

CONTAMINACIÓN MICROBIANA DURANTE LA PRODUCCIÓN Y COSECHA DE AGUACATE (*Persea americana* CV. HASS) Y TRATAMIENTOS DE DESCONTAMINACIÓN DEL EPICARPIO

Rodríguez-García, Ofelia

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Correo-e: ofelia.rodriguez@cucei.udg.mx

Resumen

La salud humana es una meta central para la sustentabilidad. La producción de alimentos es un área importante dentro de la sustentabilidad, y la inocuidad de alimentos está relacionada tanto con la salud como la economía. En el caso del aguacate, algunos subproductos han sido objeto de decomiso en países importadores. Los patógenos mayormente involucrados en decomisos son *Salmonella*, y *Listeria monocytogenes*. El consumo de alimentos contaminados se reconoce como un problema prioritario a escala mundial. El objetivo de este estudio fue proveer un soporte científico a las normas y prácticas agrícolas sanitarias encaminadas a proteger la inocuidad microbiana del aguacate; y comparar la eficacia del lavado y procedimientos de descontaminación para reducir *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 en la superficie de aguacates inoculados. Se diseñaron tratamientos de descontaminación del epicarpio mediante: lavado, ácido láctico al 2% a 55°C, ácido peracético, cloro, sustancias naturales, y agua electrolizada oxidante, se evaluó su efectividad para reducir esos patógenos. El ácido láctico redujo 3.4 Log UFC por aguacate. Las reducciones con ácido peracético, cloro, sustancias naturales fueron de <2 Log UFC por aguacate similares cuando se lavó con agua. El tratamiento con agua electrolizada oxidante mostró reducciones de 4 a 5.8 Log UFC cm⁻² para *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. El papel que la ciencia desempeña como factor de sustentabilidad en el desarrollo del país, se expresa en este estudio con experiencias de valor objetivo para actualizar las normas y operaciones agrícolas que protejan la inocuidad microbiana del aguacate.

Palabras clave adicionales: *Salmonella*, *Listeria*, patógenos, reducción superficial.

MICROBIAL CONTAMINATION DURING THE PRODUCTION AND HARVESTING OF AVOCADO (*Persea americana* CV. HASS) AND EPICARP DECONTAMINATION TREATMENTS

Abstract

The human health is the basic and central objective of sustainability. Some avocado subproducts have been object of produce recalls in different importer countries. The pathogens most involved in recalls are *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. The objectives of this study were: (i) to provide a scientific support to the regulations and good agricultural practices (GAP) aimed to protect the microbial safety of avocado, and (ii) to compare the efficacy of different washing and sanitizing procedures at reducing *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of inoculated avocados. Surface decontamination treatments for avocados evaluated were: water wash, 2% lactic at 55°C, peracetic acid, chlorine, natural substances, hot water and electrolyzed oxidizing water. Lactic acid treatment reduced 3.4 log CFU per avocado. Reductions with peracetic acid, chlorine, and natural substances were <2 log CFU per avocado similar than a water wash. Treatment with electrolyzed oxidizing water showed reductions of 4 to 5.8 log UFC cm⁻² for *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. The role that science plays as factor of sustainability in the

development of the country is expressed in this study with experiences of target value to update the agricultural operations and regulations to protect the avocado microbial safety.

Additional keywords: *Salmonella*, *Listeria*, pathogens, surface reduction

Introducción

En los últimos años se ha incrementado el consumo de productos hortofrutícolas frescos. Las frutas y hortalizas frescas se encuentran entre los cinco tipos de alimento más frecuentemente implicados en casos y brotes de enfermedad, según reportan países que cuentan con registros epidemiológicos confiables. Los patógenos mayormente involucrados son *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. El primero con muy elevada morbilidad y los tres considerados de alto riesgo a la salud, con peligro de muerte entre las víctimas, especialmente los dos últimos. La elevada letalidad de la listeriosis ha dado lugar al establecimiento de una norma de tolerancia cero en alimentos listos para consumir (aguacate por ejemplo) en países como EU. El enfoque preventivo de este problema exige la aplicación de programas de control microbiológico sustentados en información técnica debidamente validada, encaminados primariamente a evitar la contaminación del alimento desde el campo hasta el empaque y posteriormente la descontaminación del epicarpio.

Aunque el fruto del aguacate tiene abiertos los mercados internacionales para la exportación, existen prácticas riesgosas dentro de esta industria que a corto plazo podrían causar un cierre de fronteras, sanciones a la importación y pérdidas millonarias debido a la falta de visión y prevención sobre los posibles riesgos emergentes en el ámbito de la inocuidad microbiana

Las frutas y hortalizas frescas pueden contener o albergar una diversidad de patógenos. La lista incluye bacterias como: *Salmonella*, *Aeromonas* spp., *Campylobacter*, *E. coli* patógena, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*. La presencia de bacterias patógenas en productos frescos puede resultar de la exposición a fuentes fecales, que directa o indirectamente contaminaron el agua, utensilios, o trabajadores del campo (Beuchat, 1996), o bien, a partir de otras fuentes no fecales como son el ambiente, equipo y utensilios inapropiadamente higienizados, o trabajadores que contaminan el fruto durante el empaque (Nguyen-the y Carlin, 1994; De Roever, 1998; Fernández, 2000). También durante el riego es posible depositar contaminantes microbianos sobre el producto

