

Tratamientos postcosecha en espinaca baby inoculada con *Escherichia coli* enterotoxigénica

Gasca Corona J. ¹, Arroyo Aranda L. A. ¹, Luna Guevara J. J. ¹, Castillo, A. ², Sánchez Arzubide M. ¹, Juárez Almaraz M. ¹, Luna Guevara ML. ¹

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química, Colegio de Ingeniería en Alimentos y Colegio de Ingeniería ambiental, Puebla, Pue. 4 sur #104; Col. Centro C.P. 72000; Puebla, Puebla, Teléfono +52(222) 229 5500. ² Texas University, Department of Animal Science, Kleberg Center, Suite 133 2471, 474 Olsen Blvd, College Station, TX 77843, Estados Unidos. Correo: maria.luna@correo.buap.mx

Palabras clave: Espinaca baby, postcosecha, desinfectante, *E. coli*

Introducción

El tener una dieta saludable ha propiciado que las preferencias del consumidor consideren la ingesta de ensaladas, sin embargo, aunado a esta tendencia se ha incrementado el número de enfermedades gastrointestinales asociadas al consumo de hortalizas frescas mismas que han resultado contaminadas por patógenos como *E. coli* [1, 2]. Particularmente la presentación de ensaladas en bolsa ha tenido gran demanda, mismas que están preparadas y listas para su consumo, aunque pueden proporcionar las condiciones para la proliferación y supervivencia de patógenos. Las verduras de hoja verde que se utilizan en ensaladas retienen gran parte de su microflora autóctona después de un procesamiento mínimo. En ocasiones, la cosecha causa lesiones mecánicas de los tejidos vegetales y marca el comienzo de cambios fisiológicos asociados con los intentos de mantener la homeostasis, reparar heridas y prevenir la infección por microorganismos oportunistas. Asimismo, es probable que en etapas postcosecha se produzca contaminación cruzada por contacto con superficies (por ejemplo, manos, equipo de recolección, contenedores de almacenamiento) [3]. Se ha demostrado que los patógenos *E. coli* O157: H7 y *Listeria monocytogenes* se adhieren a las superficies cortadas de las hojas de lechuga y penetran en el tejido interno, lo que dificulta la desinfección química [1]. La mayoría de los brotes de *E. coli* O157: H7 en Estados Unidos se han reportado que fueron transmitidos por alimentos como: espinacas, lechugas, rábanos, tomates, entre otros. Algunos estudios han reportado la presencia de este microorganismo en el ambiente o en lugares cercanos a las áreas de producción agrícola. En concreto, donde se realizan algunas prácticas durante la precosecha, en las que se utilizan fertilizantes o aguas residuales, incrementando el riesgo que de contener residuos de heces humanas o animales [8]. Aunado a lo anterior las hortalizas de hoja verde se identifican como el grupo de productos agrícolas frescos de mayor preocupación desde una perspectiva de inocuidad debido a que menudo se cultivan en campo abierto y son vulnerables a la contaminación por estiércol contaminado utilizado como fertilizante, suelo y agua de riego [4]. Por lo tanto, los tratamientos posteriores a la cosecha son esenciales para minimizar el deterioro microbiano y reducir el riesgo de contaminación por patógenos en las verduras frescas. El lavado y la desinfección son tratamientos muy importantes ya que puede reducir la carga microbiana inicial [1], sin embargo, existe un conocimiento limitado sobre el mecanismo por el cual los patógenos humanos colonizan y sobreviven en frutas y verduras, lo que pone en riesgo la salud del consumidor [7]. Debido a las múltiples incertidumbres a lo largo de la cadena de suministro y la contaminación microbiana que puede ocurrir en cualquier etapa postcosecha, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los procesos poscosecha simulados en el laboratorio incluyendo el lavado, desinfección con dos bactericidas y almacenamiento a diferentes temperaturas de espinacas "baby" inoculadas con *Escherichia coli* enterotoxigénica.

