.05) del testigo T6 con *Salmonella* con agua destilada estéril. T6 a su vez se distinguió del grupo de sanitizantes, esto de acuerdo con la prueba de comparación de efectos de tratamientos. En la Figura 6.3 se ilustran las colonias de *Salmonella* desarrolladas en AEH-Km⁵⁰, después del tratamiento.

Cuadro 6.6. Población de *Salmonella enterica*[†] en cladodios de nopal variedad Milpa alta tratados por inmersión.

Tratamiento	Población [‡]		Reducción
	UFC/mL	Log ₁₀ UFC/mL	Log ₁₀
Con <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T7 Sin sanitizante y ni agua destilada estéril	14600.0 a	4.2	
T6 Agua destilada estéril	3716.7 b	3.6	0.6
T4 Extracto acuoso de jamaica 1.0 %	183.3 c	2.3	1.9
T1 Ácido láctico 1.5 %	116.7 c	2.1	2.1
T3 Extracto acetónico de jamaica 1.0 %	83.3 c	1.9	2.3
T2 Extracto metanólico de jamaica 1.0 %	33.3 c	1.5	2.7
T5 Mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v)	16.7 c	1.2	2.9
Sin <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T8 Sin sanitizante ni agua destilada estéril	0.0 c		

[†]Javiana N4, N14 y Typhimurium N16, Sal4. Inóculo inicial: 8.6 Log₁₀ UFC/mL

[‡]Los valores representan la media de dos experimentos establecidos por variedad; cada experimento constó de tres repeticiones (tres cladodios) por tratamiento.

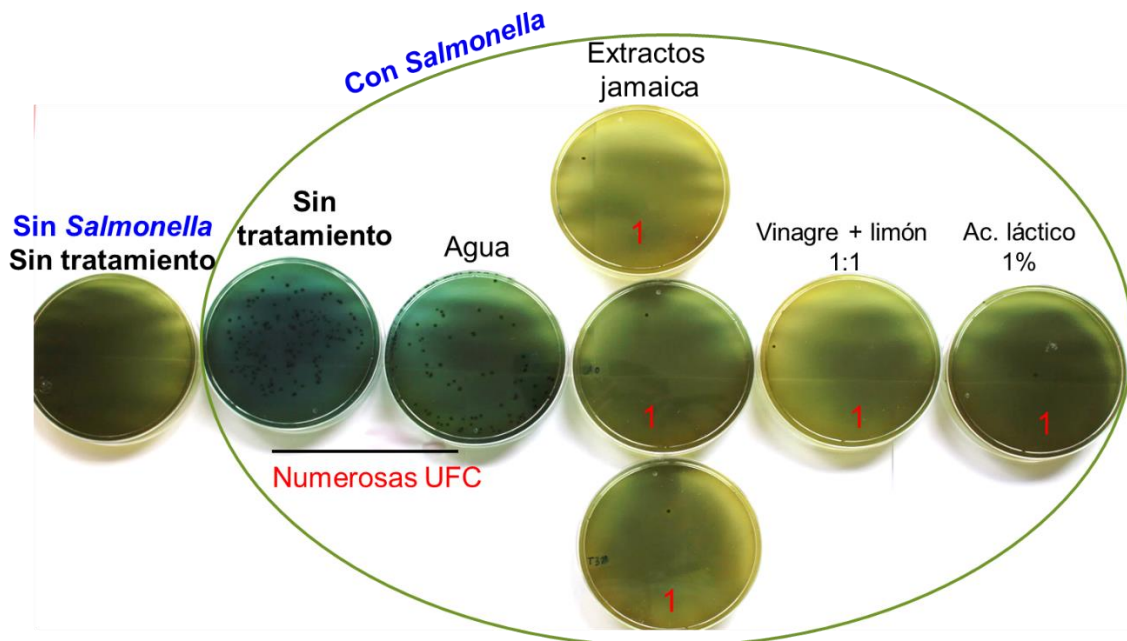


Figura 6.3. Efectividad de tratamientos en la población de *Salmonella* en variedad Milpa alta de nopal verdura sin espina. Los números y letras en rojo indican las UFC desarrolladas en AEH-Km⁵⁰ por caja.

6.2.4. Variedad Villanueva

La mayor reducción de la población de *Salmonella* (4.3 Log₁₀ UFC/mL) en la variedad de nopal Villanueva se registró con el T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v); y la menor con el T3 extracto acetónico de jamaica (2.5 Log₁₀ UFC/mL). La prueba de comparación de medias de efectos de tratamientos del ensayo de sanitización de los cladodios, de ésta variedad, separó tres grupos diferentes (Cuadro 6.7). El número de colonias de *Salmonella* fue mínimo, menor al intervalo cuantificable de 14 UFC, según la NOM-210-SSA1-2014, con los tratamientos con sanitizante (Figura 6.4).

Cuadro 6.7. Población de *Salmonella enterica*[†] en cladodios de nopal variedad Villanueva tratados por inmersión.

Tratamiento	Población [‡]		Reducción
	Log ₁₀		Log ₁₀
	UFC/mL	UFC/mL	
Con <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T7 Sin sanitizante ni agua destilada estéril	18733.3 a	4.3	
T6 Agua destilada estéril	11883.3 b	4.1	0.2
T3 Extracto acetónico de jamaica 1.0 %	66.67 c	1.8	2.5
T1 Ácido láctico 1.5 %	50.0 c	1.7	2.6
T4 Extracto acuoso de jamaica 1.0 %	33.3 c	1.5	2.8
T2 Extracto metanólico de jamaica 1.0 %	16.7 c	1.2	3.1
T5 Mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v)	0.00 c		4.3
Sin <i>Salmonella</i> Km⁵⁰			
T8 Sin sanitizante ni agua destilada estéril	0.0 c		

[†]Javiana N4, N14 y Typhimurium N16, Sal4. Inóculo inicial: 8.6 Log₁₀ UFC/mL.

[‡]Los valores representan la media de dos experimentos establecidos por variedad; cada experimento constó de tres repeticiones (tres cladodios) por tratamiento.

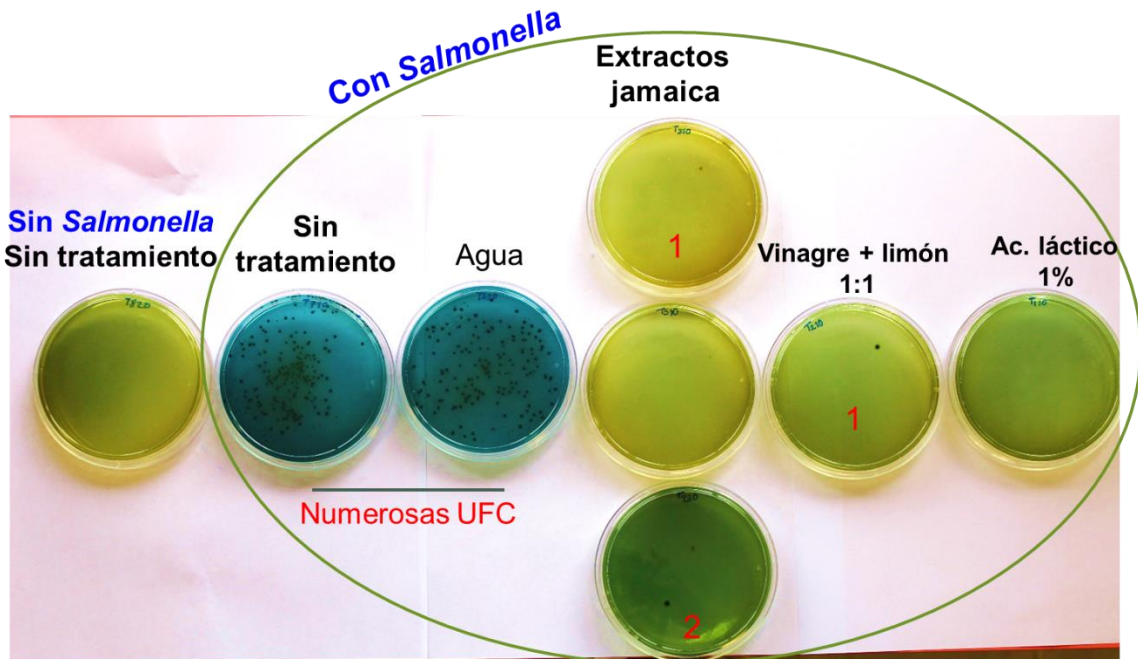


Figura 6.4. Efectividad de tratamientos en la población de *Salmonella* en variedad Villanueva de nopal verdura sin espina. Los números y letras en rojo indican las UFC desarrolladas en AEH-Km⁵⁰ por caja.

