

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



SOBREVIVENCIA DE *SALMONELLA* SPP EN LA SUPERFICIE DE MELÓN BAJO
CONDICIONES DIFERENTES DE ALMACEN.

Por:


I.B.Q. Diana Laura Mora Bustamante

Como requisito para obtener el grado de MAESTRIA EN
CIENCIAS CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA

2023

**“SOBREVIVENCIA DE *SALMONELLA* SPP EN LA
SUPERFICIE DE MELÓN BAJO CONDICIONES
DIFERENTES DE ALMACEN.”**

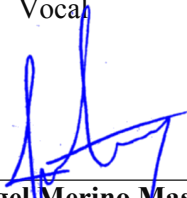
Comité de Tesis



Dra. Luisa Yolanda Solís Soto
Director de Tesis


Dr. José Santos García Alvarado
Co-Director


Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Vocal


Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña
Vocal


Dr. José Ángel Merino Mascorro
Vocal

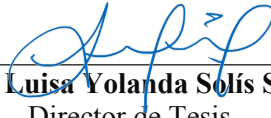

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

**“SOBREVIVENCIA DE *SALMONELLA* SPP EN LA
SUPERFICIE DE MELÓN BAJO CONDICIONES
DIFERENTES DE ALMACEN.”**

Comité de Tesis



Dra. Luisa Yolanda Solís Soto
Director de Tesis



Dr. José Santos García Alvarado
Co-Director

AVISO DERCHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Este trabajo fue financiado por:

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN” CB2017-2018, proyectoA1-S-25033

y

Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica,
PAICYT, UANL CT-1590-21 y 45-CAT-2022

AGRADECIMIENTOS

Al Comité de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo necesario para así poder tener el sustento durante este proceso. Así como a la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A mi madre, mi amor y mi sustento más grande, la razón de mi existencia. Gracias infinitas por convertir mis sueños en los tuyos, por tomar mi mano y nunca dejarme caer. Todo lo que tengo y logro es total y absolutamente para ti. Mi inspiración infinita.

A mi padre, el pilar de mi vida. Gracias por ser esa luz y esa guía cuando pierdo el camino. Eres el hombre de mi vida, mi orgullo más grande. Cargo con orgullo tu nombre en mi ser para hacerte el hombre más orgulloso siempre.

A mi hermano Luis. Porque no hubo nunca otra cosa que yo quisiese que hacerte sentir orgulloso siempre. Desde el cielo, allá al lado de Dios, sé que me guías y celebras conmigo cada logro. Nunca me dejas sola.

A mi abuela Nena, que siempre se deshacía de orgullo por cada logro mío. Por toda la fe y la confianza que tenías en mí, incluso más de la que me tengo a mi misma. De aquí hasta el cielo, este agradecimiento también va para ti.

A mi familia, Alex, mi segundo hermano, mi tía Irma, por todo el apoyo, nunca dejarme caer y siempre creer en mi capacidad. Por los alientos y por los ánimos. Los amo infinito.

A Zaira, la luz de mi vida en momentos tan oscuros. Gracias por tanta luz, por tanta enseñanza y conocimiento. Gracias por la vida, por la compañía y por tanto amor. El amor es infinito siempre. Gracias por sostenerme y ser parte de mí. Te llevo conmigo siempre.

A mis mejores amigos, Akim y Monica, muchas gracias por ser y estar. Porque mucha gente sabe ser, pero muy poca sabe estar. Fueron mi soporte durante estos dos años y no tengo como compensar todo el amor y energía de la que me llenaron en todo momento. Gracias infinitas por su inseparable compañía.

A la Dra. Luisa. Porque sin saberlo salvo mi vida en diversas ocasiones, y se convirtió en mi mejor amiga en esta odisea. Por tanto conocimiento, por tanto amor disfrazado de consejos y regaños. Las gracias infinitas jamás alcanzarán. Lo mejor que me sucedió fue haber tenido el honor de ser su alumna.

Al Dr. Jorge Dávila, por su paciencia, su confianza y creer hasta el último momento en mi, incluso cuando no lo merecía.

A mi fiel perrito Fecit, por la fuerza necesaria que ocupaba al inicio y que desde el cielo celebra conmigo. A Maggie, nuestra nueva compañera que llegó a dar luz a cada rincón de mi vida.

A la Dra. Norma Heredia y el Dr. Santos García por permitirme ser parte del LABGEM y apoyarme en el transcurso de mi proyecto.

A Dios, porque, a pesar de todo, sigue presente, sigue mostrándome mucha luz y recordándome el amor infinito que me tiene.

DEDICATORIAS

A mi madre, mi padre, mis dos ángeles Luis Humberto y Maria Elena. A mi familia Alex e Irma Bustamante. Por ser mi fuente de luz, de fuerza más grande. Por ser mi universo completo. Los amo infinito.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	2
2.2 <i>Salmonella</i>	2
2.2.1 Generalidades.....	2
2.2.2 Patogenicidad.....	3
2.2.3 <i>Salmonella</i> relacionada a alimentos.....	4
2.3 Contaminación de frutas y hortalizas.....	5
2.4 Contaminación de melón.....	6
2.5 Fuentes de contaminación.....	9
2.5.1 Agua de riego.....	10
2.5.2 Suelo.....	10
2.6 Condiciones de Almacenamiento.....	11
2.6.1 Temperatura.....	12
2.6.2 Humedad Relativa.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	18
6.2 Preparación y ajuste del inóculo.....	18
6.3 Obtención de las muestras: melón.....	19
6.4 Supervivencia de patógenos en la superficie del melón.....	19
6.4.1 Lavado del melón.....	19
6.4.2 Inoculación del melón.....	20
6.4.3 Ensayos de crecimiento y supervivencia a diferentes condiciones de almacén.....	20
6.4.4 Detección de <i>Salmonella</i> spp., en melones control.....	21
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
8. RESULTADOS.....	23
8.1. Crecimiento y supervivencia de <i>Salmonella</i> spp en melón almacenado a 4°C y humedad relativa de 95%.....	23
8.2. Crecimiento y supervivencia de <i>Salmonella</i> spp. en melón almacenado a 25°C y humedad relativa de 60-70%.....	25
8.3. Crecimiento y supervivencia de <i>Salmonella</i> spp en melón almacenado a 35°C y humedad relativa de 80-85%.....	27
9. DISCUSIÓN.....	30
10. CONCLUSIONES.....	35
11. PERSPECTIVAS.....	36
12. BIBLIOGRAFIA.....	37

LISTA DE SIMBOLOS

Símbolo	Definición
%	Por ciento, porcentaje
°C	Grados Celsius
log ₁₀	Logaritmo base 10
ATCC	American Type Culture Collection
BS	Sulfito Bismuto
CDC.	Centro de control de enfermedades
EUA	Estados Unidos de América
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
g	Gramos
HR	Humedad Relativa
h	Horas
min	Minutos
ml	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
XLD	Xilosa Lisina Desoxicolato
µg	Microgramos
µl	Microlitros
xg	Unidades de gravedad

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuperación de <i>Salmonella</i> spp inoculada en corteza de melón e incubada a 4°C por 21 días y 95% HR.....	23
Tabla 2. Recuperación de <i>Salmonella</i> spp inoculada en corteza de melón e incubada a 25°C por 11 días y 60-70% HR.....	26
Tabla 3. Recuperación de <i>Salmonella</i> spp inoculada en corteza de melón e incubada a 35°C por 21 días y 80-85% HR.....	28

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Supervivencia de <i>Salmonella</i> spp en melón almacenado a 4°C y 95% HR durante 21 días.....	24
Fig. 2. Cambios físicos del melón a 0 (a), 7 (b) y 21 (c) días e incubado a 4°C con HR 95%	25
Fig. 3. Supervivencia de <i>Salmonella</i> spp en melón almacenado a 25°C y 60-70% HR durante 11 días.....	26
Fig. 4. Cambios físicos del melón a 0 (a), 5 (b) y 11 (c) días e incubado a 25°C con HR 60-70%	27
Fig. 5. Supervivencia de <i>Salmonella</i> spp en melón almacenado a 35°C y 80-85% HR durante 4 días.....	28
Fig. 6. Cambios físicos del melón a 0 (a), 2 (b) y 4 (c) días e incubado a 35°C con HR 80-85%	29

RESUMEN

Durante los últimos años, el consumo de frutas y vegetales ha aumentado, lo mismo sucede con las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), ya que estos productos son susceptibles a la contaminación por patógenos por diversas vías. Los microorganismos capaces de provocar enfermedades diarreicas en humanos pueden encontrarse en productos agrícolas, formando parte de su microbiota como contaminantes provenientes del suelo, agua de riego, manos de manipuladores, además de superficies de su entorno. Entre los cultivos hortofrutícolas, el de melón representa uno de los más importantes en la escala mundial destacando por su alto contenido en agua, fibra y vitamina C. Debido a que este fruto se desarrolla directamente sobre la superficie de la tierra, existe un alto riesgo que su superficie sea contaminada por bacterias patógenas como *Salmonella* spp. durante cualquier punto de su cadena de producción. Dicho microorganismo se ha visto que tiene capacidad de adaptarse a diversas condiciones ambientales para crecer y sobrevivir en diferentes entornos. Su presencia en estos alimentos puede resultar en enfermedades gastrointestinales y fiebre tifoidea que, al no contar con un tratamiento antimicrobiano efectivo, pueden causar complicaciones. En algunas cepas de *Salmonella* se ha detectado resistencia a antibióticos para su control.

Es por lo anterior que en esta investigación se analizó la capacidad de *Salmonella* spp para sobrevivir en la superficie del melón bajo diferentes condiciones de almacenamiento para lo cual se inoculó con un coctel de tres cepas diferentes de *Salmonella* spp en la superficie del melón por la técnica de puntos. Los melones inoculados se incubaron a diferentes temperaturas (4, 25 y 35°C) y una humedad relativa (95, 60-70 y 80-85% respectivamente) en una cámara bioclimática a diferentes tiempos de almacenamiento durante los cuales, a cada melón se le determinó la concentración de *Salmonella* spp por el método plaqueo en agar XLD y agar Sulfito Bismuto. Además, se contó con un melón el cual no fue inoculado (blanco) y se procesó por el método de enriquecimiento para *Salmonella* para verificar la ausencia de la bacteria.

Los resultados mostraron que, en aquellos melones almacenados a temperaturas de 4°C y 95% de humedad relativa, hubo una disminución de 3 log₁₀ UFC/melón de *Salmonella*

spp en el día 21 con respecto al día 0. En aquellos frutos almacenados a 25°C y 60-70% de humedad relativa, *Salmonella* fue capaz de sobrevivir significativamente ($p < 0.05$) en ordenes de aproximadamente 5 log₁₀ UFC/melón a 11 días de almacenamiento. La población de *Salmonella* en melones almacenados a 35°C y 80-85% de humedad relativa, se mantuvo constante durante los días de ensayo, inclusive se observó un incremento de aproximadamente 1 log₁₀ UFC/melón a partir del segundo día de almacenamiento. Estos resultados demuestran la importancia de factores como la temperatura y la humedad para un buen control de *Salmonella* en melón.