Metodología

Preparación del inóculo

Se utilizó una cepa de *E. coli* enterotoxigénica almacenada previamente a -80 °C, misma que fue sembrada en caldo TSB (Soya Tripticaseína) y ácido nalidíxico y se incubó a 37°C por 24 h en agitación, para garantizar una población de 10⁷ UFC/mL, realizándose un ajuste a 620 nm.

Inoculación de las hojas de espinaca “baby”

Se inocularon 25 gramos de hojas de espinaca baby comercializada en bolsa lista para su consumo, con 2 mL de caldo TSB inoculado con *E. coli*, se agitaron vigorosamente durante un minuto y se dejaron reposar durante una hora.

Tratamientos Postcosecha

Se evaluaron 4 tratamientos postcosecha sobre la espinaca inoculada, simulando los tratamientos poscosecha en un empaque, mismos que se describen a continuación

Tratamiento 1. Lavado.

Fueron inmersos 10 g de hojas de espinaca baby previamente inoculadas en un litro de agua destilada esterilizada y se generó un flujo turbulento mediante agitación magnética durante un minuto.

Tratamiento 2. Desinfección.

En esta etapa se evaluaron 2 desinfectantes comerciales de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Desinfectante 1 tuvo como principio activo plata coloidal (8 gotas/1L de agua, tiempo de contacto de 10 minutos) y el Desinfectante 2 fue a base de dióxido de cloro (concentración fue 2.5mL/L y un tiempo de contacto de 15min). Las muestras fueron centrifugadas y empacadas en bolsas herméticas estériles.

Tratamiento 4. Almacenamiento.

Las espinacas empacadas y se almacenaron a dos temperaturas (T 8°C=refrigeración y T ambiente 22±4°C, durante 7 y 3 días, respectivamente en productos provenientes de ambos tratamientos de desinfección.

Recuento microbiano.

Los recuentos microbianos (UFC/g de producto) se realizaron después de cada tratamiento en muestras inoculadas y en el control (espinaca sin inocular, expuesta a los mismos tratamientos). Inicialmente a las muestras provenientes del almacenamiento fueron homogenizadas con agua peptonadas en un stomacher durante 1min. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10⁻³ a 10⁻⁹ y fueron sembradas en placad de Petrifilm y se incubaron a 37°C durante 24 h para finalmente realizar los conteos correspondientes.

Análisis de resultados

Los valores de los recuentos de *E. coli* en los diferentes tratamientos son reportados como el promedio de n=3 ± desviación estándar.

Resultados y discusión

En alimentos que son consumidos frescos es necesario desarrollar medidas efectivas que aborden todas las etapas desde la producción, cosecha, procesamiento mínimo, almacenamiento, empaçado, las cuales ayuden a reducir el riesgo de contaminación por microorganismos incluyendo a *E. coli*, con la finalidad de resguardar la salud del consumidor y se restaurare la confianza del sector agrícola, ya que las hortalizas de hoja son actualmente un importante vector de transmisión de *E. coli* [3]. De este microorganismo junto con *Salmonella spp* existen reportes que indican que pueden internalizarse en la parte comestible del producto, a través de los estomas abiertos, principalmente cuando el agua de uso agrícola se encuentra contaminada [4]. Otras etapas tales como el transporte (transporte abierto, vehículos de transporte), procesamiento (inmersión en agua y pasos de corte o rebanado), empaque (empaque inadecuado, equipo de empaque), distribución y comercialización o venta al por menor, tienen el potencial de contaminar las verduras de hoja verde y sus ensaladas con bacterias patógenas, así como posiblemente mejorar el crecimiento de estos microorganismos.