6.3. Efecto microbicida de sanitizantes en variedades de nopal verdura

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los extractos T2 metanólico, T3 acetónico y T4 acuoso de cálices de jamaica, el T1 ácido láctico al 1.5 % y T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) tuvieron efecto microbicida significativo ($P < 0.05$) en los cladodios de nopal verdura fresco sin espinas (Cuadro 6.8).

La población de *Salmonella* conformada por la mezcla de *S. Javiana* (cepas N4 y N14) y *S. Typhimurium* (cepas N16 y Sal4), resistentes a Km⁵⁰, registró reducción significativa ($P < 0.05$) entre 2.1 y 2.8 Log₁₀ UFC/mL en promedio, después de que los cladodios, inoculados con la bacteria, se trataron con los sanitizantes (Cuadros 6.8 y 6.9). Es decir, después de la inmersión del tejido de los cladodios en los tratamientos T1 a T5 con sanitizante resultó en la recuperación de 2.0 Log₁₀, en promedio, en la población de

Salmonella, en comparación a las recuperadas con los controles T6 con agua destilada estéril y T7 sin sanitizante ni agua destilada estéril, 3.9 Log₁₀ y 4.2 Log₁₀, respectivamente (Cuadro 6.8).

Aunque se registró menor población promedio de *Salmonella* con los tratamientos T2 extracto metanólico de jamaica y T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v), no se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos con sanitizante (Cuadro 6.8).

Por otra parte, cuando se comparó el efecto de la interacción sanitizante-variedad de nopal verdura fresco en la población de *Salmonella* se encontró que, con excepción de Copena V1, todos tuvieron el mismo efecto microbicida en las variedades Atlixco, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura fresco sin espinas (Cuadros 6.4, 6.6 y 6.7). Es decir, en esas variedades de nopal no se registraron diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos con sanitizante. Sin embargo, en Copena V1 los tratamientos T2 extracto metanólico y T3 extracto acetónico de jamaica y T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) resultaron diferentes ($P < 0.05$) a los tratamientos T1 ácido láctico al 1.5 % y T4 extracto acuoso de jamaica (Cuadro 6.5). Al comparar el efecto microbicida de los sanitizantes por variedad se encontró que la mayor reducción en la población la registraron las variedades Milpa alta y Villanueva con 2.4 y 3.7 Log₁₀ de UFC/mL, en promedio (Cuadro 6.9).

Lo anteriormente descrito indica que *S. Javiana* (cepas N4 y N14) y *S. Typhimurium* (cepas N16 y Sal4) fueron sensibles a los extractos acetónico, acuoso y metanólico de jamaica, ácido láctico al 1.5 % y mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) en nopal verdura fresco sin espinas contaminado con la bacteria.

Cuadro 6.8. Comparación de la población de *Salmonella*[†] recuperada y del efecto del tratamiento por variedad de nopal.

	Tratamiento (T)	pH T	Variedad / pH / Log ₁₀ UFC/mL [‡]				Promedio T
			Atlixco	Copena V1	Milpa alta	Villanueva	
			4.5	4.9	4.2	4.1	
T1	Ácido láctico 1.5 %	2.2	2.0	2.5	2.1	1.7	2.1±0.3c [¥]
T2	Extracto metanólico de jamaica 1.0 %	2.1	2.4	1.9	1.5	1.2	1.8±0.5c
T3	Extracto acetónico de jamaica 1.0 %	2.1	2.1	2.2	1.9	1.8	2.0±0.2c
T4	Extracto acuoso de jamaica 1.0 %	2.5	2.2	2.7	2.3	1.5	2.2±0.5c
T5	Mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v)	2.3	2.4	1.9	1.2	-	1.8±0.6c
T6	Agua destilada estéril	6.5	4.0	4.1	3.6	4.1	3.9±0.2b
T7	Sin sanitizante ni agua destilada estéril		4.2	4.3	4.2	4.3	4.2±0.05a
Promedio población variedad			2.8±0.9a [§]	2.8±1.0a	2.4±0.8b	2.4±1.4a	

[†]S. Javiana (cepas N4 y N14) y S.Thyphimurium (cepas N16 y Sal4). Inóculo inicial: 8.6 Log₁₀ UFC/mL

[‡]Promedio de dos experimentos; cada uno con tres repeticiones.

- Sin valor, sin registro de células de *Salmonella* en AEH-Km⁵⁰. [§]Promedio de 12 repeticiones.

[§] Letras iguales en la fila o columna no son estadísticamente diferentes (Comparación de efectos de tratamiento , 0.05)

Cuadro 6.9. Comparación del efecto de la interacción sanitizante-variedad de nopal verdura en la reducción de la población de *Salmonella*[†].

Tratamiento (T)		Concentración	pH [‡]	Variedad / pH / Reducción Log ₁₀ [‡]				Reducción
				Atlixco	Copena V1	Milpa alta	Villanueva	Promedio T
				4.5ab [‡]	4.9a	4.2bc	4.1c	
T1	Ácido láctico	1.5 %	2.2	2.2	1.8	2.1	2.6	2.2±0.3
T2	Extracto metanólico de Jamaica	1.0 %	2.1	1.8	2.4	2.7	3.1	2.5±0.6
T3	Extracto acetónico de Jamaica	1.0 %	2.1	2.1	2.1	2.3	2.5	2.2±0.2
T4	Extracto acuoso de Jamaica	1.0 %	2.5	2.0	1.6	1.9	2.8	2.1±0.5
T5	Mezcla de vinagre y jugo de limón	1:1 (v/v)	2.3	1.8	2.4	2.9	4.3	2.8±1.0
Promedio población variedad				2.0±0.3c [§]	2.1±0.2c	2.4±0.3b	3.0±0.3a	2.4

[†]Javiana N4, N14 y Typhimurium N16, Sal4. Inóculo inicial: 8.6 Log₁₀.

[‡]Los valores representan la reducción promedio en la población respecto a la población promedio (4.2 Log₁₀) registrada en el control T7 sin sanitizante ni agua destilada estéril.