ABSTRACT

In recent years, the consumption of fruits and vegetables has increased, and so have foodborne diseases (FBDs) since these products are susceptible to contamination by pathogens through various routes. Microorganisms capable of causing diarrheal diseases in humans can be found in agricultural products, forming part of their microbiota as contaminants from soil, irrigation water, handlers' hands, and surfaces in their environment. Among fruit and vegetable crops, melon is one of the most important globally, standing out for its high water, fiber, and vitamin C content. Because this fruit grows directly on the surface of the soil, there is a high risk that its surface may be contaminated by pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. at any point in the production chain. This microorganism has been shown to have the ability to adapt to various environmental conditions to grow and survive. Its presence in these foods can result in gastrointestinal illnesses and typhoid fever which, in the absence of effective antimicrobial treatment, can cause complications.

For this reason, the ability of *Salmonella* spp to survive on the surface of cantaloupe under different storage conditions was analyzed in this research, for which a cocktail of three different strains of *Salmonella* spp. was inoculated on the surface of cantaloupe using the dot technique. The inoculated melons were incubated in a bioclimatic chamber at different temperatures (4, 25 and 35°C), relative humidity (95, 60-70 and 80-85%, respectively) and different storage times. The concentration of *Salmonella* spp was determined in each melon at different times by the plating method on XLD agar and Bismuth Sulfite agar. In addition, one melon was not inoculated and was processed by the *Salmonella* enrichment method to verify the absence of the bacteria.

The results showed that, in those melons stored at temperatures of 4°C and 95% relative humidity, there was a 3 log₁₀ CFU/melon decrease of *Salmonella* spp on day 21 compared to day 0. In those fruits stored at 25°C and 60-70% relative humidity, *Salmonella* survived significantly (p<0.05) in orders of approximately 5.8 log₁₀ CFU/melon at 11 days of storage. The *Salmonella* population in melons stored at 35°C and 80-85% relative humidity remained constant throughout the trial, even an increase of approximately 1 log₁₀ CFU/melon was observed on the second day of storage. These results demonstrate the

importance of factors such as temperature and humidity for a good control of *Salmonella* in melon.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las infecciones entéricas se encuentran entre las principales causas de muerte. Durante los últimos años, el consumo de frutas y verduras ha ido en constante aumento, siendo vinculados como portadores y/o reservorios de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Balali *et al.*, 2020).

El Centro para el control de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) estima que cada año 48 millones de personas se enferman por ETAs, 128,000 son hospitalizadas y 3,000 mueren tan solo en Estados Unidos. Entre las bacterias patógenas más importantes transmitidas por los alimentos asociados con productos frescos, *Salmonella* spp ha estado comúnmente relacionada en diversos brotes relacionados por consumo de productos frescos contaminados, siendo el melón una de las principales vías de transmisión (Collignon & Korsten, 2010).

Estos patógenos logran adherirse en los melones a lo largo de la cadena de producción como en el agua de riego, el abono utilizado en los cultivos, las instalaciones de envasado y el transporte. Las características de la corteza del melón en forma de malla o red, proporciona un sitio de fijación de patógenos (Ukuku *et al.*, 2016), protegiéndolos de diversos instrumentos y agentes de limpieza y/o desinfección.

Teniendo en cuenta esto, el conocimiento del potencial de crecimiento en aquellos productos listos para el consumo como frutas y hortalizas puede ser de gran importancia para lograr identificar las condiciones críticas de almacenamiento que deben seguirse para evitar el crecimiento y sobrevivencia de patógenos como *Salmonella* spp en estos productos hasta niveles peligrosos. Además, este conocimiento puede ayudar a determinar las probables amenazas que este microorganismo puede suponer para la seguridad alimentaria (Sant'Ana *et al.*, 2012).

Debido a estas premisas, este trabajo tuvo la finalidad de determinar la sobrevivencia de *Salmonella* spp sobre la superficie del melón a diferentes condiciones de almacenamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son aquellas que se originan por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos tales como virus, parásitos, mohos, bacterias y/o sus toxinas en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Los síntomas más comunes incluyen diarrea y vómito, aunque también se puede presentar dolor abdominal, cefalea y fiebre, entre otros.

En Estados Unidos de América (EUA), se ha estimado que las ETAs logran afectar a aproximadamente 48 millones de personas anualmente, generando una gran cantidad de enfermedades causadas por patógenos conocidos (Scallan *et al.*, 2011). Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETAs en México y el mundo, se encuentran *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC), entre otras. Las bacterias pueden llegar a contaminar un alimento en cualquiera de las diferentes etapas de la cadena de producción, entrega y consumo lo cual puede provenir de factores ambientales, tales como aire agua, suelo, o por la aplicación de productos químicos (AL-Mamun *et al.*, 2018).

Debido a la gran complejidad que representan los sistemas de producción, así como de la distribución y comercialización, un gran número de productos hortofrutícolas han sido vinculados con brotes de ETAs, siendo las frutas de texturas rugosas como los melones, dentro de los principales vehículos para la transmisión de microorganismos patógenos (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017).

2.2 *Salmonella*

2.2.1 Generalidades

Esta bacteria es un bacilo Gramnegativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es anaerobio facultativo, no formador de esporas y de tamaño celular que va de 0.7 a 1.5

μm (Tindall *et al.*, 2005). Es capaz de crecer en un rango de temperatura de 7 y 48°C con una óptima de 37°C, además, la actividad acuosa (A_w) apta para su desarrollo es de 0.995 y un pH entre 6.5 y 7.5 (Pui *et al.*, 2011). La mayoría de las cepas suelen ser móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. De igual manera, poseen en su estructura pequeños filamentos llamados fimbrias cuyo tamaño oscila de 0.5-10 μm de longitud y 2-8 μm de ancho, las cuales le permiten a la bacteria adherirse a superficies y tejidos y formar biopelículas (Wiedemann *et al.*, 2015).

Este género bacteriano está conformado por tres especies: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*. Dicha clasificación fue aprobada en el año 2005 y se entiende que *S. enterica* tiene seis subespecies que son *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* y *salamae* (Su & Chiu, 2007). Las cepas pertenecientes a *S. enterica* incluye más de 2500 serovariedades y representan importancia clínica principalmente *S. enterica* serovar. Typhimurium y *S. enterica* serovar. Typhi (Harvey *et al.* 2008).

Los serotipos o serovares se clasifican de acuerdo a los antígenos somáticos O (lipopolisacárido), flagelares H (antígenos proteicos de los flagelos) y de virulencia Vi (polisacárido capsular). Los antígenos O más comunes son A, B, C1, C2, D y E. Las cepas de estos serogrupos son capaces de provocar aproximadamente el 99 % de las infecciones y enfermedades en humanos y animales de sangre caliente. Los antígenos H están conformados por una proteína llamada flagelina. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* son capaces de expresar dos especificidades de su antígeno H (difásicos) o expresar solamente una sola (monofásicas). Por otro lado, el antígeno Vi sólo se encuentra presente en *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* y *S. Dublin*. La expresión de este antígeno depende de los genes viA y viB (Yonairo & Leonel, 2015.)

2.2.2 Patogenicidad

Esta bacteria es capaz de causar enfermedad cuando se ingieren incluso dos células dependiendo de la susceptibilidad del huésped. Sin embargo, su rango de hospederos es diverso y la enfermedad va desde enteritis hasta la fiebre tifoidea (Lee *et al.*, 2016). El tiempo en el que se presenta la enteritis es entre las 6 a 72 h después de haber ingerido el

alimento. La enfermedad puede presentar síntomas como cefalea, dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómito y fiebre. No obstante, la sintomatología de las infecciones gastrointestinales puede variar desde la infección asintomática hasta una diarrea grave, donde la salmonelosis es la enfermedad más común (Wallace *et al.*, 1998).

La sobrevivencia y persistencia de la bacteria en un nicho determinado se debe principalmente a su habilidad para adherirse. Las adhesinas con las que cuenta tienen una estructura que les permite reconocer ciertos receptores, que se encuentran en las células del hospedero que determina los hospederos y el organotropismo de las bacterias; además, estas adhesinas son capaces de activar a los linfocitos B y neutrófilos, provocando una amplia variedad de respuestas como la proliferación celular y secreción de citocinas (Ochoa & Rodríguez, 2005).

Son bien sabidos los factores que influyen en la infección, los cuales están codificados en una amplia gama de elementos genéticos, incluyendo plásmidos e islas de patogenicidad (Kelly *et al.* 2009).

2.2.3 *Salmonella* relacionada a alimentos

Esta bacteria es la causa bacteriana de infecciones alimentarias mayormente reportada. Sin embargo, los alimentos son ambientes complejos en los cuales los microorganismos pueden enfrentar diversas condiciones de estrés como la poca disponibilidad de nutrientes, pH cambiantes, osmolaridad, oxidación y temperaturas extremas (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2015).

Dado que *Salmonella* es un patógeno transmitido principalmente por alimentos y agua, suele recurrir a diversos mecanismos para lograr sobrevivir como su alta tolerancia a la acidez. Además de que las señales ambientales logran cambiar su expresión génica por medio de mecanismos de regulación que redirigen la transcripción de la bacteria como el sistema de dos componentes, los factores sigma y sus represores transcripcionales (DeWaal, 2006).

Debido a que ciertos productos hortofrutícolas como los melones se cultivan en el suelo, su corteza puede contaminarse fácilmente con desechos humanos y de animales, así como por agua contaminada con este microorganismo. La industria del melón reconoce que una vez contaminado, es muy difícil eliminar a los patógenos dada la estructura de la superficie del fruto en forma de malla (Figuroa *et al.*, 2005).

A lo largo de los años se han reportado varios brotes de ETAs en Estados Unidos y Canadá, los cuales estuvieron relacionados con el consumo de melones cultivados en México. Como consecuencia de estos brotes, en mayo de 2002, Estados Unidos cerró la frontera al melón mexicano, lo que ocasionó la pérdida importante de ingresos al país (Alberto & Saturnino, 2006).

Existen otros alimentos implicados a brotes de *Salmonella* spp como ensaladas verdes, bayas, tomates, lechuga y cebolla. El 50% de los brotes producidos tienen origen en restaurantes o locales establecidos, el 13% en el hogar y el 57% restante en diferentes lugares como escuelas, trabajo, y hospitales (DeWaal, 2006).