En un estudio de la Universidad de Texas A&M y la Universidad de Guadalajara, en el que se analizaron melones y repollos cultivados en EU y México, *Salmonella* fue aislada del 0.5% de 950 muestras de melón cultivado en Texas y a partir del 0.3% de 300 muestras de melón cultivado en Colima, México (Castillo et al., 2004). En las muestras de repollo se aisló *E. coli* del 3.7% de las muestras procedentes de México y del 2.5% de las muestras de EU; *L.*

monocytogenes fue aislada (4.7%) únicamente a partir de las muestras colectadas en la unión americana. El número de muestras positivas fue similar; es decir, la contaminación objetable en ambos países para los dos productos ocurre sin distinción, situación que se presenta mayormente durante el empaclado.

Específicamente en trabajos preliminares que hemos realizado en huertas de aguacate se recuperó *Salmonella* con frecuencia de 5.1% (incluyendo los serotipos Bardo, Poona, Agona, Braenderup, Newport y London) a partir de muestras de agua para riego, tierra y composta, así como de aguacates en el árbol; mientras que *L. monocytogenes* se recuperó (2.1%) a partir de tierra de cultivo y de agua para riego. La distribución ambiental de *L. monocytogenes* en la agro-industria de frutas frescas representa un gran reto para el control y protección de su inocuidad.

El crecimiento y la sobrevivencia de los patógenos en el ambiente y los alimentos depende de varios factores: el tipo de organismo, el producto y las condiciones ambientales prevalentes (factores ecológicos) en el campo de cultivo, y en el almacenamiento (FDA, 2001). Algunos patógenos no sobreviven, o lo hacen precariamente, en la superficie de frutas y hortalizas debido a factores tales como el antagonismo microbiano, la cera de la cutícula, la presencia de microflora asociada o la incapacidad para producir enzimas que les provee una barrera protectora (Kakani, 2006).

La gran mayoría de las bacterias pueden sobrevivir por largos períodos, o crecer si disponen de suficientes nutrientes y agua, y el pH y la temperatura son favorables. Algunos de estos microorganismos son psicrótrofos y pueden multiplicarse durante el almacenamiento en refrigeración, como en los casos de *L. monocytogenes* o *Aeromonas* spp.

La iniciativa presidencial generó que la FDA, el USDA y los CDC elaboraran el documento titulado "Guía para reducir al mínimo los peligros microbianos en los alimentos, en el caso de frutas y hortalizas frescas", que trata sobre el riesgo de contaminación con peligros microbiológicos y contiene lineamientos para la prevención de la contaminación microbiana, principalmente de origen fecal, durante la siembra, cultivo, cosecha, lavado, selección, empaque y transporte de frutas y hortalizas crudas o mínimamente procesadas (FDA, 1998).

El documento es una guía (se recomienda su implementación) y no un reglamento, ya que su aplicación no es obligatoria en EU. Se concentra en la producción y empaque de frutas y hortalizas frescas, pero la iniciativa de inocuidad alimentaria no se limita a la producción agrícola, sino a todas las etapas de la cadena alimentaria desde el huerto hasta la mesa. La información científica disponible para reducir y eliminar los microorganismos patógenos en el contexto agrícola no está configurada del todo.

Por otra parte, la Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA), fue firmada el 4 de enero del 2011 por el Presidente Obama e incluye la Norma de inocuidad de los productos agrícola frescos y se considera la ley de inocuidad obligatoria de los Alimentos de los Estados Unidos más extensa en más de 70 años.

Otro interés tanto de la iniciativa como de la Ley FSMA, consiste en apoyar la investigación para detectar las fuentes de contaminación, así como desarrollar tratamientos y estrategias efectivas, en función del costo, que permitan reducir la morbilidad de las enfermedades transmitidas por alimentos.

Varios métodos han sido propuestos para descontaminar productos frescos. La mayoría están diseñados para reducir la población de bacterias patógenas superficiales en el alimento y se aplican mediante enjuague o aspersión. Beuchat (1997) describe una lista de tratamientos recomendados para la desinfección de productos hortofrutícolas así como sus limitaciones. Estos tratamientos incluyen soluciones de cloro y derivados, bromo, yodo, sales cuaternarias de amonio, ácidos orgánicos como el láctico, ozono y radiación ionizante. Una gran cantidad de estudios pretenden validar el uso de diferentes tratamientos y comparar su eficiencia contra patógenos inoculados como *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* (Gonzales et al., 2004; Han et al. 2000; Hellström et al., 2006; Kaye et al., 2005; Lee et al., 2004; Materon, 2003; Rodgers et al., 2004).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por estandarizar los procedimientos de validación (Beuchat et al., 2001, Han et al., 2004; Ukuku et al., 2004) el uso de diferentes metodologías y formas de aplicación de los agentes limita la comparación de la mayoría de los estudios y dificulta significativamente el establecimiento de los protocolos.