[‡]Media de pH de 12 repeticiones, Medias con letras iguales en la fila no son estadísticamente diferentes (Kruskal wallis, 0.05)

[§]Medias con letras iguales en la fila no son estadísticamente diferentes (Comparación de efectos de tratamiento, 0.05)

En la variedad Milpa alta, se recuperó la menor población de *Salmonella enterica* (2.4 Log₁₀ UFC/mL), en comparación a lo registrado en las variedades Atlixco, Villanueva y Copena V1 (Cuadro 6.8). Es posible que la reducción significativa (P<0.05) en la población en Milpa alta y la reducción de la población en la variedad Villanueva estén relacionadas con el pH del tejido (4.2 y 4.1), respectivamente (Cuadros 6.2 y 6.9). Alfaro (2019) reportó que el pH afecta la viabilidad de las bacterias. En *Salmonella* la inhibición completa de la población ocurre a pH 3.8 y a pH 4.0 la bacteria (*S. Typhimurium*) puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo (Rychlik y Barrow, 2005; Andino y Hanning, 2015). Sin embargo, para que ocurra lo anterior la bacteria debió de haberse adaptado primero a un pH ácido moderado (de 4 a 5) antes de exponerse a un pH menor a 4.0. Esto debido a la capacidad que tiene *Salmonella* de activar el complejo “respuesta de tolerancia al ácido” (ATR por sus siglas en ingles) que aumenta el potencial de sobrevivencia en pH extremadamente bajo. En este estudio, aparentemente, la bacteria tuvo oportunidad de adaptarse al pH del tejido durante las 18 h que transcurrieron después de la inoculación y tolerar posteriormente los tratamientos con los sanitizantes ácidos (pH de 2.1 a 2.5) aplicados al nopal verdura (Cuadros 6.8, 6.9). Aparentemente el pH del tejido no tuvo un efecto significativo (P<0.05) en la reducción de la población de *Salmonella* en las variedades de nopal verdura (Cuadros 6.8, 6.9). Esto se sustenta en que la población recuperada de las variedades Atlixco y Copena V1, con pH de 4.5 y 4.9, respectivamente, fue similar estadísticamente (P<0.05) a la de Villanueva con pH de 4.1.

Otros factores probablemente también involucrados en la reducción de la población de *Salmonella*, además de los sanitizantes, son los compuestos orgánicos en el tejido del nopal, como el mucilago. Los compuestos orgánicos forman cubiertas o matrices que impiden el contacto microorganismo-sanitizante, o se combinan con el agente activo formando compuestos inertes o con efectividad menor (Vignoli, 2006). Peña *et al.* (2012) reportaron que el contenido de mucilago en la variedad Atlixco es mayor que en las variedades Copena V1 y Milpa alta. Lo anterior puede ser una posible explicación de por qué en la variedad Atlixco se tuvo la menor reducción de la población de *Salmonella* (2.0 Log₁₀ UFC/mL) respecto a lo registrado en Copena V1 y Milpa alta (Cuadro 6.9). Aseveración que concuerda con lo descrito por Hernández y Landa (2016) quienes señalaron que el mucilago (heteropolisacárido soluble en agua) pudo haber afectado la actividad de los sanitizantes Microdin®, Citrik Agro®, ácido láctico (1.5 x 10⁻⁴ ppm) e hipoclorito de sodio (150 ppm) en la eliminación de *Salmonella enterica* en la variedad Milpa alta de nopal verdura fresco sin espinas.

Cabe señalar que el mucilago contiene proporciones variables de los azúcares L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-xilosa. Estos azúcares son utilizados como fuente de carbono por *Salmonella entérica*. La composición del mucilago y la concentración de los carbohidratos que lo constituyen, difiere entre variedades de nopal (Corrales, 2011). Las diferencias de recuperación de UFC en este estudio pueden estar relacionadas a la disponibilidad y cantidad de los azúcares contenidos en las variedades aquí analizadas.

Otro factor posiblemente también relacionado con el tamaño de la población recuperada de *Salmonella*, después del tratamiento, es el contenido de pectina en los cladodios de nopal verdura. Noel *et al.* (2011) indican que la disponibilidad de oligómeros, producto de la degradación de la pectina por otros microorganismos, pueden ser una fuente importante de carbono para la población de *Salmonella*. Al respecto López *et al.* (2012) y Peña *et al.* (2012) señalaron que los cladodios de Milpa alta y Copena V1 registraron menor contenido de pectina, en contraste a Villanueva y Atlixco. En este estudio Milpa alta registró la menor recuperación de UFC con respecto a Villanueva y Atlixco (Cuadro 6.8). Sin embargo, al comparar los valores de tamaño de la población, registrados con el tratamiento T7 sin sanitizante ni agua destilada estéril entre variedades, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre ellos.

Posiblemente estas diferencias, así como las pequeñas diferencias observadas entre tratamientos con sanitizante (T1 a T5) se deban a la interacción específica entre la bacteria y la variedad y entre el tratamiento y el complejo de las características físicas y químicas del tejido de la variedad de nopal verdura, pero no al contenido de pectina.

En el análisis estadístico donde se contrastaron los sanitizantes, la regresión de Poisson y la prueba de comparación de efectos de tratamientos, encontraron y diferenciaron estadísticamente tres grupos con los tratamientos. El primer grupo fue el testigo T7 sin sanitizante ni agua destilada estéril en el que se registraron numerosas colonias ($4.2 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$) de *Salmonella*. El segundo grupo constituido por el testigo T6 agua destilada estéril también con numerosas colonias

(3.9 Log₁₀ UFC/mL); y el tercer grupo, compuesto por los tratamientos con los sanitizantes T1 a T5, donde no existieron diferencias significativas (P<0.05). El tratamiento T3 extracto acetónico de jamaica y el tratamiento T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) fueron los de mayor efecto microbicida de la población bacteriana (2.2 Log₁₀ UFC/mL) seguido de los tratamientos T2 extracto metanólico de jamaica (2.1 Log₁₀ UFC/mL), T1 ácido láctico al 1.5 % (2.0 Log₁₀ UFC/mL) y T4 extracto acuoso de jamaica (0.9 Log₁₀ UFC/mL). Es importante mencionar que no se detectaron colonias sospechosas de *Salmonella* en AHE-Km⁵⁰ en el tratamiento T8 sin *Salmonella*, sin sanitizante ni agua destilada estéril (Cuadros 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7) como se esperaba. Lo anterior indica que los cladodios producidos en el invernadero y utilizados para este estudio estaban libres de *Salmonella*. Este resultado también sugiere que durante el proceso de inoculación, incubación y tratamiento de los cladodios no ocurrió contaminación entre tratamientos.

Los resultados obtenidos con el tratamiento T1 ácido láctico al 1.5 % confirman lo reportado previamente por Hernández y Landa (2016) sobre la actividad antimicrobiana de este sanitizante. Estas investigadoras registraron reducción de 2.2 Log₁₀ UFC/mL, en promedio, en la población de una mezcla preparada con las cepas N4 y Sal4, de *S. Typhimurium*, y N7 de *S. Javiana*, en cladodios de la variedad Milpa alta sin espinas, tratados durante 10 min por inmersión. Cabe señalar que la cepa N7 al igual que las cepas N4, N14 y N16, probadas en este estudio, también se aisló de nopal verdura fresco (Hernández y Landa, 2009).

Por otra parte, el efecto de los tratamientos con los extractos T2 metanólico, T3 acetónico y T4 acuoso de jamaica, en la reducción de la población de *Salmonella*

en nopal verdura fresco sin espinas fue similar al obtenido por Gutiérrez *et al.* (2016) y Rangel *et al.* (2017) cuando probaron esos tratamientos en zanahoria y cilantro, respectivamente. Estos investigadores reportaron reducción de 2.0 y 2.5, en promedio, en la población de una mezcla de los serotipos *S. Montevideo*, *S. Typhi* y *S. Typhimurium* (resistentes a múltiples antibióticos) en rodajas de zanahoria y hojas de cilantro inoculadas artificialmente con la mezcla y tratadas por 5 min con dichos extractos. Actualmente se atribuye la actividad microbicida de los extractos de jamaica a compuestos biológicamente activos tales como el ácido protocatecuico y antocianinas (Liu *et al.*, 2005).