2.3 Contaminación de frutas y hortalizas

Hoy en día productos como frutas y vegetales se consideran parte de una dieta saludable, y su consumo ha ido en constante aumento durante los últimos años, generando que su comercialización esté dirigida principalmente a aquellos productos que sean manejados y/o conservados por tecnologías de mínimo procesamiento y con inocuidad microbiológica (Gómez-Govea *et al.* 2012; Monaghan y Hutchison 2016).

La Asociación Internacional de Productos Frescos (IFPA, por sus siglas en inglés) define a los productos frescos como las frutas o verduras que han sido pre-cortadas, peladas y/o cortadas en un producto 100% aprovechable que será embolsado o pre-ensado para ofrecer a los consumidores conveniencia, mantenimiento y frescura (Althaus *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de que estos productos se consumen crudos, representan un riesgo

para la salud pública si no se cuidan sus estándares de inocuidad y calidad. Los patógenos suelen encontrarse en este tipo de productos formando parte de su microbiota como contaminantes provenientes del suelo y del entorno. Existen también otros casos, en los que suelen adherirse en los productos a través de malas prácticas de manipulación del fruto, como lo es la aplicación de abono sin tratar, el uso de agua de riego contaminada o prácticas higiénicas deficientes por parte del personal que está en contacto directo con el producto (Hernández-Brenes *et al.*, 2002).

En los últimos años se ha observado un aumento considerable en el número de ETAs relacionadas con el consumo de frutas. Uno de los primeros brotes descritos se reportó en Florida en EUA, teniendo como agente causal a *Salmonella enterica* y como vehículo de transmisión a la sandía (Gayler *et al.*, 1955). De acuerdo con el CDC, uno de los brotes más recientes que también tuvo como vehículo de transmisión la fruta, ocurrió en el año 2020 en Estados Unidos, cuando duraznos contaminados con *Salmonella* Enteritidis causaron 28 hospitalizaciones (CDC, 2020).

Según el CDC (el Centro para el Control de Enfermedades, por sus siglas en inglés), en los últimos años los microorganismos patógenos responsables de las ETAs por frutas han sido principalmente *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., Norovirus y virus de la hepatitis A, encontrándose entre los vehículos principales la sandía, melón, tomate, mango, uva, fresa o ensalada de frutas (Callejón *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2003).

2.4 Contaminación de melón

El melón es una fruta de gran importancia tanto económica como social a nivel mundial. Actualmente, en México, la producción y superficie cultivada de melón ocupa el séptimo lugar en importancia y cuarto lugar en rendimientos. En nuestro país se cultivan 13 variedades de melón, entre las cuales se encuentran las de tipo Cantaloupe (chino, rugoso o reticulado) y Honey Dew (melón gota de miel). Es una fruta de gran importancia, tanto por ser generador de divisas para el país, como por ser una fuente de empleo e ingreso

para los productores mexicanos. A nivel nacional, se cosechan 564,00 toneladas de melón por año con exportaciones por más de 106 millones de dólares (SADER, 2017).

Este fruto se caracteriza principalmente por su alto contenido en agua (90%) y su bajo contenido calórico, por lo que se le considera un alimento ideal para una dieta saludable y balanceada. Contiene altos niveles de carbohidratos, así como proteínas y fibra. Destaca su contenido en vitamina C, ya que 100 gramos de melón nos proporcionan más de la mitad de la vitamina C recomendada al día (SADER, 2017).

El principal socio comercial y consumidor de melón de México es Estados Unidos, para el que la demanda de este fruto solía ser del 71%, sin embargo, hubo una baja en su exportación a partir de 2002, ya que ese país cerró sus fronteras debido a problemas sanitarios. En octubre de ese mismo año, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) informó haber detectado *Salmonella* spp. en melones Cantaloupe procedentes del estado de Guerrero, los cuales provocaron cerca de 18 hospitalizaciones (Cota *et al.*, 2011).

En noviembre del 2002 se publicó una normativa mexicana emergente para la producción y el empaque de melón (NOM-EM-038-FITO-2002) en la cual se establecían requerimientos para la aplicación y certificación de buenas prácticas agrícolas y de manufactura (BPA y BPM) (Cota *et al.*, 2011). Afortunadamente, en octubre del 2005 se logró abrir nuevamente la frontera a empresas que se sometieron a un programa de verificación realizada por SAGARPA. Para tal efecto, se expidió una certificación que consiste en lineamientos de buenas prácticas, avalada por la FDA, además de contar con pruebas de laboratorio de Estados Unidos que comprueben que el producto se encuentra libre de *Salmonella* spp. u otro patógeno (Cota *et al.*, 2011).

La contaminación y crecimiento de patógenos representa una de las grandes limitantes dentro de la producción de frutas y vegetales, ya que suele reducir el rendimiento y/o afectar la calidad del producto final. El desarrollo de estos microorganismos depende tanto de factores intrínsecos como extrínsecos, tales como acidez, el potencial redox, la

actividad de agua, entre otros (Feroz *et al.*, 2013). La formación de biopelículas también suele ser resultado del crecimiento de microorganismos, estas tienen la capacidad de proporcionar un entorno de protección al patógeno y con esto facilitar su reproducción, dificultando la inocuidad de los alimentos (Mostafidi *et al.*, 2020).

El crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos en productos hortofrutícolas se ve beneficiado cuando la barrera epidérmica de estos productos se rompe por algún daño físico, como golpes. La degradación por parte de patógenos, como los son las bacterias y hongos, también influye en el rompimiento de esta barrera. Asimismo, el papel de la temperatura también es importante para el desarrollo de estos patógenos, los cuales son capaces de multiplicarse cuando el producto se encuentra fuera de refrigeración. Las operaciones de cortar, triturar, rebanar y/o pelar un producto fresco pueden transferir los patógenos que se encuentran presentes en la superficie de la fruta hacia los tejidos internos (Harris *et al.*, 2003).

El melón crece y se desarrolla en el suelo, por lo que existe un alto riesgo de que su superficie sea contaminada por microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., grupos patogénicos de *E. coli* o *L. monocytogenes*. Diversos métodos de sanitización del melón han demostrado una efectividad parcial en la reducción de la población microbiana, debido a que la estructura de su corteza en forma de malla, así como su textura rugosa, permite a los patógenos fijarse en lugares inaccesibles para los instrumentos de lavado. Inclusive, pueden existir daños en la integridad de su corteza que permitan la infiltración de microorganismos y la formación de biopelículas permitiendo con ello su persistencia en el producto (Annous *et al.*, 2004).

Es así como, durante los últimos años, el melón ha sido relacionado a brotes provocados por patógenos como *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. Estos patógenos logran entrar en contacto con el producto en cualquier punto de la producción hasta llegar a la distribución y consumo (Fu *et al.* 2017). La estructura característica del melón en forma de red y su textura rugosa, constituyen los principales factores relacionados a la persistencia y crecimiento bacteriano (Ukuku *et al.*, 2016).

El melón se reportó como vehículo para microorganismos patógenos como *Salmonella* spp en EUA y Canadá. En el 2001, la FDA indicó que, de 115 muestras de melón, el 2.4% estaba contaminada con *Salmonella* y el 0.6% con *Shigella*. En el año 2019 se reportaron 137 casos en EUA por salmonelosis relacionados a melones que eran procedentes de Caito Foods LLC de Indianápolis, Indiana, y que se encontraban contaminados con *Salmonella* Carrau (CDC, 2019).

A pesar de los constantes esfuerzos para eliminar y reducir la contaminación de microorganismos patógenos en los productos hortofrutícolas antes del consumo, más de la mitad de los brotes reportados involucraron melones que fueron cortados y que no se consumieron de forma inmediata, y como consecuencia, los patógenos crecieron en la corteza e incluso en el interior de la fruta, la cual suele ser rica en azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, eso junto a su pH casi neutro hace de este producto un sustrato completamente ideal para el crecimiento de patógenos (Gagliardi *et al.*, 2003).

2.5 Fuentes de contaminación

Existen numerosas fuentes por las cuales microorganismos patógenos son capaces de contaminar el melón. Dichos tipos de contaminación suelen ser cambiantes dependiendo de la zona en donde se encuentren. Esto debido a que cada zona cuenta con una serie de factores como lo son su topografía y la interacción entre el uso de la tierra, el agua y el clima y que los hacen motivo de riesgo. La combinación de todos estos factores aumenta la transmisión y propagación de patógenos y, por lo tanto, el peligro de contaminación (Strawn *et al.*, 2013).

Dentro de las principales rutas y fuentes de contaminación en donde estos patógenos pueden afectar los cultivos se encuentran las aguas de riego y el suelo de cultivo (Alegbeleye *et al.*, 2018).

2.5.1 Agua de riego

La falta de agua potable para su uso en productos agrícolas ha provocado un incremento del uso de aguas residuales para irrigación de cultivos, en donde, al no ser tratadas adecuadamente, se puede encontrar la presencia de bacterias, virus, protozoarios y helmintos (Balkhair, 2016). Aproximadamente el 70% de las aguas residuales tratadas se utilizan para la agricultura (Cytryn, 2010) y pueden tener efectos perjudiciales para el medio ambiente y la salud.

La capacidad de un microorganismo causante de una enfermedad para residir o incluso persistir en un entorno concreto es vital para que pueda suponer un grave peligro para la salud pública. Esto se debe a que están presentes en ese entorno de forma constante y, por lo tanto, son capaces de causar episodios repetidos de brotes de enfermedades. *S. enterica* y *E. coli* son las principales bacterias patógenas reportadas en aguas llegando a alcanzar hasta el 15% (Iwu & Okoh, 2019).

El método y la forma de riego en los productos suele depender de la disponibilidad de agua y de la naturaleza de los cultivos. Según el CDC, los tipos comunes de métodos de aplicación de riego incluyen, entre otros, el método de riego superficial en el que el agua circula por todo el terreno y tiene contacto directo con el fruto en cuestión. Sin embargo, existe un alto riesgo durante el cultivo de frutos como lo son los melones debido a que crecen y se encuentran en contacto directo con suelo y agua superficial (FAO 2011).

2.5.2 Suelo

Los suelos pueden albergar un gran número de microorganismos, algunos son patógenos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas* (Nicholson *et al.*, 2005; Warriner *et al.*, 2009).

Debido a esto, son capaces de servir como vía de contaminación de las plantas a través de las semillas, las raíces o incluso las superficies. Muchos patógenos residentes en el suelo se han adaptado a la supervivencia en el suelo y logran persistir indefinidamente. Sin embargo, el hecho de que muchos suelos estén altamente expuestos a diversas fuentes

tanto directas como indirectas de contaminantes, como lo son el agua de riego, el estiércol, la presencia de animales y los efluentes, los convierte en un receptor importante para numerosos patógenos (Alegbeleye *et al.*, 2018).

La sobrevivencia y persistencia de estos patógenos en los suelos dependen de diversos factores ambientales como lo son el tipo de suelo, la humedad, pH, disponibilidad de nutrientes y temperatura (Alegbeleye *et al.*, 2018).