La eficiencia de un tratamiento descontaminante dependerá de diferentes factores tales como distancia y forma de aplicación, volumen del líquido empleado, tipo de instrumento, así como características físicas o químicas del producto (Castillo et al., 1998). En este trabajo, al elegir un método de descontaminación deberán tomarse en cuenta las características fisicoquímicas del aguacate. Se trata de un fruto que depende de su respiración posterior al corte para alcanzar la madurez fisiológica, y que es sensible a los cambios de temperatura y exposición al oxígeno-CO₂. Además, deben considerarse las normas o lineamientos de los países importadores en la elección del método más efectivo para la descontaminación.

El propósito es diseñar y evaluar tratamientos de descontaminación efectivos, previo al empaque, como una acción complementaria para el mejoramiento de la inocuidad del producto.

Materiales y Métodos

Diseño y evaluación de la eficiencia de tratamientos de descontaminación en los frutos.

Tratamientos de descontaminación

Se evaluó la reducción de la concentración de tres bacterias patógenas sobre la superficie de aguacate 'Hass' al aplicar diferentes tratamientos de descontaminación bajo un modelo aplicable al empaque industrial (Figura 1).

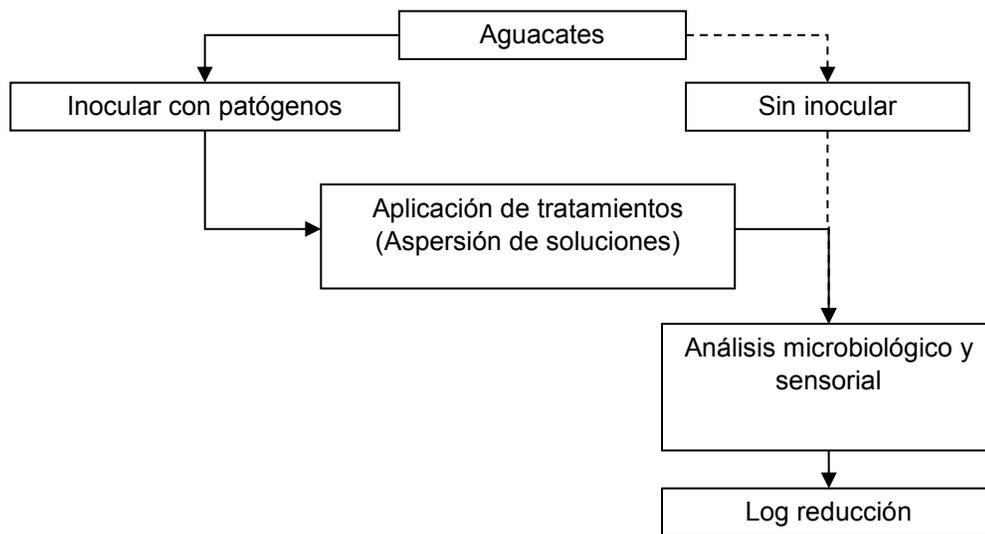


Figura 1. Estrategia general de la etapa de tratamientos de descontaminación de frutos de aguacate.

Cepas bacterianas. Para preparar el inóculo se utilizaron mezclas de cepas de *Salmonella enterica* (6), *E. coli* O157:H7 (4) y *L. monocytogenes* (6). Las fuentes de estas cepas incluyen tanto el ambiente de cultivo del aguacate (fruto, agua, composta) como los casos clínicos.

De las seis cepas de *L. monocytogenes*, la cepa Scott A involucrada en un brote de listeriosis, fue proporcionada por el Dr. Larry R. Beuchat del Center of Food Safety and Quality Enhancement, University of Georgia. Tres cepas aisladas de guacamole comercial, guacamole refrigerado y brócoli congelado, fueron proporcionadas por el Dr. Eduardo Fernández Escartín, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Las dos cepas restantes fueron aisladas en el Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara, a partir de tierra y agua para riego en una huerta de aguacate en Uruapan, Michoacán.

De las cuatro cepas de *E. coli* O157:H7, dos fueron proporcionadas por el Dr. Eduardo Fernández Escartín, de la Universidad Autónoma de Querétaro y dos por el Dr. Alejandro Castillo Ayala, profesor investigador de la Universidad de Texas A&M.

Por último, de las seis cepas de *Salmonella*, cinco fueron aisladas a partir de ambiente de producción en huertas de aguacate, en el Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara: *Salmonella* Agona de agua de río, *Salmonella* Poona de aguacate y tierra, *Salmonella* Newport de aguacate y *Salmonella* Bardo de composta. La sexta cepa, *Salmonella* Typhimurium de un caso clínico, del Laboratorio Estatal de Salud Pública, Guadalajara, Jalisco. A todas las cepas se les indujo y/o se seleccionaron cepas con resistencia a rifampicina (100 ppm) (Rif^r) según el método de Kaspar y Tamplin (1993).

Ensayos preliminares: Previo a la inoculación se evaluaron algunos tratamientos con el propósito de definir una técnica: a) el vehículo de los microorganismos usados en los modelos de desinfección más eficientes, b) la técnica de inoculación y de recuperación de las bacterias c) los tiempos de contacto con el germicida, d) la temperatura de su aplicación y e) las condiciones del almacenamiento durante la desecación del inóculo previo al tratamiento.