En contraste, los resultados obtenidos con el tratamiento T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) difieren parcialmente de los obtenidos por Sengun *et al.* (2004). De acuerdo a estos autores, la mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) ocasionó reducción en una población de cepas de *S. Typhimurium* en zanahoria, inoculada artificialmente con la bacteria, a nivel indetectable después de 30 min de tratamiento. Aunque en este estudio el tratamiento T5 ocasionó la mayor reducción en la población (2.8 Log₁₀ UFC/mL, en promedio) en comparación a los sanitizantes T1 a T4, en las variedades Atlixco, Copena V1 y Milpa alta se recuperaron algunas colonias de *Salmonella* (Cuadro 6.8). Posiblemente esta diferencia se deba al tiempo de tratamiento y al tejido tratado; 10 min en tejido de nopal con secreción de mucílago en contraste a 30 min en tejido de zanahoria sin secreción de materia orgánica.

Diversos autores como Hernández y Landa (2016), Pfunter (2017) y Vignoli, (2006) indican que factores como el contenido de materia orgánica, el nivel de pH, la

concentración del producto y la temperatura, entre otros, interfieren en la efectividad de los sanitizantes. Así mismo la concentración, las mezclas y los tiempos de exposición afectan la actividad microbiana del sanitizante. Al respecto Sagong *et al.* (2011) señalaron que la eficacia del ácido cítrico en hojas de lechuga inoculadas con *S. Typhimurium* aumentó conforme se incrementó la concentración del ácido alcanzándose reducción de 2.03 Log₁₀ UFC/g en la población bacteriana a los 10 min.

Otros investigadores como Al-Rousan *et al.* (2018) observaron que las mezclas de sanitizantes tienen mayor efectividad que los sanitizantes probados por separado. Estos investigadores reportaron que las mezclas de ácido acético al 0.4 % y ácido cítrico al 0.3 % y la mezcla de ácido acético al 0.4 % y ácido cítrico al 1 % fueron más efectivas en reducir una población de *S. Typhimurium* a niveles no detectables que los ácidos probados por separado, en un estudio para tratamiento de una ensalada conocida como “tabulé”, inoculada artificialmente con la bacteria. Dichas mezclas fueron igualmente efectivas tanto a 4, 10 y 21°C de almacenamiento. La ensalada “tabulé” es una ensalada oriunda de Siria y Líbano preparada a base de vegetales frescos.

En este estudio, con excepción de Villanueva, en todas las variedades se recuperaron algunas células de *Salmonella enterica* después del tratamiento con T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) por 10 min. Un incremento en el tiempo de inmersión con T5 podría ser efectivo para eliminar o reducir la población a niveles no detectables de la bacteria, pero se tendría que evaluar primero el efecto de dicho incremento en el color del tejido para no comprometer la calidad del producto.

6.4. Efecto microbicida de sanitizantes en variedades de nopal verdura

Con excepción del tratamiento T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v), los tratamientos con los sanitizantes no afectaron significativamente ($P \leq 0.05$) la luminosidad o el índice de oscurecimiento del cladodio de nopal verdura durante el tiempo que estuvo en contacto el tejido con el sanitizante. Es decir, la inmersión por 10 min del tejido de los cladodios en los tratamientos T1 a T4 con sanitizante no afectó significativamente ($P \leq 0.05$) la luminosidad del tejido en comparación con la luminosidad registrada en el control T6 agua destilada estéril (Figura 6.5). En contraste el tratamiento T5 mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) afectó significativamente ($P \leq 0.05$) la luminosidad del tejido en comparación con la luminosidad registrada con los tratamientos con sanitizante T1 a T4 y con el testigo T6 (Figura 6.5).

La superficie del tejido de los cladodios tratados con la mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) por 10 min se observó con aspecto blanquecino (Figuras 6.6, 6.7, 6.8 y 6.9). Sagong *et al.* (2011) y Ramos *et al.* (2013) señalan la importancia de considerar el tiempo de tratamiento con sanitizantes para los productos hortofrutícolas. Tiempos prolongados de sanitización (por ejemplo, de 20 min) pueden afectar negativamente la calidad del producto, como lo es el color, la textura y el sabor. En este estudio el problema de afectación del color del tejido con T5 se podría superar si se reduce el tiempo de exposición o bien se prueben otras concentraciones de la mezcla vinagre y jugo de limón sin afectar su efectividad microbicida. La mezcla vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) resultó ser un sanitizante

natural, práctico y de fácil preparación para el tratamiento de los cladodios de nopal verdura.

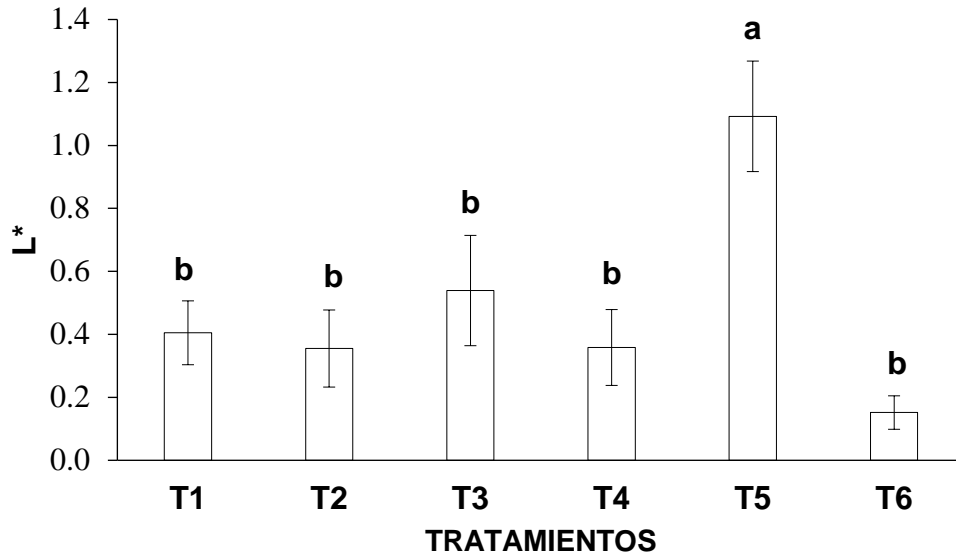
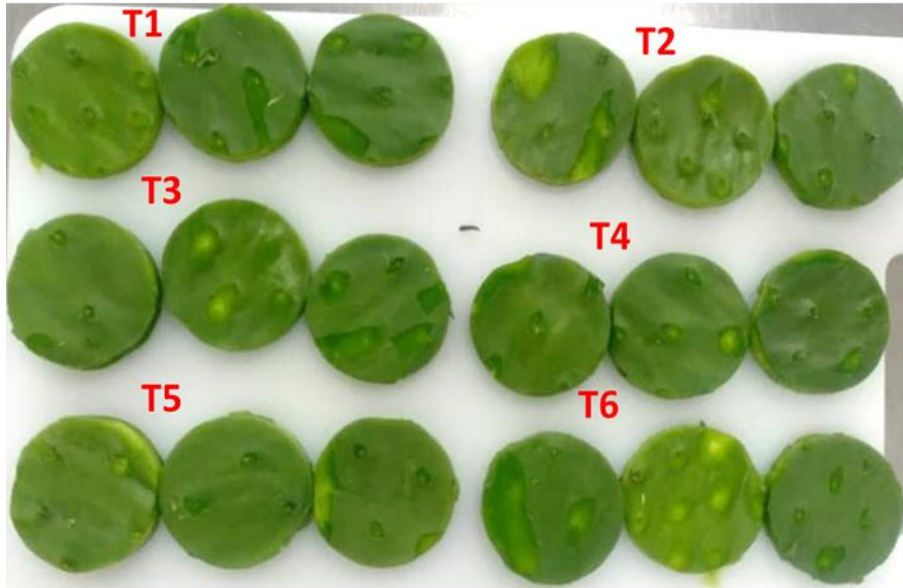


Figura 6.5 Luminosidad del tejido de nopal verdura después del tratamiento con sanitizante o agua destilada. Las barras refieren la media de la diferencia (\pm D.E) de los valores de L* en tejido de nopal verdura antes y después de la aplicación de ácido láctico al 1.5 % (T1), de los extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1(v/v) (T5) y agua destilada estéril (T6). Letra distinta sobre barra indica diferencias ($P \leq 0.05$).