2.6 Condiciones de almacenamiento

La producción agrícola suele ser limitada debido a su corta vida útil como resultado de la actividad respiratoria. La calidad de un producto hortofrutícola depende de varios factores como su selección y manejo, la cosecha en la madurez óptima y la reducción de la carga microbiana. La alta demanda de productos frescos como lo es el melón, es continua a lo largo del año, por lo que un correcto almacenamiento se vuelve un proceso indispensable para lograr alargar su vida de anaquel (FAO, 2003).

Mientras más tiempo tarde el fruto a llegar a manos del consumidor, más relevantes se vuelven las condiciones de almacenamiento y/o transporte para que se mantenga en óptimas condiciones. Se estima que anualmente se logran pérdidas en el sector hortofrutícola de aproximadamente el 25% en países desarrollados y cerca del 50% en los países en desarrollo. Es por ello que la necesidad de contar con herramientas y factores biológicos y ambientales ideales se vuelven indispensables para conservar y mantener viable al producto (Kader, 2007).

En la actualidad, varios de los mecanismos y herramientas destinados al almacenamiento y preservación de productos frescos como frutas y hortalizas incluyen el manejo de factores como la temperatura y la humedad relativa.

2.6.1 Temperatura

La refrigeración es la herramienta más utilizada para conservación de alimentos, ya sea que se use sola o en combinación de otros factores como la humedad relativa. Es por ello que comprender el comportamiento de los microorganismos frente al estrés y la tensión impuesta por las bajas temperaturas, resulta indispensable para el desarrollo de buenas prácticas de almacenamiento y conservación (Russell, 2002).

En el proceso de postcosecha de productos hortofrutícolas, la temperatura es considerada como uno de los factores ambientales más importantes para mantener la calidad así como una buena conservación, debido al efecto que tiene sobre diversos procesos biológicos y enzimáticos (Hong *et al.* 2013).

El Código Alimentario de EUA establece que aquellos alimentos con control de tiempo/temperatura para la seguridad (TCS), como lo son melones, tomates y algunas verduras de hoja verde, se mantengan a una temperatura de 5°C o menos (FDA, 2017). Estos requisitos están dados principalmente por la alta capacidad de microorganismos patógenos para crecer, sobrevivir, y multiplicarse en un determinado producto (Jol *et al.*, 2006).

Durante el almacenamiento, la microbiota presente en el producto no suele ser estática ya que es constantemente afectada por muchos factores, sin embargo, el tiempo y la temperatura a la que se someten son los que más influyen en la seguridad y la calidad del alimento. La importancia de monitorear constantemente las temperaturas usadas en el producto durante la distribución, la exposición al por mayor, así como su almacenamiento es vital para asegurar que no se genere algún abuso de temperatura (Jol *et al.*, 2006).

Existe un abuso de temperatura producido durante las diferentes etapas dentro de la cadena de producción. Este abuso conocido como crónico se produce cuando los alimentos se almacenan a temperaturas superiores a aquellas del límite seguro (5°C). Este abuso de temperatura se produce de forma general durante la distribución del producto, su

exposición en el comercio e incluso en el almacenamiento del hogar del consumidor. Un estudio sobre los refrigeradores domésticos en EUA en 2006 reveló que el 20% de los equipos funcionaban a más de 10°C (Jol *et al.*, 2006).

Otro tipo de abuso de temperatura es el agudo, y se presenta cuando los alimentos se encuentran expuestos a temperatura ambiente o superiores. Este abuso de la temperatura suele ser producto de un mal manejo en la refrigeración o un fallo en los equipos de almacenamiento que se da en algún momento antes del consumo. De igual manera aquellos productos que se dejan a temperatura ambiente durante tiempos prolongados en los hogares de los consumidores son consecuencia de este abuso (Huang *et al.*, 2019).

2.6.2 Humedad Relativa

Las frutas y hortalizas están constituidas fundamentalmente por agua por lo que el mantenimiento de una humedad relativa correcta durante el almacenamiento es uno de los aspectos claves para mantener la calidad durante la postcosecha (FAO, 2003).

Es recomendable que la humedad relativa manejada sobre productos frescos como las frutas sea alta, de 90/95%, para de esta manera lograr reducir el movimiento de la humedad que se encuentra dentro del fruto hacia afuera, ya que se calcula en 100% la humedad relativa del aire que se encuentra entre célula y célula de la fruta (Sanchez, 2015).

Existe una relación entre la humedad relativa y la temperatura lo cual debe tomarse en cuenta al determinar las condiciones de almacenamiento ideales para los alimentos. De forma general, cuanto mayor sea la temperatura, menor debe ser la humedad relativa, y viceversa. De forma general, las bacterias necesitan de una humedad mayor que otros microorganismos como las levaduras y hongos, con niveles óptimos de 92%, mientras que las levaduras necesitan de valores de aproximadamente 90% o superior y los hongos proliferan óptimamente con una humedad relativa entre 85% y 90% (Sanchez, 2015).

En el caso del fruto como el melón las condiciones óptimas de humedad relativa son de 90%-95%. Considerar la humedad relativa alta es completamente importante para cuidar la calidad de la cosecha y así poder evitar la desecación. Existen incluso pérdidas de agua por medio de la malla superficial raspada y dañada. Incluso el tiempo es esencial en la calidad del fruto. Ciertos periodos prolongados de mayor humedad o condensación pueden favorecer el crecimiento de cicatrices en el tallo y de mohos en la superficie.

Es por todo lo anterior, que en este trabajo nos enfocamos en determinar el crecimiento de *Salmonella* spp inoculada en la corteza de melón y sometida a diferentes condiciones de temperatura y humedad para elucidar un poco sobre las condiciones que debiéramos seguir para mantener la inocuidad de productos como el melón al ser contaminado con un patógeno como *Salmonella* spp.

3. JUSTIFICACIÓN

La demanda de productos hortofrutícolas ha ido en constante aumento, generando que su comercialización esté orientada a aquellos que son manejados y conservados por tecnologías de mínimo procesamiento y con una calidad microbiológica aceptable. Sin embargo, las enfermedades transmitidas por alimentos relacionados a la ingesta de estos productos se han incrementado con el paso de los años debido a la presencia de microorganismos patógenos causantes de estos brotes.

La contaminación de productos frescos se puede deber a múltiples causas dentro de su proceso de producción, tal como contacto con el suelo, el agua de riego contaminados, los abonos orgánicos que se utilizan, así como el manejo que los trabajadores tienen con los productos. El almacenamiento y el tipo de transporte para la distribución también son factores importantes donde los alimentos pueden adquirir microorganismos patógenos. Estos pueden tener la capacidad de adaptarse a múltiples condiciones ambientales como pH, temperatura, actividad de agua e incluso la superficie del fruto, facilitándoles su sobrevivencia y/o su desarrollo y multiplicación durante periodos largos de tiempo.

De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se determinó la capacidad de *Salmonella* spp. de sobrevivir y multiplicarse en la superficie del melón a diferentes condiciones ambientales, durante tiempos prolongados.

4. HIPÓTESIS

Salmonella spp tiene la capacidad de sobrevivir en la superficie de melón (*Cucumis melo* L.), bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la capacidad de sobrevivencia y crecimiento de *Salmonella* spp en la superficie del melón almacenado a diferentes condiciones de almacenamiento.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de sobrevivencia y crecimiento de *Salmonella* spp. en la superficie del melón almacenado a 4, 25, 35 °C y humedad relativa de 95, 60-70, 80-85% respectivamente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas que se utilizaron en el presente proyecto fueron *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella enterica* ser. Typhi ATCC 19430 ambas donadas por la Compañía Becton Dickinson de México, así como *Salmonella* P30 aislada de perejil en nuestro laboratorio y tipificada como *Salmonella* El monofásica por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) de México.

Para realizar el cepario de trabajo, a partir de un cultivo de reserva mantenido -80°C en caldo infusión cerebro y corazón (ICC, BD) con glicerol (20% v/v Sigma Aldrich México) se tomó una alícuota de 50µl y se inoculó en 5 ml de caldo ICC para incubarse a 37°C por 24h. De este cultivo se tomó una asada que fue estriada en agar ICC inclinado y se volvieron a incubar en las condiciones antes mencionadas, al cabo de las cuales estos cultivos se mantuvieron a 4°C como cultivo de reserva, realizándose resiembras periódicas cada 2 meses.

Para la activación de la cepa de uso inmediato, se tomó una asada del cultivo de reserva y se inoculó en 5ml de caldo soya tripticaseína (CST, BD) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (CSTEL) y posteriormente se incubó a 37°C por 24h. Pasado el tiempo de incubación se realizaron los ensayos posteriores.

6.2 Preparación y ajuste del inóculo

La preparación del inóculo se realizó de acuerdo a Heredia *et al* (2015), para lo cual, cada cepa se sembró por separado a partir de los cultivos de reserva y se inocularon en 5 ml de CSTEL incubándose a 37°C por 24h. A partir del cultivo activado se tomó una alícuota (100µl) y se inoculó en 40ml de CSTEL, se incubó bajo las mismas condiciones. Pasado el periodo de incubación el cultivo fue centrifugado a 3500xg por 20 min a temperatura ambiente en una centrífuga (5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), posteriormente se lavó dos veces con solución salina estéril (0.85% p/v) y finalmente se resuspendió en solución salina fisiológica hasta obtener una concentración de 10⁶-10⁷ UFC/ml. El inóculo

de prueba consistió en una mezcla de las tres cepas de *Salmonella* spp, para lo cual se tomaron 100µl de cada cultivo teniendo un volumen final de 300 µl.

Para verificar la concentración del inóculo, del cultivo mezclado se tomó una alícuota de 200µl y se homogenizó en 1.8ml de solución salina estéril lo cual se convirtió en la dilución -1, de allí se realizó el mismo procedimiento hasta obtener 7 diluciones decimales seriadas (7 log UFC/ml). De las últimas 3 diluciones (-5, -6 y -7) se tomó una alícuota de 100µl que se sembró por extensión en superficie con una varilla Digralsky sobre placas con agar selectivo xilosa-lisina-desoxicolato (XLD, Bioxon) y se incubaron 37°C por 24h. Pasado el periodo de incubación se realizaron los conteos correspondientes considerando las colonias típicas de la bacteria (colonias rosas con o sin centro negro).

6.3 Obtención de las muestras: melón

Las muestras de melón fueron adquiridas en mercado de abastos ubicado en San Nicolás de los Garza, N.L. El producto fue seleccionado considerando su integridad en la corteza, además de no tener daño visible ni suciedad aparente. Dichos melones fueron transportados al laboratorio a temperatura ambiente y procesados dentro de un lapso no mayor a 24 h posterior a su adquisición.