Evaluación y comparación de tratamientos de descontaminación superficial de aguacates.

Se utilizaron aguacates (*Persea americana* 'Hass') recién cosechados con un grado de madurez de 21d y sin algún tratamiento de lavado o encerado, procedentes de una huerta en Uruapan, Michoacán (la fuente siempre fue la misma).

Los aguacates fueron cortados de los árboles y transportados al laboratorio a temperatura ambiente. Una vez en el laboratorio se mantuvieron en refrigeración de dos a seis días a 7°C previo a su empleo. Un día antes de aplicar los tratamientos los aguacates se colocaron a temperatura ambiente (18-25°C) y el pedúnculo se recortó hasta quedar a 1 cm, simulando lo que se realiza en el empaque.

Preparación del inóculo: Se prepararon mezclas de cepas de *Salmonella* spp. (6) *E. coli* O157:H7 (4) y *L. monocytogenes* (6), resistentes a rifampicina. *L. monocytogenes* se probó en experimentos independientes, mientras que *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en experimentos simultáneos. Las cepas se mantuvieron en Agar Soya Trypticaseína (AST, Bioxon) a 4°C. Cada cepa fue cultivada en 3 mL de Caldo Soya Trypticaseína (CST, Bioxon) a 35 °C 24 h⁻¹. Antes de emplearlas se activaron mediante tres resiembras sucesivas a 35°C 24 h⁻¹; finalmente se centrifugaron a 4056.6 rpm a 4°C por 10 min y resuspendieron en 1.5 mL de CST (la mitad del

volumen de caldo en que se habían cultivado). El inóculo fue preparado mezclando volúmenes iguales (1.5 mL) de cada cepa de *E. coli* y de *Salmonella*.

Las cepas de *L. monocytogenes* se cultivaron individualmente en CST adicionado con 0.6% de extracto de levadura (ASTEL), e incubadas a 35°C por 16-18 h. Se transfirió un mL a un tubo de 10 mL CSTEL e incubó a 35°C por 4-6 h. Este cultivo se concentró y centrifugó en las mismas condiciones seguidas para las cepas de *Salmonella*. La suspensión de *L. monocytogenes* se mezcló en un tubo estéril hasta conformar un inóculo con 6 mL de volumen total.

Inoculación de los frutos: Previo a la inoculación, cada aguacate se limpió con una gasa estéril para remover cualquier residuo de materia extraña del epicarpio. Seguido, se delimitaron 10 cm² de área con tinta permanente. Cada aguacate fue colocado horizontalmente en un cilindro de acero inoxidable (elaborados a la medida de los aguacates). Cada cilindro era higienizado con etanol al 70% previo al experimento.

Los cilindros eran colocados en una charola cubierta con papel de aluminio. Cada cilindro se colocó a 10 cm de distancia uno de otro para permitir la circulación del aire.

Los aguacates (400) fueron inoculados con las mezclas de cepas de bacterias patógenas en el área marcada. En cada aguacate se depositaron 100 µL de la mezcla de *Salmonella* y *E. coli* 0157:H7 (aprox. 9 Log UFC mL⁻¹ de cada patógeno), o mezcla de *L. monocytogenes* (aprox. 10 Log UFC mL⁻¹). Este último volumen fue extendido con una varilla de vidrio esterilizada mediante inmersión en etanol al 96% seguida de flameo. Este procedimiento se realizó para facilitar el secado del inóculo. Los aguacates inoculados se dejaron secar por 20 min a temperatura ambiente (22-25°C) antes de aplicar los tratamientos. Cada cilindro con el aguacate se colocaron en una charola de polietileno de 23 x 17 cm. Esta charola se colocó en una coladera de Nalgene® durante la aplicación del tratamiento por aspersión y durante los 5 min de escurrimiento después de asperjar la solución desinfectante.

Preparación de las soluciones germicidas: Los tratamientos de descontaminación aplicados a grupos de aguacates fueron los siguientes:

- a) Sin tratamiento (testigo).
- b) Lavado con agua del grifo ajustada a 1 ppm de cloro residual, 15 s (todos los lavados se realizaron de esta forma).
- c) Lavado + aplicación de ácido láctico al 2% a 55°C, 15 s.
- d) Lavado + aplicación de producto comercial I, a base de ácido peroxiacético (80 ppm), 15 s.
- e) Lavado + aplicación de producto comercial II, a base de cloro (200 ppm) 15 s.

- f) Lavado + aplicación de producto comercial III, a base de sustancias naturales 15 s.
- g) Lavado + aplicación de agua caliente a 70°C, 15 s.
- h) Lavado + agua electrolizada oxidante (EO): solución ácida (A) y alcalina (B)
- i) Agua electrolizada oxidante (EO): solución ácida (A) y alcalina (B) con diferentes tiempos de contacto.

La preparación del agua de lavado consistió en adicionar 0.06 mL de blanqueador comercial (Cloralex[®], que contiene 6% de cloro libre) a 4 L de agua del grifo. Después de reposar 20 min se tomó una alícuota del agua para corroborar el cloro residual mediante un kit colorimétrico (Pentair test kit, Sanford, NC Moorpark, CA).