Color antes de tratamiento



Color después de tratamiento

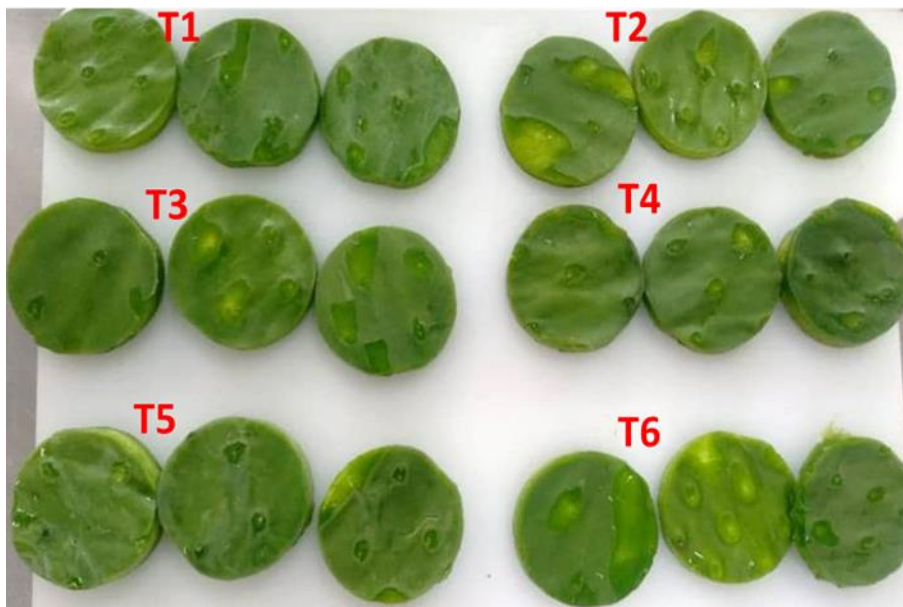


Figura 6.6. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Atlixco.

Color antes de tratamiento



Color después de tratamiento



Figura 6.7. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Copena V1.

Color antes de tratamiento



Color después de tratamiento



Figura 6.8. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Milpa alta.

Color antes de tratamiento



Color después de tratamiento



Figura 6.9. Efecto de los tratamientos ácido láctico al 1.5 % (T1), extractos metanólico (T2), acetónico (T3) y acuoso (T4) de jamaica, mezcla de vinagre blanco y limón 1:1 (v/v) (T5) y agua destilada (T6) en el color del tejido de nopal verdura variedad Villanueva.

7. CONCLUSIONES

1. Las soluciones antimicrobianas de los tres extractos a base de cálices de jamaica (metanólico, acetónico y acuoso al 1 %), la solución del ácido láctico al 1.5 % y la de la mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) resultaron efectivas para eliminar a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (*Salmonella*) de nopal verdura fresco sin espinas.
2. Las soluciones antimicrobianas anteriores resultaron efectivas para eliminar a *Salmonella* en las variedades Atlixco, Copena V1, Milpa alta y Villanueva de nopal verdura fresco sin espinas, artificialmente inoculadas con una mezcla de los serotipos Javiana y Typhimurium de *Salmonella*.
3. Con excepción de la mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v), las soluciones no afectaron el color del tejido de las variedades de nopal verdura fresco sin espinas cuando se aplicaron por inmersión durante 10 min.
4. La mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) afectó el color del tejido. La luminosidad del tejido varió después de la aplicación del tratamiento, existiendo diferencia ($P \leq 0.05$) entre la mezcla de vinagre y jugo de limón con respecto al resto de los tratamientos. La superficie del tejido de los cladodios tratados se observó con aspecto blanquecino.
5. Los sanitizantes a base de cálices de jamaica al 1 %, la solución del ácido láctico al 1.5 % y la mezcla de vinagre y jugo de limón 1:1 (v/v) podrían ser una alternativa para la inocuidad microbiana del nopal verdura fresco sin espinas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca O.R., Hernández E.F., Torres L.E.E., Rosales M.A.O. (2012). Producción de nopal verdura en condiciones de invernadero. Sexta Época. 16 (31).
- Aguilar S. L., Martínez, D. M. T., Barrientos P. A. F., Aguilar G. N., Gallegos V. C. (2007). Potencial de oscurecimiento enzimático de variedades de nopalitos. J. PACD, 9:165-184.
- Al-Rousan W. M., Olaimat A. N., Osaili T. M., Al-Nabulsi A. A., Ajo R., Holley R. A. (2018). Use of acetic and citric acids to inhibit *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in tabbouleh salad. Food Microbiology, 73: 61-66.
- Alvarado R. H. E., Salinas C., Ortiz H.G. (2016). Peso fresco y calidad de nopalito (*Opuntia ficus-indica* L.) fertilizado con composta de estiércol de vaca. TECNOCENCIA Chihuahua, 10 (1): 13-22.
- Andino, A., Hanning, I. (2015). *Salmonella* enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. The Scientific World Journal, vol. 2015.
- Annous B.A., Ethan B.S., Cooke P., Burke A. (2005). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on Cantaloupe melons. J. Food Safety. 25:276-287.
- Ahvenainen R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables. Trends Food Sci. Technol. 7:179-187.
- Apodaca P.J. M., Martínez M.M. D. L. L., Robles B. M. D. R., Rodríguez F.A. (2016). Polifenoloxidasas, fenoles totales y oscurecimiento de nopal verdura. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas, 7(3):531-543.
- Barazarte H., Terán Y., D'Aubeterre R., Pérez L., Garmendia C., Moreno I., Sánchez U. A. B. (2017). Características físicas y químicas de cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Revista de la Facultad de Agronomía, 34(2): 175-186.

- Betancourt D., M. A., Hernández P. T., García S.P., Cruz H. A., Paredes L. O. (2006). Physico-chemical changes in cladodes (nopalitos) from cultivated and wild cacti (*Opuntia* spp.). *Plant Foods For Human Nutrition*, 61(3): 115-119.
- Bravo H.H. 1978. Las Cactáceas de México. UNAM. México. 2ª ed Vol. 1
- Brandl M., Amudson R. (2008). Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8):2298-2306.
- Cantwell M., Rodríguez F.A., Robles C. F. 1992. Postharvest physiology of pickly pear cactus stems. *Scientia Horticulturae* 50:1-9
- Centers for Disease Control and Prevention. (2011). https://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf. [Consultado el día 18 de agosto del 2018]
- CESVMOR. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Morelos. (2011). 1er. Simposium Estatal de Nopal Verdura en Morelos.
- Chan K., Baker S., Kim CC., Detweiler CS., Dougan G., Falkow S. (2003). Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* by Use of an *S. enterica* Serovar Typhimurium DNA Microarray. *Journal of Bacteriology*, 185(2): 553-563.
- Conabio. (2010). Nopales Historia natural. En: <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/nopales/NhistNat.html> [consultado el día 26 de febrero de 2018]
- Corrales G. J., Flores V.C. (2003). Nopalitos y Tunas: Producción, Comercialización, Postcosecha e Industrialización. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 225 p.
- Corrales G. J. (2011). Perspectivas agroindustriales de la postcosecha de nopalito y tuna. IX Simposium-Taller Nacional y II Internacional sobre “Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey”, 12-13.