6.4 Sobrevivencia de patógenos en la superficie del melón

6.4.1 Lavado del melón

Para eliminar la materia orgánica presente en el fruto se realizó un lavado con jabón líquido (Likofen B10, 5ml/L en agua) tallándose con una esponja por 5min sin causarle daño a la corteza del fruto. Posteriormente los melones se colocaron en bolsas estériles y se enjuagaron con una solución de cloro (200 ppm) durante 5 min. Inmediatamente después, cada melón se lavó 3 veces con agua destilada estéril por un minuto. Después de lo anterior, cada melón fue secado con toallas de papel para quitar el exceso de humedad y se colocaron en una campana de flujo laminar (Labconco) durante 60 min para secar el fruto. Pasado este lapso, cada uno de los melones fueron colocados bajo luz UV-C durante

10 min, rotándolos cada 5 min para la correcta exposición del fruto completo a la luz y finalmente fueron colocados en bolsas estériles para su posterior procesamiento.

6.4.2 Inoculación del melón

Los frutos se inocularon con el coctel de las tres cepas de *Salmonella* a concentraciones de 1×10^7 UCF/ml mediante la técnica de puntos, para lo cual se tomaron diez alícuotas de 10 μ l del inóculo ajustado y se colocaron sobre la superficie del melón, el cual se dejó en reposo al lado del mechero para el correcto secado y adherencia del inóculo durante 60 min (Heredia et al 2015).

6.4.3 Ensayos de crecimiento y sobrevivencia a diferentes condiciones de almacén.

Una vez inoculado el melón, éste se incubó a diferentes temperaturas (4, 25 y 35°C) con una humedad relativa del 95, 60-70 y 80-85% respectivamente. La sobrevivencia de las bacterias fue monitoreada a los 0, 1, 3, 7, 11, 14, 18 y 21 días para los melones sometidos a 4°C, 0, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 11 días para aquellos melones incubados a 25°C y 0, 1, 2, 3 y 4 días para los almacenados a 35°C.

De los melones anteriores, cada día correspondiente se sacaron de la incubación y se agitaron en 500 ml de agua peptonada al 0.1% por 1 min, al cabo del cual se realizó la cuantificación bacteriana. La cuantificación se llevó a cabo por medio de la técnica de extensión en superficie, para la cual, del homogenizado anterior, se tomó una alícuota (100 μ l) y se inocularon por extensión con ayuda de una varilla Digrafsky sobre placas agar XLD y agar Sulfito Bismuto (SB, Difco). Para la cuantificación de *Salmonella* en medio XLD, las placas se incubaron a 37°C durante 24h, y se contaron las colonias rojas con centros negros mientras que, en medio SB, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h y se contaron aquellas colonias negras rodeadas por un halo de brillo metálico.

6.4.4 Detección de *Salmonella* spp., en melones control.

Para todos los ensayos se usaron controles negativos de melón, los cuales no fueron inoculados y se sometieron a análisis microbiológicos (presencia de *Salmonella* spp.) de acuerdo con los protocolos del Manual de Análisis Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (BAM, FDA, 2022) con breves modificaciones como se describe a continuación.

Cada melón no inoculado se colocó en una bolsa estéril y se le agregó 500 ml de agua peptonada al 0.1% y se agitó durante 1 min. Pasado este tiempo se tomó 1ml del agua y se inoculó en 9 ml de caldo de preenriquecimiento Universal (UPEB, Difco) incubándose a 37°C durante 24h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, de este cultivo se tomó 1ml y se inoculó en un tubo con 9ml de medio de enriquecimiento secundario Rappaport Vassidialis (RV, Difco) y se incubó durante 24h a 42°C. Para el aislamiento se tomó una alícuota del caldo RV con ayuda de un asa bacteriológica y se estirió en 4 cuadrantes sobre placas con agar XLD y agar SB. Las placas se incubaron a 37°C durante 24h, después del cual se buscaron las colonias típicas de *Salmonella* en ambos agares. En caso de aislar una *Salmonella* y confirmarse su presencia en este tipo de melón, se invalidó todo el ensayo correspondiente.

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado con melones inoculados y no inoculados que fueron usados como control.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para el análisis del crecimiento y sobrevivencia del microorganismo bajo las diferentes condiciones de almacenamiento, así como una comparación de medias mediante el programa SPSS versión 22 (IBM, SPSS Statistics).

8. RESULTADOS

8.1 Crecimiento y sobrevivencia de *Salmonella* spp en melón almacenado a 4°C y humedad relativa de 95%

Para realizar esto, se inocularon melones con un coctel de *Salmonella* spp a una concentración de 1×10^7 UFC/ml, y a 4°C durante 21 días. Justo después del inóculo se cuantificaron las bacterias (día 0), resultando $6.24 \pm 0.1 \log_{10}$ UFC por melón la concentración. La cuantificación de *Salmonella* spp se realizó a los días 1, 3, 7, 11, 14, 18 y 21 de incubación y encontramos que las cuentas bacterianas disminuyeron en el día 1 se obtuvo $5.6 \log_{10}$ UFC/melón, y a partir del tercer día se obtuvo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al día 0 teniendo cuentas de $4.6 \log_{10}$ UFC/melón. Para el día 7 las cuentas permanecieron en $4.4 \log_{10}$ UFC/melón, a partir del día 11 al 21 la bacteria tenía recuentos de $3 \log_{10}$ UFC/ml (Tabla 1). Al final del periodo de incubación se logró obtener aprox. $3 \log_{10}$ UFC, lo que indica que *Salmonella* fue capaz de sobrevivir en melón durante 21 días (Fig. 1).

Tabla 1. Recuperación de *Salmonella* spp inoculada en corteza de melón e incubada a 4°C por 21 días y 95% HR.

Día	Recuento de <i>Salmonella</i> spp (\log_{10} UFC/melón \pm EEM*)
0	6.2 \pm 0.1
1	5.6 \pm 0.1
3	4.7 \pm 0.2
7	4.5 \pm 0.2
11	3.9 \pm 0.2
14	3.7 \pm 0.1
18	3.5 \pm 0.1
21	3.3 \pm 0.2

*Error estándar de la media

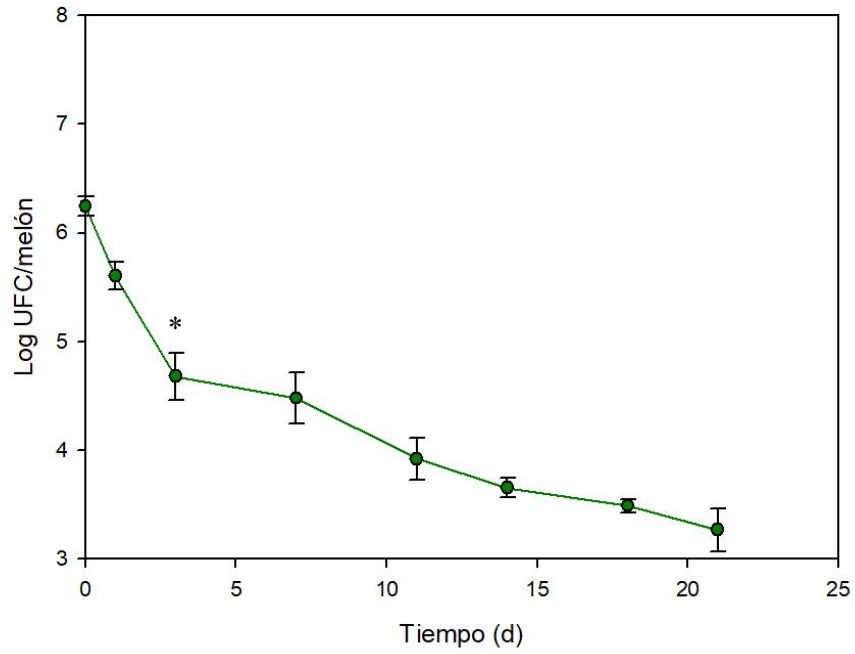


Fig. 1. Sobrevivencia de *Salmonella* spp en melón almacenado a 4°C y 95% HR durante 21 días.

Conforme al avance de los días se estuvo observando el cambio físico que pudiera tener el melón (Fig. 2) y encontramos que al séptimo día del ensayo, había pérdida de calidad comercial (Fig. 2b).

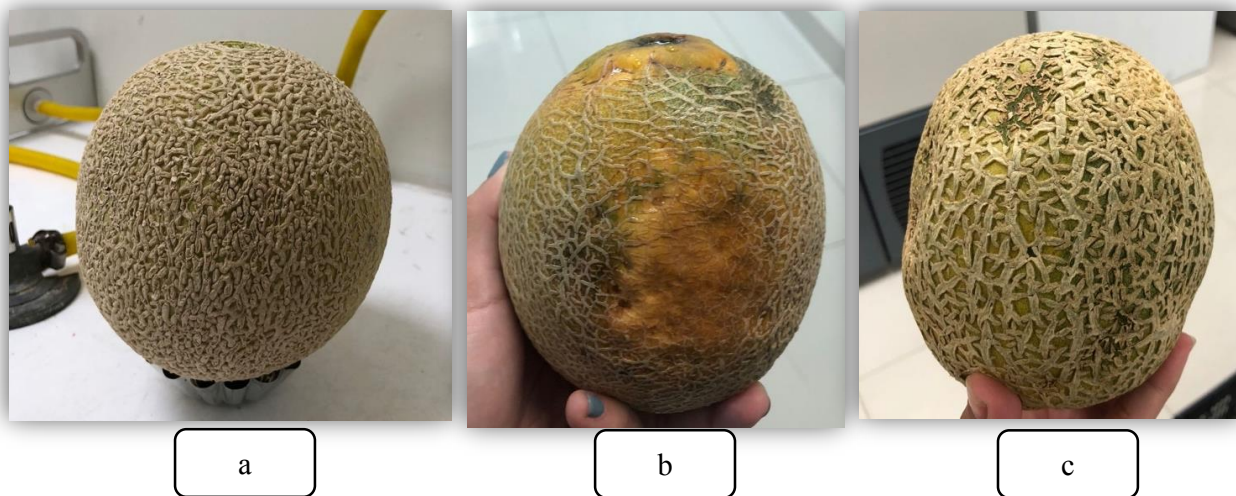


Fig. 2. Cambios físicos del melón a 0 (a), 7 (b) y 21 (c) días de incubado a 4°C con HR 95%.

8.2 Crecimiento y sobrevivencia de *Salmonella* spp. en melón almacenado a 25°C y humedad relativa de 60-70%

En este caso los melones fueron inoculados con el coctel de *Salmonella* spp. a una concentración de 10^7 UFC/ml, y fueron incubados a condiciones ambientales (25°C) por 11 días y con una HR de 60-70%.