Para las muestras que fueron sometidas a los procesos de lavado y desinfección con plata coloidal (8 gotas/1L de agua, tiempo de contacto de 10 minutos) presentaron los recuentos más bajos de *E. coli* con valores de 6.80 y 6.83 Log₁₀ UFC/g (Figura 1). Sin embargo, estos productos cuando fueron almacenados a temperatura ambiente 22°C ± 4°C, incrementaron su crecimiento a 8.82 Log₁₀ UFC/g. Los productos sometidos al lavado y tratamiento de desinfección 2 (dióxido de cloro) presentaron valores mayores 7.3 Log₁₀ UFC/g. Cabe mencionar que aplicando tratamientos de lavado, desinfección y enjuague- centrifugado se mantuvieron recuentos de 7.34 y 6.81 Log₁₀ UFC/g, lo cual implica que los agentes de desinfección comerciales no redujeron los recuentos significativamente de *E. coli* en espinaca. La falta de eficacia de las soluciones de plata coloidal fue confirmada por Rangel-Vargas et al; (2016) [7], con limitadas reducciones logarítmicas con otra bacteria patogénica como *Salmonella* en la desinfección de cilantro. En relación al uso del dióxido de cloro, Salgado-Escobar et al., (2020) [8], mencionan que este desinfectante tiene la capacidad de disolverse en agua y disminuir la carga microbiana de lechuga y zanahoria baby, sin embargo, es menos efectivo que el ozono debido al efecto residual de este último.

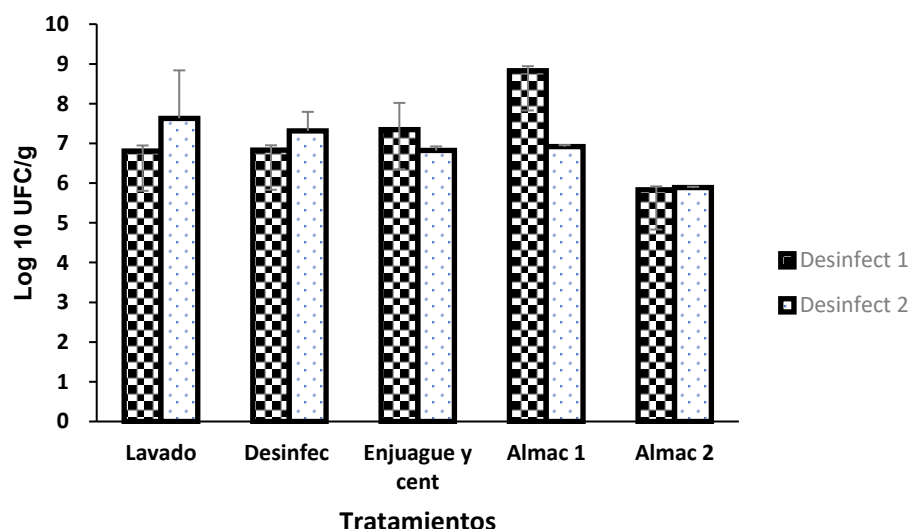


Figura 1. Comportamiento de *E. coli* (ETEC) en los diferentes tratamientos postcosecha de espinaca baby considerando dos tratamientos de desinfección y dos condiciones de almacenamiento (22±4°C y 7°C) durante 3 y 7 días. Se consideró un inóculo inicial de 8.09±0.33 Log₁₀ UFC/g de *E. coli* (ETEC) y con número de réplicas de n=3.

En la tabla 1 se presentan las reducciones logarítmicas de *E. coli*, las cuales dependieron del agente desinfectante utilizado, obteniéndose los valores más altos con el desinfectante 1 (plata coloidal) y T de almacenamiento de 7°C.

Tabla 1. Reducciones logarítmicas de *E. coli* frente a diferentes tratamientos postcosecha de espinacas baby.

Lote	Desinfección	Enjuague	Almacenamiento 3 días (22°C)	Almacenamiento 7 días (7°C)
1	1.26	0.74	0	2.26
2	0.77	1.27	1.17	2.19

Se consideró un inóculo inicial de $8.09 \pm 0.33 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ de *E. coli* (ETEC) y con número de réplicas de $n=3$.