- De los Santos V. A. A., Hernández A. A. M., Eslava C. C. A., Landa S. P., Mora A. G., Bernard L. J. (2012). Producción de biopelículas y resistencia a desinfectantes en cepas de *Salmonella* aisladas de nopal, agua y suelo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1063-1074.
- Doyle M. P., and Erickson M. C. (2008). Summer Meeting 2007 – the problems with fresh produce an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2):317-330.
- Flores H. A., I. Orona C., B. Murillo A. R., Valdez C. J., García H. (2004). Producción y calidad de nopalitas en la región de la Comarca Lagunera de México y su relación con el precio en el mercado nacional. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 6:23-34.
- Food and Drug Administration (FDA). (2017). En: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/la-fda-investiga-multiples-brotes-de-cepas-de-salmonella-vinculadas-papayas> [Consultado el día 13 de agosto de 2018]
- Gutiérrez C. A. D. C., Paasch M. L. H., Calderón A. N. L. (2008). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria México*, 39(1), 81-90.
- Granados S. D., Castañeda P. A. D. (2003). El nopal, historia, fisiología, genética, e importancia frutícola. 4^{ta} reimpresión. Editorial Trillas. México. pp: 227.
- Gutiérrez A. E. J., Gómez A. C. A., Román G. A. D., Rangel G. E., González O. L. G., Castro R. J. (2016). Antimicrobial activity of roselle *Hibiscus Sabdariffa* calyx extracts on culture media and carrots against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from raw carrots. *Journal of Food Safety*, 36(4): 450-458.
- Hernández U. M. I., Contreras P. M., Pérez T. E., Hernández Q. G., Rojas M. J. I., Cortes M. E., Rodríguez G. M. E. (2010). Study of nutritional

composition of nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *Open Nutr J*, 4: 11-16.

Hernández A.M., Landa P., Mora G., Eslava A., Call J., Porto-fett A., Luchansky J. (2009). Characterization of *Salmonella* spp. from nopal cladodes and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. Abstracts of the Annual Meeting of the International Association for Food Protection (IAFP). Grapevine, Texas. 12-15 July. P1-37, p 74-75.

Hernández A., and P. Landa. (2016). Efectiveness of comercial sanitizers for reducing *Salmonella* on tender cactus pads (*Opuntia ficus-indica*).in: Proc. IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety 7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting. G. V. Nevárez-Moorillón (ed.) Asociacion Mexicana de Ciencias de los Alimentos A.C. PP: 709-714

Holden N., Pritchard L., Toth I. (2009). Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbial Review* 33: 689-703.

Hood S., and Zottola E. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International J. Food Microbiol.* 37(3):145-153.

Jaroni, D., Ravishankar, S. (2012). Bactericidal effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) against foodborne pathogens in vitro and on romaine lettuce and alfalfa sprouts. *Quality Assurance and Safety of Crops y Foods*, 4(1): 33-40.

Johnston L. M., Jaykus L. A., Moll D. (2006). A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Inter. J. Food Microbiol.* 112(2):83-95.

Jackson B. R., Griffin P. M., Cole,D., Walsh K. A., Chai S. J. (2013). Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. *Emerging infectious diseases*,19(8); 1239.

- Landa S. P., Hernández A. A. M., Vargas H. M., Eslava C. C. A., Chaidez Q. C., Patel J. (2013). Persistencia de *Salmonella* Typhimurium en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(2): 147-153.
- Langridge G.C., Nair S., Wain J. (2009). Nontyphoidal *Salmonella* serovars cause different degrees of invasive disease globally. *J Infect Dis* 199:602-603.
- López P. C., Peña V. C. B., Reyes A. J. A., Rodríguez H.A. I. (2012). Effects of domestication on structural polysaccharides and dietary fiber in nopalitos (*Opuntia* spp.). *Gen. Res. Crop Evol.* 59: 1015-1026.
- Liu K. S., Tsao S. M., Yin M. C. (2005). In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(11), 942-945.
- McGuire, R. G. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.
- McClelland M., Sanderson K. E., Spieth, J., Clifton S. W., Latreille P., Courtney L., Hou S. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852.
- McConn M., Nakata A. (2004). Oxalate reduces calcium availability in the pads of prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *J. Agric. Food Chem.* 52:1371-1374.
- Morris J. G., Potter, M. (2013). *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press. (5) 67-97.
- Meylan E., Tschopp J., Karin M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442(7098): 39
- Muñoz de Chávez M., Chávez A., Valles V., Roldán J. A. (1995). The nopal: a plant of manifold qualities. *World Rev. Nutr. Diet.* 77:109-134.

- Noel, J. T., Arrach, N., Alagely, A., McClelland, M., Teplitski, M. (2010). Specific responses of *Salmonella enterica* to tomato varieties and fruit ripeness identified by in vivo expression technology. *PLoS One*, 5(8), e12406.
- Noel, J. T., Teplitski, M. (2011). Does pectolytic activity of phytopathogens enhance *Salmonella* proliferation in tomato fruits? In *Phytopathology* 101(6): S212-S213.
- Parish M. E., Beuchat L. R., Suslow T. V., Harris, L. J., Garrett E. H., Farber J. N., Busta F. F. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2, 161-173.
- Peña V. C. B., Trejo C., Arroyo P. V. B., Sánchez U.A. B., Balois M. R. (2012). Diversity of unavailable polysaccharides and dietary fiber in domesticated nopalito and cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Chemistry y Biodiversity*, 9(8): 1599-1610.
- Pfuntner, A. (2011). Sanitizers and disinfectants: the chemicals of prevention. *Food Safety magazine*.
- Pfuntner, A. (2017). Sanitizers and disinfectants: the chemicals of prevention. *Food Safety magazine*.18-21
- Puente J. L., Calva E. (2017). El cocoliztli: Armas biológicas involuntarias durante la conquista de México. *Biotecnología en movimiento*.
- Ramayo R. L., Saucedo V. C., Lakshminarayana. (1978). Prolongación de la vida de almacenamiento del nopal hortaliza (*Opuntia inermis Coulter*) por refrigeración. *Chapingo, Nueva Época* 10: 30-32.
- Rodríguez F. A., Villegas O. M. (1997). Quality of cactus stems (*Opuntia ficus-indica*) during low temperature storage. *Cactus Development* 2:142-151.
- Ramos B., Miller F. A., Brandão T. R., Teixeira P., Silva C. L. (2013). Fresh fruits and vegetables—an overview on applied methodologies to improve

its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20: 1-15

Rangel V. E., Gutiérrez A. E. J., Gómez A. C. A., Falfán C. R. N., Segovia C. J. A., Salas R. L. P., Castro R. J. (2017). Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* serotypes isolated from coriander. *Journal of Food Safety*, 37(2).

Reyes A. J. A., Aguirre R. J. R., Hernández H. M. (2005). Systematic notes and a Detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L) Mill.(CACTACEAE). *Agrociencia*, 39(4).

Reyes A. J.A., Aguirre R. J.R., Carlín C. F., González D. A. (2009). Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de *Opuntia* en la Altiplanicie Meridional de México. UASLP., SAGARPA y CONACYT San Luis Potosí, S.L.P. México. 350 p.

Rychlik, I., Barrow, P. A. (2005). *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), 1021-1040.