Los niveles poblacionales del inóculo bacteriano se mantuvieron estables durante el proceso de secado de 60 minutos al aire del fruto. Al día 1 de incubación se obtuvieron niveles de $6.4 \log_{10}$ UFC/melón mismos valores que quedaron el mismo logaritmo hasta el día 6. Del día 7 al 11 que fue el último del ensayo los niveles de recuperación de *Salmonella* spp fueron en orden de $5 \log_{10}$ UFC/melón. A partir del día 8 hasta finalizar el ensayo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) comparado con el inóculo inicial (Fig. 3).

Tabla 2. Recuperación de *Salmonella* spp inoculada en corteza de melón e incubada a 25°C por 11 días y 60-70% HR.

Día	Recuento de <i>Salmonella</i> spp (log ₁₀ UFC/melón ± EEM*)
0	7.3 ± 0.3
1	6.4 ± 0.1
3	6.2 ± 0.3
5	6.1 ± 0.1
6	6.1 ± 0.1
7	5.7 ± 0.3
8	5.5 ± 0.2
9	5.3 ± 0.2
11	5.5 ± 0.1

*Error estándar de la media

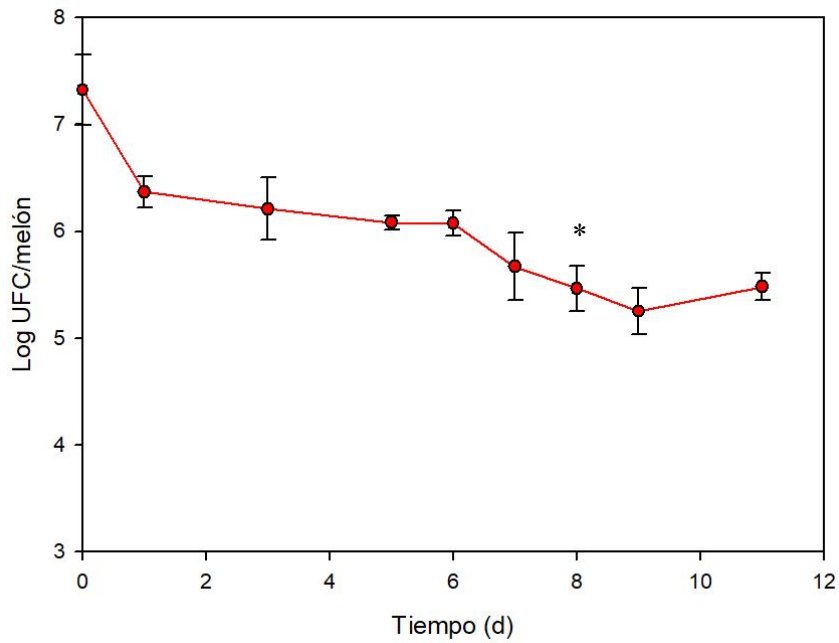


Fig. 3. Sobrevivencia de *Salmonella* spp en melón almacenado a 25°C y 60-70% HR durante 11 días.

Con respecto a la apariencia física del fruto se observó que a partir del día 5 comienza a tener cambios en su estructura física, presentando ligeros cambios en la forma y en la consistencia de la corteza (fig. 4b).

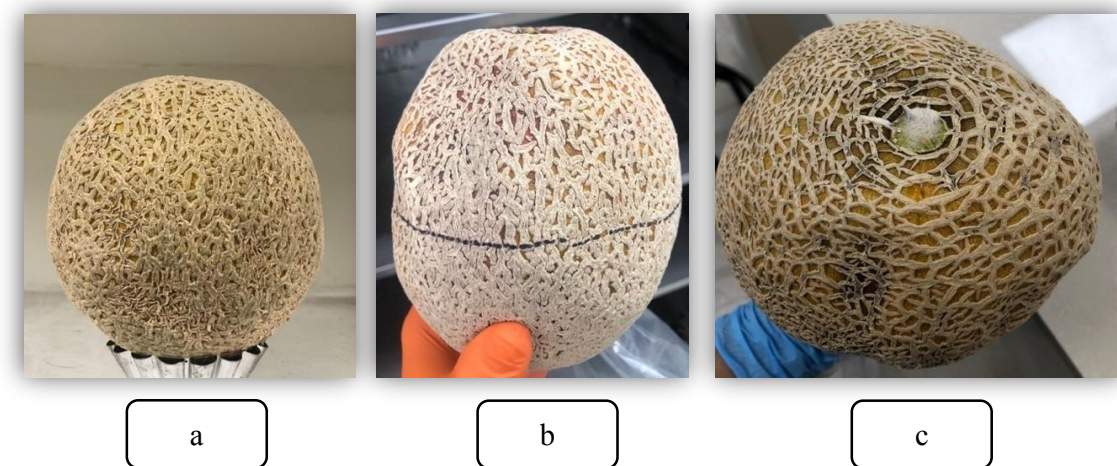


Fig. 4. Cambios físicos del melón a 0 (a), 5 (b) y 11 (c) días de incubación a 4°C con HR de 60-70%

8.3 Crecimiento y sobrevivencia de *Salmonella* spp en melón almacenado a 35°C y humedad relativa de 80-85%

Los frutos utilizados para este ensayo fueron almacenados a 35°C durante 4 días. La población de *Salmonella* spp tuvo un inóculo inicial de 6.6 log₁₀ UFC/melón y al día 1 se observó un crecimiento (7.1 log₁₀ UFC/melón) del microorganismo. Al segundo y el tercer día, la concentración bacteriana se mantuvo en rangos de 6.9 log₁₀ UFC/melón en tanto que para el último día del ensayo se obtuvieron recuentos de 7.1 log₁₀ UFC/melón (Tabla 3). En este caso a lo largo de los días de ensayo no se observó diferencia estadísticamente significativa en la recuperación de *Salmonella* spp con respecto al inóculo inicial (Fig. 5).

Tabla 3. Recuperación de *Salmonella* spp inoculada en corteza de melón e incubada a 35°C por 4 días y 80-85% HR.

Día	Recuento de <i>Salmonella</i> spp (log ₁₀ UFC/melón ± EEM*)
0	6.6 ± 0.2
1	7.1 ± 0.1
2	6.9 ± 0.3
3	6.9 ± 0.1
4	7.1 ± 0.0

*Error estándar de la media

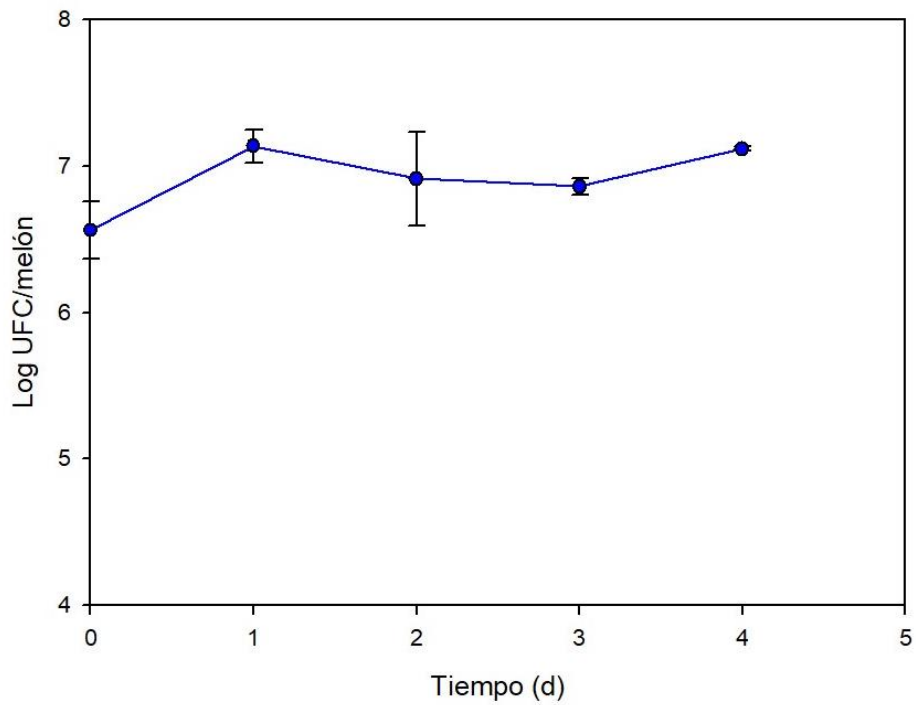


Fig. 5. Crecimiento de *Salmonella* spp en melón almacenado a 35°C y 80-85% HR durante 4 días.

Debido a las características físicas y visuales que el fruto comenzó a presentar por las condiciones altas de temperatura, la duración del ensayo fue de 4 días, a partir del día 2, el fruto presentó anomalías físicas en su estructura como el cambio de color y la presencia de hongo en su superficie (Fig. 6b).

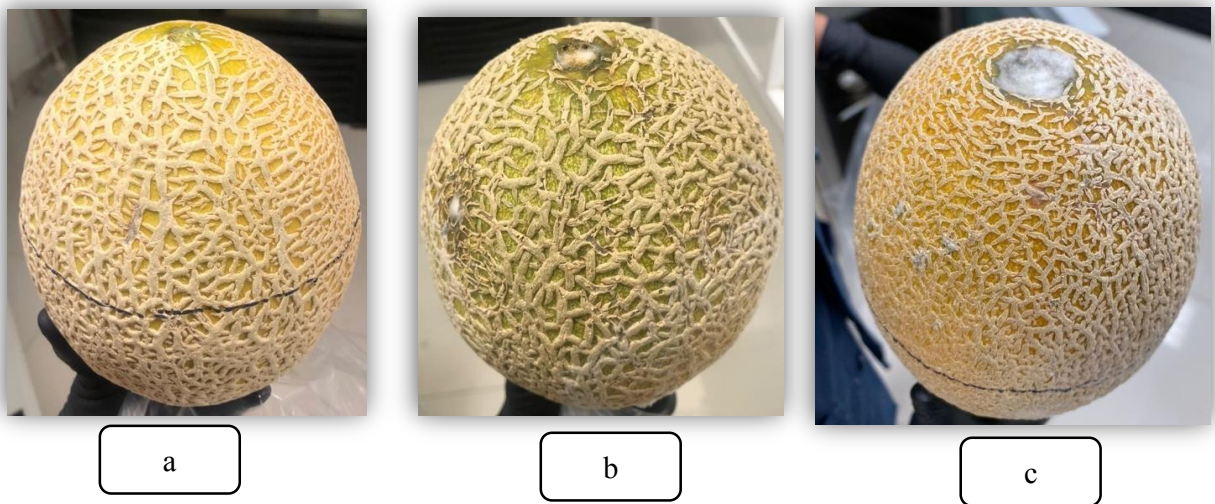


Figura 6. Cambios físicos del melón a 0 (a), 2 (b) y 4 (c) días de incubación a 35°C con HR de 80-85%.