El ácido láctico al 2% w:v fue preparado a partir de ácido L-láctico grado alimenticio (Drogas La Paz, México) de pureza 88%. La solución fue calentada a 85°C inmediatamente antes de colocarse en la bomba de aspersión, de modo que la temperatura resultara de 70°C al momento de asperjar los frutos.

Los desinfectantes comerciales fueron preparados según instrucciones de los fabricantes. El producto I, que contiene ácido peroxiacético se preparó incorporando 478 µL del concentrado en 1000 mL de agua. Esta solución contiene 80 ppm de ácido peroxiacético, concentración verificada con un kit proporcionado por el fabricante (Ecolab[®]).

El producto II, cuyo compuesto activo es el cloro en forma de hipoclorito, se preparó al diluir 18.8 mL del concentrado en 1000 mL de agua. La concentración de 200 ppm como cloro libre se verificó con un kit comercial (Pentair test kit, Sanford, NC Moorpark, CA).

Para preparar el producto III, compuesto por sustancias GRAS (generalmente reconocidas como inocuas y que corresponden a glicerol, alcohol etílico, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, ácido cítrico y aceite de pomelo), se mezclaron 25 mL con 1 000 mL de agua.

En la aplicación de agua caliente, ésta se calentó hasta 85°C inmediatamente antes de llenar la bomba aspersora, de modo que la temperatura al aplicar resultó de 70°C.

El agua electrolizada oxidante (EO) consta de dos soluciones (B; alcalina y A; ácida) y fue proporcionada en contenedores de plástico inerte por el proveedor, sin mover ni abrir hasta su uso.

Aplicación del tratamiento germicida: La aplicación de los lavados y tratamientos siguió un protocolo que ha sido evaluado en estudios previos (Alvarado et al., 2007) y siguiendo las recomendaciones de Beuchat (2001). Se ajustó el flujo y la distancia de aplicación del líquido de las bombas de aspersión de plástico (RF-Flomasteri, mod. 1401HD) de tal forma que se garantizara una cantidad de desinfectante previamente validada. Todos los tratamientos fueron

aplicados mediante estas bombas de aspersión calibradas a una velocidad de flujo de 600 mL min⁻¹ y a una distancia de 10 cm. Los tiempos de contacto se seleccionaron de forma que pudieran adaptarse y aplicarse durante el empaque de frutos y según la literatura recomendada (Castillo et al., 1998, 2001).

Los tratamientos con agua electrolizada (EO) se aplicaron por aspersión de Solución B (pH de 10-13 y potencial oxido-reducción (ORP) de -800 mV) seguido de aplicación por aspersión de solución A (con un pH de 2-3, ORP de + 1100 mV y una concentración de cloro libre de 75 ppm).

Tratamientos con agua electrolizada oxidante (EO):

Se efectuaron dos estudios:

I) Comparación del agua electrolizada oxidante y agua clorada

Los tratamientos de aspersión fueron:

1. Agua de lavado (AL)
2. Agua de lavado con 75 ppm de cloro
3. Agua de lavado seguido de agua alcalina electrolizada seguido de agua ácida electrolizada
4. Agua alcalina electrolizada seguido de la solución ácida

II) Tratamientos con agua electrolizada oxidante, según tiempo de contacto

5. Aspersión de Solución B por 30 s seguido de aspersión de solución A por 15 s.
6. Aspersión de Solución B por 30 s seguido de aspersión de la solución A por 30 s.
7. Aspersión de Solución B por 30 s seguido de aspersión de la solución A por 60 s.
8. Aspersión de Solución B por 30 s seguido de aspersión de la solución A por 90 s.

En ambos ensayos se incluyó un grupo de aguacates sin tratar (testigo). Cada tratamiento y sus condiciones se resumen en los Cuadros 1 y 2.

Procedimiento de muestreo, registros y recuento de patógenos: Después de aplicar cada tratamiento, el perímetro de 10 cm² (previamente marcado) se cortó por escisión con navaja estéril y se separó la pulpa del epicarpio con una pinza estéril. La muestra fue colocada en una bolsa estéril para stomacher (Lab Blender 400, Tekmar Co, Cincinnati, OH, USA) con medio de enjuague en 20 mL de caldo Dey Engley (DE, inactivador, neutralizador Dey-Engley (Acumedia) según Kreske et al. (2006). Se prepararon diluciones decimales del caldo en DP, para inocular en agar mediante siembra por superficie. El desarrollo de este protocolo para la recuperación se apoya en diversas fuentes como Beuchat et al., 2001 y Beuchat, 2006.

El recuento de *L. monocytogenes* se realizó en AST con rifampicina (ASTR) y el de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en Agar Lactosa Sulfito Rojo de Fenol Rifampicina (LSPR) (Castillo, 1998). El recuento de las colonias típicas de *Salmonella* resistente a la rifampicina (rosa con centro negro) y *E.coli* O157:H7 (colonias amarillas) se efectuó por separado y se reportó como log₁₀ UFC/fruto.