Rodríguez F. A., Cantwell M. (1988). Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods Hum. Nutr.* 38:83-93.

Ruales J., Zumba J. (1998). Cuantificación y caracterización de fibra dietética en frutas y hortalizas ecuatorianas. pp. 55-59. *In*: Lajolo F. M. y Wenzel de Menezes, E. (eds.). *Temas en Tecnología de Alimentos*. Vol. 2. Fibra Dietética. CYTED. Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos, Instituto Politécnico Nacional. México.

Sáenz C. (2004). Compuestos funcionales y alimentos derivados de *Opuntia* spp. p. 211-222. *In*: Esparza, G. Valdez R. Méndez S. (eds.). *El Nopal, Tópicos de Actualidad*. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

- SAGARPA. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2017). En: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/222630/Boletin_de_exportaciones_nopalitos_2017_05.pdf. [Consultado el día 16 de noviembre de 2018].
- SAGARPA. (2013). En: <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>. [Consultado el día 22 de septiembre de 2018]
- SAGARPA. (2017). <https://www.gob.mx/siap/articulos/nopalitos-tesoro-gastronomico-de-mexico>. [Consultado el día 17 de octubre de 2018].
- Schmidt H. H., Pennacchiotti I., Masson L. Mella M. A. (1990). Tabla de composición química de alimentos chilenos. (8ª ed.). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago.
- Sagong H. G., Lee S. Y., Chang P. S., Heu S., Ryu S., Choim. J., Kang D. H. (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal Of Food Microbiology*,145(1): 287-292.
- Sánchez V. F. M., Abu-El-Haija M. A., Gómez D. O. G. (2011). *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine And Infectious Disease*, 9(6): 263-277.
- Scheinvar L., C. Gallegos. (2011). Estado del conocimiento de las especies del nopal (*Opuntia* spp.) productoras de xoconostles silvestres y cultivadas. México, D. F., UNAM-Instituto de Biología-CONABIO.
- Secretaria de salud (SSA). (2018). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. En: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/425972/sem52.pdf>. [Consultado el día 16 de enero de 2019].

- Sengun I. Y., Karapinar M. (2004). Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 96(3): 301-305.
- SSA, Secretaria de Salud. (2018). Boletín epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información. Número 52, volumen 35, Semana 52. Ciudad de México. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/425972/sem52.pdf>
- Stintzing F.C., Carle R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition y Food Research* 49(2):175 – 194.
- Suárez M., Entenza J. M., Doerries C. (2003). Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnol Bioeng.* 81:13.
- Sudzuki F., Muñoz C., Berger H. (1993). El cultivo de la Tuna. Editado por el Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile. Impresión en Talleres Gráficos INIA. Santiago de Chile. 88 pp.
- Terragno R., Caffer M. A. I., Bruno S., 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.
- Tyler H. L., Triplett E. W. (2008). Plants as habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 46:53–73.
- Tzschope M., Martin A., Beutin L. (2012). A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 152(1-2):19-30.

- Ukuku D. O., G. M. Sapers. (2006). Microbiological safety issues of fresh melons. *In: Microbiology of Fruits and Vegetables*. G Sapers, R Gorny, A E Yousef (eds). CRC. USA. pp:231-250.
- Vanegas L., Correa C., Morales M., Martínez L., Rúgeles G., and Jiménez I. (2009). Antibiotic resistance of bacteria isolated from biofilms in a food processing plant. *Rev. MVZ Córdoba*. 14:2.
- Valadez-Moctezuma, E., Samah, S., Luna-Paez, A. (2015). Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant systematics and evolution*,301(2), 737-747.
- Vignoli, R. (2006). Esterilización y desinfección. *Temas de Bacteriología y Virología para CEFA*. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Instituto de Higiene.
- Wu F.M., Doyle M. P., Beuchat L. R., Wells J. G., Mintz E. D., Swaminathan B. (2000). Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *J Food Prot* 63(5):568-72
- Zambrano M. L., Hernández A. D. y Gallardo Y. (1998). Caracterización fisicoquímica del nopal. *In: M. Lajolo y E. Wenzel de Menezes, (eds.)*. *Temas en Tecnología de Alimentos*. Vol. 2. Fibra Dietética. F. CYTED. Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos, Instituto Politécnico Nacional. México. pp. 29-42.

ANEXOS

Anexo A: Medios

Agar Entérico Hektoen (AEH, BD BIOXON®) con Kanamicina (Km)

Disolver 76 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir hasta obtener disolución completa del medio. Enfriar a 45 °C. Vaciar en cajas Petri estériles y agregar 1000 µL de solución stock de Km (50 µg/mL) (ver abajo preparación), agitar y vaciar en cajas Petri estériles.

Agar Soya Trypticaseína (AST, BD BIOXON®) con Kanamicina

Hidratar y disolver de 10 a 15 min 40 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir por un min para que se disuelva. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 min. Enfriar a 45 °C y agregar 1000 µL de solución stock de Km (50 µg/mL), agitar y vaciar en cajas Petri estériles.

Agua Peptonada Buferada a 0.1 % (DIFCO™)

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

Caldo Soya Trypticaseína (CST, BD BIOXON®)

Suspender 30 g del medio en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 min. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta disolver completamente. Distribuir en tubos de ensaye y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 min.

Preparación de Solución Stock de Km (SIGMA-ALDRICH®)

Para preparar una solución stock de Km a 50 mg/mL, adicionar 250 mg del antibiótico a 5 mL de agua destilada estéril y mezclar en un vaso de precipitado de 10 mL, previamente esterilizado. Filtrar la solución de Km a través de un filtro

Millipore® estéril. Utilizar portafiltro (previamente esterilizado) y jeringa estéril y recuperar la solución filtrada de Km (V_1) en tubos STARTED® de 2 mL.

Preparación de CST con Diferente Concentración de Km

En tubos de ensaye con 5 mL de CST se deposita el volumen V_1 correspondiente a la concentración a preparar; es decir, 12.5, 25 o 50 $\mu\text{g/mL}$. El V_1 correspondiente se obtiene con la siguiente ecuación:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

- a) Primera serie de tubos con CST + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de Km

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

- b) Segunda serie de tubos con CST + 25 $\mu\text{g/mL}$ de Km

$$V_1=\frac{(25\mu\text{g/mL})(5000\mu\text{L})}{50000\mu\text{g/mL}}=2.50\ \mu\text{L}$$

- c) Tercera serie de tubos con CST + 50 $\mu\text{g/mL}$ de Km

$$V_1=\frac{(50\mu\text{g/mL})(5000\mu\text{L})}{50000\mu\text{g/mL}}=5.0\ \mu\text{L}$$

Preservación de Cepas de *Salmonella* en Glicerol (ALTA PUREZA®)

Crece una colonia en tubos con 5 mL de CST suplementados con 50 $\mu\text{g/mL}$ de Km (Km^{50}) sin agitación a 37 °C por 18 h. Después de la incubación tomar 600 μL de suspensión bacteriana y depositarlos en tubos STARTED® con 400 μL de glicerol al 50 % (p/p), previamente esterilizado. Almacenar las suspensiones a -20°C.

Anexo B: Composición de los extractos a base de cáliz de jamaica[‡]

➤ Extracto acuoso

-Extracto acuoso de cálices de jamaica (1%), ácido acético (0.5 %), hipoclorito de sodio (100 mg/L) y polisorbato 80 (2%).

Solicitud de patente: MX/a/2013/014626

➤ Extracto acetónico

Extracto acetónico de cálices de jamaica (1%), ácido acético (0.5 %), hipoclorito de sodio (100 mg/L) y polisorbato 80 (2%).