9. DISCUSIÓN

El CDC estima que cada año se producen alrededor de 9.4 millones de casos de ETAs causadas por los principales patógenos conocidos, en donde se ha estimado que el 46% de estas se deriva por el consumo de frutas y vegetales contaminados (Nyarko *et al.* 2016). Desde la época de los 70's hasta el año del 2019, se han reportado algunos productos frescos como el melón implicados en brotes asociando a *Salmonella spp.* como uno de los patógenos más frecuentes (Nyarko *et al.* 2016).

En el cultivo de frutas y vegetales la abundancia y diseminación de patógenos se puede intensificar por algunos factores tales como el uso de fertilizantes y agua residual durante la irrigación (Oluyeye *et al.* 2015), además de la falta de higiene del personal que colecta los vegetales y factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa (Lavilla *et al.* 2008).

En este sentido el presente estudio se llevó a cabo con la finalidad de determinar la capacidad de sobrevivencia de *Salmonella spp* en la superficie del melón, debido al riesgo que representa su presencia de dicho patógeno en alimentos en general, y en este caso frutas como los melones.

El mantener una refrigeración adecuada durante toda la cadena de producción, incluyendo transporte y almacenamiento de productos frescos es una práctica de importancia crítica para mantener la calidad, seguridad e inocuidad de los productos. Actualmente la FSMA, rige y realza la importancia del control de factores como la temperatura para la seguridad alimentaria.

Si bien esto es cierto, es sabido que los microorganismos patógenos no se encuentran normalmente en altas cuentas en los alimentos, aquí utilizamos un inóculo alto ($6-7 \log_{10}$ UFC/ml) con la finalidad de poder determinar la disminución de la concentración bacteriana a lo largo del tiempo.

La temperatura de 4°C utilizada en nuestro estudio, fue seleccionada para simular las condiciones de almacenamiento y refrigeración utilizados ampliamente para la conservación de alimentos además que son las condiciones a las que se someten estos frutos en condiciones de hogar. Después de inocular el coctel de *Salmonella* spp en la superficie del melón e incubarlo a 4°C, observamos que la población bacteriana mostró un comportamiento constante a partir del día 11 al obtener cuentas en un rango de 3 log₁₀ UFC/melón (Fig. 1). Por otra parte, la población de *Salmonella* spp mostro una larga duración de la fase lag, lo que sugiere que el almacenamiento refrigerado de los frutos ralentizó el crecimiento del patógeno. Sin embargo, *Salmonella* logró mantenerse constante en 3.4-3.7 log₁₀ UFC/melón cuando se almacenaron a 4°C durante 21 días. Se ha observado que el almacenamiento postcosecha provoca cambios en el pH, grados Brix, los ácidos orgánicos, la textura, el aspecto y los azúcares en dichos frutos (Lamikanra *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado según Carter *et al.* (2018) que las temperaturas de almacenamiento bajas (4°C) ralentizan la tasa de cambios bioquímicos en los melones en comparación con las temperaturas de almacenamiento más altas.

Actualmente, el Código Alimentario de los Estados Unidos exige que el control de tiempo y temperatura de los alimentos de seguridad se mantenga aproximadamente a 5°C o menos (FDA, 2017). Esto incluye frutas como el melón fresco y la sandía. En nuestra investigación, los niveles poblacionales de *Salmonella* spp mostraron un comportamiento descendente durante temperatura de refrigeración (4°C), sin embargo, es importante recalcar que, a pesar de haber encontrado una disminución en la cuenta de *Salmonella* spp, ésta sí logró persistir y sobrevivir en la superficie del melón de forma continua. Esto último nos alerta de un riesgo potencial de patógenos como *Salmonella* en ciertos productos durante su almacenamiento en frio por periodos de tiempos prolongados.

De igual manera la alta humedad relativa (90%) influyo en la sobrevivencia del microorganismo. Señalando esto último, Tian *et al.* (2013) demostraron que la supervivencia de *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* O157:H7 era significativamente mayor con una humedad relativa más alta. En dicha investigación, se

lograron mayores poblaciones del patógeno en la superficie de las manzanas inoculadas a una HR del 85% que al 65%. De hecho, lograron demostrar que la supervivencia de los patógenos en la superficie de la fruta era directamente proporcional a los niveles de HR, con una supervivencia a una HR de $100 > 85 > 68\%$ (Tian *et al.* 2013).

De igual manera, realizamos el ensayo incubando a lo que se considera una temperatura ambiente (25°C) bajo condiciones de humedad relativa del 70%. En este caso, el ensayo se realizó por 11 días y en general, la población de *Salmonella* se mantuvo constante teniendo cambios poblacionales al final del ensayo (día 9 y 11) (Fig. 3). A lo largo del ensayo en este caso las cuentas bacterianas oscilaron entre 7.3 y 5.3 log₁₀ UFC/melón, representando esto una supervivencia mayor a la mostrada a 4°C.

Diversos estudios sobre patógenos como *E. coli* O157:H7, *S. enterica* y *L. monocytogenes*, han evaluado su crecimiento y supervivencia en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente en diversos productos frescos de consumo como la lechuga (Koseki & Isobe, 2005), el pimiento y el tomate (Ma, Zhang, Gerner-Smidt, Tauxe, & Doyle, 2010), el rábano (Islam *et al.*, 2004), melón y piña (Abadias, Alegre, Oliveira, Altisent, & Vinas, 2012; Danyluk, Friedrich, & Schaffner, 2014) demostrando que la temperatura ambiente es un factor clave para la supervivencia de microorganismos patógenos a largo plazo.

Con respecto a incremento observado durante el día 9 y 11 en el melón incubado a 25°C (Fig. 3) se ha demostrado que las poblaciones de *Salmonella* spp. en trozos melón y sandía recién cortados aumentan en al menos 1 log₁₀ UFC/g cuando se almacenan a 26°C durante un máximo de 10 días (Ukuku y Sapers, 2007). Estos datos sugieren que la humedad en las cámaras de maduración en combinación con la temperatura ambiente puede favorecer una mayor supervivencia de *Salmonella*,

Por otro lado, existen escenarios de abuso de temperatura que pueden darse en la cadena de suministro debido a la falta de una gestión de la temperatura, transporte o durante un fallo del equipo. Es por ello que otro de nuestros objetivos fue someter a *Salmonella* spp

inoculada en la superficie del melón e incubada a 35°C y una humedad relativa del 80% tratando de simular este abuso de las condiciones de almacenamiento que pueden existir no solo por fallas de parte del equipo de producción sino incluso en aquellas temperaturas extremas en las que ciertos vendedores locales suelen vender este tipo de productos listos para el consumo.

Cabe mencionar que este ensayo en particular sólo se llevó a cabo por cuatro días debido a las condiciones físicas que ya tenía el melón, el cual al día 4 ya era imposible realizar el lavado para la recuperación bacteriana sin que se destruyera por completo el producto.

En este caso, se observó un aumento de 0.56 Log₁₀ UFC/melón de la población bacteriana al día 1 del ensayo (Fig. 5) lo cual podría deberse a la temperatura en cuestión, ya que es bien sabido que la temperatura óptima de crecimiento *Salmonella* spp oscila entre 35-37°C aproximadamente. Sin embargo, en los dos días posteriores hubo una disminución de la población bacteriana. Existen ciertos microorganismos que muestran un comportamiento antagónico mediante la disminución del pH, la excreción de péptidos antimicrobianos o metabolitos como el amoníaco y la competencia por los nutrientes (Morey *et al.*, 2012).

Algunos microorganismos como las levaduras y las bacterias ácido-lácticas tienen un efecto antagónico contra *Salmonella* almacenada en atmósfera modificada, sin embargo, a pesar de aquí no haber incubado al melón en ninguna atmósfera modificada, el posible desarrollo de otros microorganismos sobre la corteza, lo cual se observa en las características físicas del producto, pudiera explicar la disminución de la población bacteriana durante el ensayo. Un punto muy importante a reconocer en este ensayo, fue la presencia de un hongo en la superficie del fruto a partir del día 2 (Fig. 6b), concordando de esta manera con el aumento de la población bacteriana. De la misma manera que existen microorganismos que compiten con los nutrientes, existen otros capaces de actuar en sinergia con microorganismos como lo es *Salmonella*. Estudios recientes han demostrado que *Salmonella* spp es capaz de coexistir en presencia de *Aspergillus niger* ya que puede

utilizar los metabolitos producidos por el hongo para su multiplicación y sobrevivencia (Balbotin et. al, 2014).

Después de los ensayos aquí realizados, resulta de suma importancia mencionar que *Salmonella* spp pudo sobrevivir bajo las diferentes condiciones de almacén considerando temperatura y humedad relativa, en este caso 4, 25 y 35°C y entre 60 a 95% de HR. La presencia de este microorganismo representa un riesgo a la salud pública toda vez que se consuma el producto. Cabe recordar que a pesar de que, en el caso del melón, la corteza no es consumible, la bacteria por medio de reacción cruzada puede contaminar la pulpa una vez que se parta el producto para ser consumido, es así como puede llegar el microorganismo a la pulpa y por ende a nuestro organismo.

Es muy importante considerar las temperaturas a las que son sometidos productos como el melón durante la cadena de producción además del transporte y almacenamiento del mismo ya que se debe mantener la inocuidad del producto para salvaguardar la salud del consumidor.

10. CONCLUSIONES

Este estudio evaluó la tendencia de crecimiento de *Salmonella* spp en la superficie del melón bajo tres variaciones de temperatura de almacenamiento.

Salmonella spp es capaz de sobrevivir en un melón incubado a 4°C con 95% HR aun en ordenes de 3 log₁₀ UFC/melón a 21 días de incubación observándose una diferencia significativa (p<0.05) en su comportamiento a partir del día 3 al 21 del ensayo.

Salmonella spp es capaz de sobrevivir en un melón incubado a 25°C con 60-70% HR a 11 días de incubación. Se observaron diferencias significativas en su sobrevivencia (p<0.05) del día 8 al 11 del ensayo.

Salmonella spp es capaz de sobrevivir y crecer en un melón incubado a 35°C con 80-85% HR en ordenes de 6.5-7 log₁₀ UFC/melón a 4 días de incubación. No se mostró diferencia significativa en su crecimiento y sobrevivencia (p> 0.05) a lo largo del ensayo.

11. PERSPECTIVAS

Los resultados ponen de manifiesto la importancia de las políticas de seguridad alimentaria basadas en el riesgo de cada producto en relación con el control de la temperatura.

Los resultados también pueden proporcionar información para los programas de mejora de productos y las innovaciones en el procesamiento de productos frescos para limitar el crecimiento de patógenos.

Es importante mencionar que son necesarias futuras investigaciones para determinar el efecto de la madurez del melón y el contenido de azúcar en el crecimiento y la supervivencia de *Salmonella* spp. En cualquier caso, el almacenamiento constante a temperaturas menores de 4°C es el mejor método para limitar el crecimiento de *Salmonella* spp. en los melones.