Mientras que con el lote 2 con los tratamientos de desinfección y enjuague la carga microbiana de *E. coli* disminuyó con una población de $6.81 \text{ Log}_{10} \text{ UCF/g}$ y 1.2 reducciones logarítmicas (Figura 1 y Tabla1). Finalmente también se observó que independientemente del desinfectante utilizado las reducciones logarítmicas fueron muy similares para ambos lotes en las condiciones de almacenamiento de 7°C, las cuales corresponden a una temperatura de refrigeración. La relación entre los agentes desinfectantes y la temperatura también fue evaluado por Huang & Chen, (2010) [2] quienes también consideraron la inhibición de *E. coli* O157: H7 en espinaca baby con soluciones de diferentes ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico y ácido tartárico, ácido acético al 1% y 2%), peróxido de hidrogeno y la combinación con la exposición a temperaturas de 40 y 50°C, se encontró como mejor tratamiento con ácido láctico (1 %) durante 5 minutos y 40 °C, consiguiendo reducir $2.7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC}$, estos valores fueron muy similares a los obtenidos en nuestra investigación, es decir la eficacia del tratamiento de desinfección se vió favorecida cuando se combina con temperaturas cercanas a la de refrigeración.

Conclusiones

Los resultados obtenidos con los tratamientos de postcosecha a diferentes temperaturas y con diferentes desinfectantes muestran la importancia de las reducciones bacterianas sobre *E. coli* sin embargo no cumplen con una eficiencia de eliminación, siendo estos resultados de gran interés debido a que la espinaca es una hortaliza que mayormente se consume fresca.

Referencias

1. Heaton, J., and Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 613- 626. 16/03/21, De The Society for Applied Microbiology Base de datos. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>
2. Huang, Y., & Chen, H. (2011). Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of Escherichia coli O157: H7 on baby spinach. *Food Control*, **22**(8), 1178-1183.
3. Delaquis, P., Bach, S. And Dorina, L.. (2007). Behavior of Escherichia coli O157:H7 in Leafy Vegetables. *Journal of Food Protection*, **8**, 1966–1974. 16/03/21, De Meridian Base de datos. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.8.1966>
4. Liu, C., Hofstra, N., and Franz, E.. (2013). Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by Escherichia coli O157 and Salmonella spp.. *International Journal of Food Microbiology*, **163**, 119-128. 16/03/21, De ELSEVIER Base de datos. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.026>

5. Kumar, P Y Tripathi, D. (2007). Microbial contamination in vegetables due to irrigation with partially treated municipal wastewater in a tropical city. *International Journal of Environmental Health Research*, **17**, 389 – 395. 07/03/21, <https://doi.org/10.1080/09603120701628743>
6. Singh, D., et Alabama. . (2020). Incidence of Escherichia coli in Vegetable Crops and Soil Profile Drip Irrigated with Primarily Treated Municipal Wastewater in a Semi-Arid Peri Urban Area. *Journal of Agriculture*, **10**, 1-16. 07/03/21, De MDPI Base de datos. doi:10.3390/agriculture10070291.
7. Rangel-Vargas, E., Gutiérrez-Alcántara, E. J., Gómez-Aldapa, C. A., Falfán-Cortés, R. N., Segovia-Cruz, J. A., Salas-Rangel, L. P., & Castro-Rosas, J. (2017). Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug-resistant salmonella serotypes isolated from coriander. *Journal of Food Safety*, **37**(2), e12320.
8. Salgado-Escobar, I., Hernández-Rodríguez, G., Suárez-López, Y. D. C., Mancera-Ugarte, M. J., & Guerra-Ramírez, D. (2020). Efficacy of disinfection methods and effects on nutraceutical properties in coriander and strawberry. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, **11**(2), 327-337.