Solicitud de patente: MX/a/2013/014627

➤ Extracto metanólico

Extracto metanólico de cálices de jamaica (1%), ácido acético (0.5 %), hipoclorito de sodio (100 mg/L) y polisorbato 80 (2%).

Solicitud de patente: MX/a/2013/014628

[‡]Proporcionados por el Dr. Javier Castro Rosas, Profesor-Investigador de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, del Área Académica de Química Microbiología e Inocuidad Alimentaria durante el periodo de otoño 2017 a primavera 2018).

Anexo C: Códigos de análisis estadísticos en el programa R.

Regresión de Poisson y comparación de efectos de tratamientos bajo modelo ajustado para el ensayo con sanitizantes y variedades de nopal verdura

```
dataSANITIZANTE=read.table("clipboard", header=T)
ANARES= glm(UFC~Variedad, family="quasipoisson",data=dataSANITIZANTE)
anova(ANARES, test="Chisq")
Compa1= lsmeans(ANARES,"Variedad")
Contrasts=list(Atlixco_vs_Copena = c(1, -1, 0, 0))
CATL_COP<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CATL_COP
Compa1= lsmeans(ANARES,"Variedad")
Contrasts=list(Atlixco_vs_MilpaAlta = c(1, 0, -1, 0))
CATL_MAL<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CATL_MAL
Compa1= lsmeans(ANARES,"Variedad")
Contrasts=list(Atlixco_vs_Villanueva = c(1, 0, 0, -1))
CATL_VIL<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CATL_VIL
Compa1= lsmeans(ANARES,"Variedad")
Contrasts=list(Copena_vs_MilpaAlta = c(0, 1, -1, 0))
CCOP_MAL<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CCOP_MAL
Compa1= lsmeans(ANARES,"Variedad")
Contrasts=list(Copena_vs_Villanueva = c(0, 1, 0, -1))
CCOP_VIL<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CCOP_VIL
Compa1= lsmeans(ANARES,"Variedad")
Contrasts=list(MilpaAlta_vs_Villanueva = c(0, 0, 1, -1))
CMAL_VIL<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CMAL_VIL
ANARES= glm(UFC~Tratamiento, family="quasipoisson",data=dataSANITIZANTE)
anova(ANARES, test="Chisq")
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(ACLAC_vs_EXTMET= c(1, 0, 0, 0, 0, -1, 0, 0))
CT1_CT2<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT1_CT2
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(ACLAC_vs_EXTACET = c(1, 0, 0, -1, 0, 0, 0, 0))
CT1_CT3<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT1_CT3
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(ACLAC_vs_EXTACU = c(1, 0, 0, 0, -1, 0, 0, 0))
CT1_CT4<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT1_CT4
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
```

```

Contrasts=list(ACLAC_vs_VIN_AGUA = c(1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, -1))
CT1_CT5<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT1_CT5
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(ACLAC_vs_AGUA = c(1, -1, 0, 0, 0, 0, 0, 0))
CT1_CT6<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT1_CT6
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(ACLAC_vs_CONSIN = c(1, 0, -1, 0, 0, 0, 0, 0))
CT1_CT7<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT1_CT7
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(ACLAC_vs_SBYSA= c(1, 0, 0, 0, 0, 0, -1, 0))
CT1_CT8<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT1_CT8
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(AGUA_vs_CONSIN = c(0, 1, -1, 0, 0, 0, 0, 0))
CT6_CT7<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT6_CT7
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(AGUA_vs_EXTACET = c(0, 1, 0, -1, 0, 0, 0, 0))
CT3_CT6<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT3_CT6
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(AGUA_vs_EXTACU = c(0, 1, 0, 0, -1, 0, 0, 0))
CT4_CT6<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT4_CT6
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(AGUA_vs_EXTMET= c(0, 1, 0, 0, 0, -1, 0, 0))
CT2_CT6<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT2_CT6
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(AGUA_vs_SBYSA= c(0, 1, 0, 0, 0, 0, -1, 0))
CT6_CT8<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT6_CT8
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(AGUA_vs_VINAGUA= c(0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, -1))
CT5_CT6<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT5_CT6
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(CONSIN_vs_EXTACET= c(0, 0, 1, -1, 0, 0, 0, 0))
CT3_CT7<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT3_CT7
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(CONSIN_vs_EXTACU= c(0, 0, 1, 0, -1, 0, 0, 0))
CT4_CT7<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT4_CT7

```

```

Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(CONSIN_vs_EXTACU= c(0, 0, 1, 0, -1, 0, 0, 0))
CT4_CT7<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT4_CT7
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(CONSIN_vs_EXTMET= c(0, 0, 1, 0, 0, -1, 0, 0))
CT6_CT7<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT6_CT7
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(CONSIN_vs_SBYSA= c(0, 0, 1, 0, 0, 0, -1, 0))
CT7_CT8<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT7_CT8
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(CONSIN_vs_VINAGUA= c(0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, -1))
CT5_CT7<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT5_CT7
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTACET_vs_EXTACU= c(0, 0, 0, 1, -1, 0, 0, 0))
CT3_CT4<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT3_CT4
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTACET_vs_EXTAMET= c(0, 0, 0, 1, 0, -1, 0, 0))
CT2_CT3<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT2_CT3
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTACET_vs_SBYSA= c(0, 0, 0, 1, 0, 0, -1, 0))
CT3_CT8<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT3_CT8
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTACET_vs_VINAGUA= c(0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, -1))
CT3_CT5<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT3_CT5
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTACU_vs_EXTAMET= c(0, 0, 0, 0, 1, -1, 0, 0))
CT2_CT4<- contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT2_CT4
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTACU_vs_SBYSA= c(0, 0, 0, 0, 1, 0, -1, 0))
CT4_CT8<-contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT4_CT8
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTACU_vs_VINAGUA= c(0, 0, 0, 0, 1, 0, 0, -1))
CT4_CT5<-contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT4_CT5
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTAMET_vs_SBYSA= c(0, 0, 0, 0, 0, 1, -1, 0))
CT2_CT8<-contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")

```

```

CT2_CT8
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(EXTAMET_vs_VINAGUA = c(0, 0, 0, 0, 0, 1, 0, -1))
CT2_CT5<-contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT2_CT5
Compa1= lsmeans(ANARES,"Tratamiento")
Contrasts=list(SBYSA_vs_VINAGUA = c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, -1))
CT5_CT8<-contrast(Compa1,Contrasts, adjust="sidak")
CT5_CT8

```

ANAVA y comparación de medias Tukey para luminosidad antes y después de los tratamientos

```

datacolor=read.table("clipboard", header=T)
attach(datacolor)
datacolor
modelcolor=aov(Luminosidad~Tratamiento)
shapiro.test(modelcolor$residuals)
bartlett.test(Luminosidad~Tratamiento)
Tluminosidad=sqrt(Luminosidad)
data=cbind(Luminosidad, Tluminosidad)
data
modelcolor1=aov(Tluminosidad~Tratamiento)
shapiro.test(modelcolor1$residuals)
bartlett.test(Tluminosidad~Tratamiento)
summary(modelcolor1)
tukeylum=HSD.test(modelcolor1,"Tratamiento")
tukeylum

```

Prueba de Kruskal-Wallis para pH de los cladodios de las cuatro variedades de nopal verdura

```
dataph=read.table("clipboard",header=T)
```

```
attach(dataph)
```

```
dataph
```

```
kruskal.test(pH~Variedad,dataph)
```

```
boxplot(pH~Variedad,data=dataph)
```

```
instalar paquetería "Pgirmess"
```

```
kruskalmc(pH~Variedad,data=dataph)
```