La temperatura de cada fruto fue medida con un termopar (52K/J Thermometer, John Fluke MFG.Co. Inc., Everett, Washington, EU). El pH se midió con ayuda de un potenciómetro con electrodo de superficie (Scholar 425 C, UL Listed US) tanto sobre el epicarpio del aguacate como en las soluciones aplicadas en los tratamientos. En el caso del agua EO, se midió el potencial de óxido-reducción (ORP) a cada solución (A y B) con un electrodo de ORP (ORP Triode, Epoxy Body Gel-filled, Reorder 9179BNMD). La concentración de cloro residual se determinó mediante técnica colorimétrica (Pool products, Pentair, pH and Cl⁻ test kit).

Cuadro 1. Tratamientos, volumen y tiempo de contacto de las soluciones empleadas para la comparación de agua electrolizada oxidante y los tratamientos con cloro para la desinfección de aguacates 'Hass'.

Tratamiento	Solución	Asperjado por aguacate ^y	
		Volumen (mL)	Tiempo (s)
1 Agua de lavado (AL) ^z	Agua de lavado	150	15
2 AL + Cl-75 ^x	Agua de lavado	150	15
	Solución de NaClO a 75 ppm de Cloro libre	150	15
3 AL + Solución B ^w /30s + Solución A ^v /15s	Agua de lavado	150	15
	Agua electrolizada alcalina	300	30
	Agua electrolizada ácida	150	15
4 Solución B ^w /30s + Solución A ^v /15s	Agua electrolizada alcalina	300	30
	Agua electrolizada ácida	150	15

^z Empleando una bomba de aspersión manual (Protecno 20 Imex®, El Salvador) con capacidad de 10.56 L, de polipropileno, operada mediante compresión de aire y ajustada a un flujo de aspersión de 10 mL s⁻¹.

^y Los tratamientos de desinfección fueron aplicados a una distancia de 15 – 20 cm del aguacate, empleando una bomba de aspersión manual (RL-FLOMASTER mod. 14040, Root-lowell Manufacturing, Inc. Lowell, Michigan). Después de aplicar los tratamientos, los aguacates fueron secados al aire por 20 min a temperatura ambiente (25°C).

^x Solución de NaClO a 75 ppm de cloro libre.

^w Solución B: solución alcalina (pH de 11.979 y potencial oxido reducción de -860 mV. Aplicación de 300 mL por aspersión durante 30 s (RL-FLOMASTER, mod. 1404D).

^v Solución A: solución ácida (pH de ~2.102 y potencial de óxido reducción de + 1150 mV). Aplicación de 150 mL por aspersión durante 15 s (RL-FLOMASTER, mod. 1404D).

Cuadro 2. Tratamientos, volumen y tiempo de contacto de las soluciones de agua electrolizada oxidante durante la desinfección de aguacates 'Hass'.

Tratamiento	Solución	Asperjado por aguacate ^z		
		Volumen (ml)	Tiempo (s)	
5	Solución B ^y /30s +	Agua electrolizada alcalina	300	30
	Solución A ^x /15s	Agua electrolizada acida	150	15
6	Solución B/30s +	Agua electrolizada alcalina	300	30
	Solución A/30s	Agua electrolizada ácida	300	30
7	Solución B/30s +	Agua electrolizada alcalina	300	30
	Solución A/60s	Agua electrolizada ácida	600	60
8	Solución B/30s +	Agua electrolizada alcalina	300	30
	Solución A/90s	Agua electrolizada ácida	900	90

^z Los tratamientos de desinfección fueron aplicados a una distancia de 15 – 20 cm del aguacate, empleando una bomba de aspersión manual (RL-FLOMASTER mod. 14040, Root-lowell Manufacturing, Inc. Lowell, Michigan). Después de aplicar los tratamientos, los aguacates fueron secados al aire por 20 min. a temperatura ambiente (25°C).

^y Solución B: solución alcalina (pH de 11.979 y potencial oxido reducción de -860 mV. Aplicación de 300 mL por aspersión durante 30 s (RL-FLOMASTER, mod. 1404D).

^x Solución A: solución acida (pH de ~2.102 y potencial de óxido reducción de + 1150 mV). Aplicación de 150 mL por aspersión durante 15 s (RL-FLOMASTER, mod. 1404D).

Análisis estadístico

Para la comparación de los tratamientos de descontaminación se utilizó un diseño experimental por bloques aleatorizados completos (DBAC), donde el bloque correspondió al día de aplicación (7d), el factor al tratamiento (6 tratamientos) y n=12 (2 por bloque), con dos réplicas por tratamiento. La variable de respuesta fue la reducción logarítmica de cada microorganismo.

Los recuentos de las bacterias patógenas (UFC patógeno por fruto) fueron convertidos a log₁₀ (Log UFC patógeno por fruto). La reducción de microorganismos se calcula con el promedio del Log del grupo control (aguacates sin tratar) y el logaritmo del promedio de los recuentos de los frutos tratados. En el cálculo de la reducción bacteriana para cada tratamiento las medias fueron comparados mediante ANOVA para destacar las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias. En todos los casos se utilizó un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$). Se reportan los logaritmos de las unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (UFC cm⁻²).