Dados los resultados, sería importante estudiar la sobrevivencia de *Salmonella* spp al utilizar de inicio una temperatura y someterla posteriormente a un abuso de temperatura, es decir, almacenarlo por ejemplo a 4°C y después de un tiempo someterlo a 25 o 35°C, emulando lo que sucede cuando se rompe la cadena de frío en la realidad.

Asimismo, considerando que el melón no únicamente ha sido vehículo para este patógeno, una perspectiva pudiera ser el realizar los mismos ensayos con otros microorganismos como *Listeria monocytogenes*, o bien, probarlo en condiciones reales donde la microbiota sea la autóctona en el melón y poder ver cuál es la influencia de ésta en la sobrevivencia de patógenos.

12. BIBLIOGRAFIA

Alberto, J., & Saturnino, J. (2006). *Efectos de la eliminación de aranceles sobre las exportaciones de melón (cucumis melo l.) De México a los Estados Unidos*. 14.

Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant'Ana, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 73, 177–208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>

AL-Mamun, M., Chowdhury, T., Biswas, B., & Absar, N. (2018). Food Poisoning and Intoxication: A Global Leading Concern for Human Health. In *Food Safety and Preservation* (pp. 307–352). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814956-0.00011-1>

Althaus, D., Hofer, E., Corti, S., Julmi, A., & Stephan, R. (2012). Bacteriological survey of ready-to-eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the Swiss market. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1338–1341. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-022>

Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., & Prieto, M. (2015). The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004>

Annous, B. A., Burke, A., & Sites, J. E. (2004). Surface Pasteurization of Whole Fresh Cantaloupes Inoculated with *Salmonella* Poona or *Escherichia coli* †. *Journal of Food*

Protection, 67(9), 1876–1885. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.9.1876>

Balali, G.I., Yar, D.D., Afua Dela, V.G. & Adjei-Kusi, P. (2020). Microbial contamination, an increasing threat to the consumption of fresh fruits and vegetables in today's world. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–13.

Balkhair, K. S. (2016). Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S83–S92. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.029>

Callejon RM, Rodriguez NMI, Ubeda C, Hornedo OR, Troncoso AM. 205. Reported Foodborne Outbreaks Due To Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne and Disease* 12:32-38

Carter, M. Q., Feng, D., Chapman, M. H., and Gabler, F. (2018). Survival of foodborne pathogens on commercially packed table grapes under simulated refrigerated transit conditions. *Food Microbiol.* 72, 199–205. doi: 10.1016/j.fm. 2017.12.004

Castro-Ibáñez, I., Gil, M. I., & Allende, A. (2017). Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.073>

CDC. Outbreak of Salmonella Infections Linked to Pre-Cut Melons. 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/carrau-04-19/index.html>

CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2008. September 9, 2011 / 60:1197- 1202 Disponible en: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035a3_w

Collignon, S., & Korsten, L. (2010). Attachment and Colonization by *Escherichia coli*

O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* on Stone Fruit Surfaces and Survival through a Simulated Commercial Export Chain. *Journal of Food Protection*, 73(7), 1247–1256. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.7.1247>

Cota, M. L., Arellano, J. de J. E., & Nájera, S. L. (2011). Posibilidades Y Restricciones Para La Exportación De Melón Cantaloupe Producido En El Municipio De Mapimí, Dgo., México Al Mercado De Los Estados Unidos. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 28, 593–604.

Cytryn, E., 2010. Effect of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soil bacteria. *Environ. Health Problem*.

FAO. (2003). Manual para la preparacion y venta de frutas y hortalizas. Del campo al mercado. In A. F. Lopez Camelo. Roma.

FDA (US Food and Drug Administration). Food Code. (2017). Available at: <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/retailfoodprotection/foodcode/ucm595139.htm> accessed on/ 13/2018 .

Feroz, F., Senjuti, J., & Noor, R. (2013). Determination of Microbial Growth and Survival in Salad Vegetables through in Vitro Challenge Test. *International Journal of Nutrition and Food Sciences (IJNFS)*, 2, 312–319. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20130206.18>

Fu Y, Deering AJ, Bhunia AK, Yao Y. Pathogen biofilm formation on cantaloupe surface and its impact on the antibacterial effect of lauroyl arginate ethyl. *Food Microbiol*. 2017 Jun;64:139-144. doi: 10.1016/j.fm.2016.12.020. Epub 2016 Dec 29. PMID: 28213018.

Gagliardi, J. V., Millner, P. D., Lester, G., & Ingram, D. (2003). On-Farm and Postharvest

Processing Sources of Bacterial Contamination to Melon Rinds. *Journal of Food Protection*, 66(1), 82–87. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.1.82>

Gayler, G. E., MacCready, R. A., Reardon, J. P., & McKernan, B. F. (1955). An outbreak of salmonellosis traced to watermelon. *Public Health Reports*, 70(3), 311–313.

Gómez-Govea, M., Solís-Soto, L., Heredia, N., García, S., Moreno, G., Tovar, O., and Isunza, G. 2012. Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 10(1):152-156.

Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., & Busta, F. F. (2003). Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(s1), 78–141. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x>

Harvey, R.A., Champe, P.C., Fisher, B.D. 2008. *Microbiología*. 2a. Edición Lippincott Williams & Wilkins. Barcelona.

Hong k., xu h., wang j., zhang l., hu h., jia z., gu h., he q., gong d. 2013. Quality changes and internal browning developments of summer pineapple fruit during storage at different temperatures. *Scientia Horticulturae* 151:68-74.

Heredia, N., Solís-Soto, L., Venegas, F., Bartz, F. E., de ACEITUNO, A. F., Jaykus, L.-A., Leon, J. S., García, S. (2015). Validation of a Novel Rinse and Filtration Method for Efficient Processing of Fresh Produce Samples for Microbiological Indicator Enumeration. *Journal of Food Protection*, 78(3), 525-530. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-324>

Hernandez-Brenes. 2002. Safety Hazards in Fresh Produce – Biological, Chemical and Physical Improving the Safety and Quality of Fresh Fruits and Vegetables: A Training Manual for Trainers.

Huang, J., Luo, Y., Zhou, B., Zheng, J., & Nou, X. (2019). Growth and survival of *Salmonella* enterica and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce and their juice extracts: Impacts and interactions of food matrices and temperature abuse conditions. *Food Control*, 100, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.035>

Iwu, C. D., & Okoh, A. I. (2019). Preharvest Transmission Routes of Fresh Produce Associated Bacterial Pathogens with Outbreak Potentials: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(22), 4407. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224407>

Jol, S., Kassianenko, A., Wszol, K., & Oggel, J. (2006). Issues in time and temperature abuse of refrigerated foods. *Food Safety Magazine*, 30–32.

Kader, A.A. (2007). *Tecnologia Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas*. Universidad de California

Kelly, G. B., Vespermann, A., and Bolton, J. D. 2009. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*. 47:969- 977.

Lavilla, S., Gonzalez-Lopez, J.J., Miro, E., Dominguez, A., Llagostera, M., Bartolome, R.M., Mirelis, B., Navarro, F. *et al.* (2008) Dissemination of extended-spectrum betalactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J Antimicrob Chemother* 61, 1244–1251

Lee, J.-J., Wu, Y.-C., Kuo, C.-J., Hsuan, S.-L., & Chen, T.-H. (2016). TolC is important for bacterial survival and oxidative stress response in *Salmonella* enterica serovar

Choleraesuis in an acidic environment. *Veterinary Microbiology*, 193, 42–48.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.006>

Monaghan JM, Hutchison ML. Ineffective hand washing and the contamination of carrots after using a field latrine. *Lett Appl Microbiol*. 2016 Apr;62(4):299-303. doi: 10.1111/lam.12549. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26797849.

Morey, A., & Singh, M. (2012). Low-temperature survival of *Salmonella* spp. in a model food system with natural microflora. *Foodborne pathogens and disease*, 9(3), 218–223. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1016>

Mostafidi, M., Sanjabi, M. R., Shir Khan, F., & Zahedi, M. T. (2020). A review of recent trends in the development of the microbial safety of fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.009>

Nyarko, E., Kniel, K. E., Reynnell, R., East, C., Handy, E. T., Luo, Y., *et al.* (2016a). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut ‘Athena’ and ‘Rocky4 Ford’ cantaloupes during storage at 4 and 10°C. *Foodborne Pathogen and Disease*, 13(11), 587–591.

Nyarko, E., Kniel, K. E., Reynnell, R., East, C., Handy, E. T., Luo, Y., *et al.* (2016b). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on whole cantaloupes is dependent on site of contamination and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 65–70.

Nicholson, F.A., Groves, S.J., Chambers, B.J., 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour. Technol.* 96 (2),135e143.

Ochoa, I. M. F., & Rodríguez, A. V. (n.d.). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol*, 19.

Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Tang, J. Y. H., Noorlis, A., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K. and Son, R. 2011a. Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. *International Food Research Journal* 18: 31-38.

Russell, N. J. (2002). Bacterial membranes: The effects of chill storage and food processing. An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 27-34.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00176-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00176-9)

Sanchez, J. D., & <https://www.facebook.com/pahowho>. (2015, May 4). *OPS/OMS | Peligros biológicos*. Pan American Health Organization / World Health Organization.
https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es

Sant'Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., & Franco, B. D. G. M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 52-58.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.011>

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15.
<https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>

Strawn, L. K., Fortes, E. D., Bihn, E. A., Nightingale, K. K., Gröhn, Y. T., Worobo, R.

W., Wiedmann, M., & Bergholz, P. W. (2013). Landscape and Meteorological Factors Affecting Prevalence of Three Food-Borne Pathogens in Fruit and Vegetable Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 588–600.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02491-12>

Su, L.-H., & Chiu, C.-H. (2007). *Salmonella* : Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. 30(3), 10.

Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella* . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 521–524. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63580-0>

Ukuku, D. O., Geveke, D. J., Chau, L., & Niemira, B. A. (2016). Microbial safety and overall quality of cantaloupe fresh-cut pieces prepared from whole fruit after wet steam treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 86–92.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.019>

Wallace H. Andrew and Hammack S. Thomas. 1998. *Salmonella* , In FDA bacteriological analytical manual, 8th edition, AOAC int., Inc., Gaithersburg, Md . <http://911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf> . 28/11/12.

Warriner, K., Huber, A., Namvar, A., Fan, W., Dunfield, K., 2009. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Adv. Food Nutr. Res.* 57, 155e208.

Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., ChaussÃ©, A.-M., Schikora, A., & Velge, P. (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology*, 5.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00791>

Yonairo, B., & Leonel, R. (n.d.). *Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular—Salmonelose, zoonose dos pássaros e uma patogênese muito particular*. 20.