Resultados y Discusión

En la evaluación de seis tratamientos descontaminantes las poblaciones de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 recuperadas sobre la superficie del aguacate 'Hass' fueron 8.06, 7.84 y 6.52 UFC/fruto respectivamente (Cuadro 3). En la Cuadro

3 se observó los decrementos en las poblaciones de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 después de aplicar los tratamientos con agua clorada a 1 ppm, ácido láctico (AL) a 55°C, ácido peróxiacético (I), producto comercial a base de hipoclorito de sodio con 200 ppm (II), producto comercial a base de sustancias naturales (III) y agua a 70°C. No se observaron diferencias entre las reducciones para cada patógeno para un mismo tratamiento ($P>0.05$).

Cuadro 3. Reducción logarítmica^z de poblaciones de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 en aguacate 'Hass' por efecto de tratamientos.

Tratamiento ^y	Reducción Log UFC por aguacate ± DS ^x		
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
1 Lavado aspersión 15 s	2.13 ± 0.67 A ^w a ^v	1.79 ± 0.576 Aa	1.86 ± 0.76 Aa
2 Lavado 15 s + AL a 55°C aspersión 15 s	3.14 ± 0.67 Ba	3.39 ± Ca	3.13 ± Ca
3 Lavado 15 s + I aspersión 15 s	2.65 ± 0.81 ABa	2.24 ± ABa	2.09 ± ABa
4 Lavado 15 s + II aspersión 15 s	2.47 ± 0.79 Aa	2.04 ± ABa	1.85 ± Aa
5 Lavado 15 s + III aspersión 15 s	2.56 ± 0.94 Aa	2.66 ± BCa	2.20 ± ABCa
6 Lavado 15 s + Agua a 70° C aspersión 15 s	2.64 ± 0.76 ABa	2.68 ± 0.69 BCa	2.98 ± BCa

^zReducción logarítmica = (Log UFC/fruto antes del tratamiento) – (Log UFC por fruto después del tratamiento)

^yLavado por aspersión durante 15 s (RF-FLOMASTER, mod. 1401HD) con 150 mL de agua clorada (1 ppm de cloro residual), aplicación de 150 mL de desinfectante por aspersión durante 15 s (Marca modelo); AL: ácido láctico, 2% w:v, a 55°C (T° medida al asperjar); I: producto comercial a base de ácido peroxiacético, diluido a 80 ppm; II: producto comercial a base de hipoclorito de sodio, diluido a 200 ppm de cloro libre; III: producto comercial a base de sustancias naturales, al 2.5% v:v; agua a 70°C: agua destilada caliente, T° medida al asperjar.

^xLos recuentos de los patógenos en el fruto sin tratar (control) fueron: 8.06 log/fruto para *L. monocytogenes*, 7.84 Log por fruto para *Salmonella* y 6.52 log por fruto para *E. coli* O157:H7.

^wLas medias con la misma letra (A, B, C) dentro de las columnas, no difieren estadísticamente ($P>0.05$).

^vLas medias con la misma letra (a, b) dentro de las filas, no difieren estadísticamente ($P>0.05$).

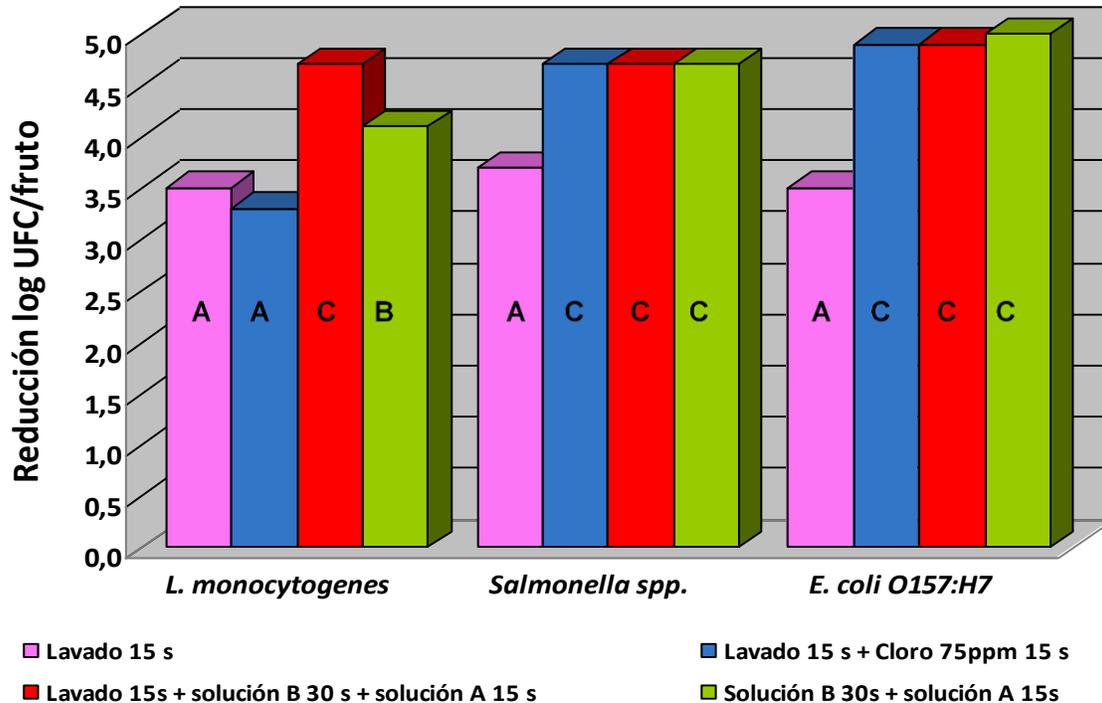


Figura 2. Reducción logarítmica de poblaciones de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7 inoculadas en el epicarpio de aguacate var. Hass tratado con agua electrolizada oxidante

Conclusiones

El tratamiento con mayor eficacia en la reducción de los tres patógenos en los frutos de aguacate 'Hass' cosechados fue el ácido láctico al 2% aplicado a 55 °C. Presenta el inconveniente de costo más elevado en relación con los otros tratamientos. El empleo de agua electrolizada oxidante conduce a reducciones significativas de 4-5 log UFC cm⁻² de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en el fruto. Este efecto puede acentuarse si se emplea un tratamiento combinado con ambas soluciones (ácida y alcalina).

Literatura Citada

- Alvarado-Casillas, S., S. Ibarra-Sánchez, O. Rodríguez-García, N. Martínez-Gonzales, and A. Castillo. 2007. Comparison of rinsing and sanitizing procedures for reducing bacterial pathogens on fresh cantaloupes and bell peppers. *Journal of Food Protection* 70(3):655-660.
- Beuchat, L.R., L.J. Harris, T.E. Ward, and T.M. Kajs. 2001. Development of a proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers. *Journal of Food Protection* 64: 1103- 1109.
- Beuchat, L.R., and J.H. Ryu. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases* 3:459-465.
- Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59:204-216.
- Beuchat, L.R. 2006. Sampling, detection, and enumeration of pathogenic and spoilage microorganisms. pp. 543-564. In: Sapers, G.M., J.R. Gorny, and A. E. Yousef (Eds.). *Microbiology of Fruits and Vegetables*. CRC Press, Boca Raton, Florida. USA.

- Castillo, A., L.M., Lucia, D.B. Roberson, T.H. Steveneson, I. Mercado, and G.R. Accuff. 2001. Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. *Journal of Food Protection* 64:58-62.
- Castillo, A., L.M., Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savel, and G.R. Accuff. 1998. Use of hot water for beef carcass decontamination. *Journal of Food Protection* 61:19-25.
- De Roever, C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control* 9:321-347.
- FDA (Administración de Alimentos y medicamentos). 2001a. FDA survey of imported produce. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied nutrition. www.cfsan.fda.gov/dms/prodsur6.html.
- Fernández Escartín, E., 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. (1era. Ed.). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- González RJ, Y. Luo, R.-C. Saul, and J.L. Mcevoy. 2004. Efficacy of sanitizers to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut carrot shreds under simulated process water conditions. *Journal of Food Protection* 67:2375–2380.
- Han, Y., D.M. Sherman, R.H. Linton, P.E. Nielson, and S.S. Nielsen. 2000. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiology* 17: 521-533.
- Han, Y., R.H. Linton, and P.E. Nelson. 2004. Effects of recovery, plating, and inoculation methods on quantification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from strawberries. *Journal of Food Protection* 67:2436-2442.
- Hellström, S., R. Kervinen, M. Lyly, R. Ahvenainen-rantala, and H. Korkeala. 2006. Efficacy of disinfectants to reduce *Listeria monocytogenes* on pre-cut iceberg lettuce. *Journal of Food Protection* 69:1565–1570.
- Kakani, G. 2006. Interventions for ensuring food safety in mangoes during phytosanitary treatments. Master of Science. Food Science and Technology. Texas A&M University. Bryan, TX, USA.
- Kaspar, C.W., and M.L. Tamplin. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied Environmental Microbiology* 59:2425-2429.
- Kaye, S.Y., K.H. Mcwatters, and L.R. Beuchat. 2005. Efficacy of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, yeasts, and molds on blueberries, strawberries, and raspberries. *Journal of Food Protection* 68:1165-1175.
- Kreske, A. C., J. H. Ryu, C. A. Pettigrew, and L. R. Beuchat. 2006. Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial produce sanitizer to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* in a liquid detergent, on stainless steel, and in biofilm. *Journal of Food Protection* 69:2621-2634.
- Materon, L. A. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 applied to cantaloupes and the effectiveness of chlorinated water and lactic acid as disinfectants. *World Journal of Microbiological Biotechnology* 19:867-873.
- Nguyen-the, C., and F. Carlin. 1994. The microbiology of minimally processed fruits and vegetables. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition* 34:371-401.
- Lee, S.-Y., M. Costello, and D.-H. Kang. 2004. Efficacy of chlorine dioxide gas as a sanitizer of lettuce leaves. *Journal of Food Protection* 67:1371-1376.
- Rodgers, S.L., J.N. Cash, M. Siddiq, and E.T. Ryser. 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of Food Protection* 67:721-731.
- Ukuku, D.O., G.M. Sapers, and W. Fett. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by natural microflora of whole cantaloupe. *Journal of Food Safety* 24:129-146.