



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ingeniería Química Colegio de Ingeniería Ambiental

TESIS PROFESIONAL

“Comportamiento de *Escherichia coli* inoculada sobre
espinaca (*Spinacea oleracea L.*) “baby” sometida a
diferentes etapas postcosecha”

Que para obtener el título de:

INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTA:

Janeth Gasca Corona

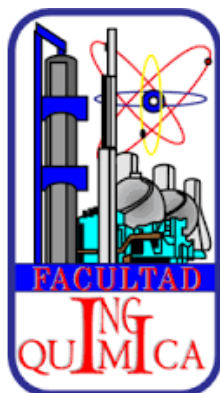
Asesora interna:

Dra. María Lorena Luna Guevara

Co-asesor:

Dr. Juan José Luna Guevara

Puebla, Pue. 23 de Noviembre 2021





BUAP

Oficio No. FIQ/AC/288/2021
Asunto: Registro de Tema de Tesis

C. JANETH GASCA CORONA
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

**“Comportamiento de *Escherichia coli* inoculada sobre espinaca (*Spina cea oleracea L.*)
“baby” sometida a diferentes etapas postcosecha.”**

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Directora de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara.

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO**.

Atentamente
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., a 01 de octubre de 2021


Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaria Académica



C.c.p. Directora de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara.
C.c.p. Archivo.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C. P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado de mucho trabajo experimental, dedicación y tiempo pero sobre todo mucho amor por realizar algo que me apasiona.

Le doy gracias a Dios por brindarme su sabiduría y fortaleza para poder enfrentar todos los retos.

Agradezco principalmente a mis padres José Luis y Vianey, a mi hermana Jacqui por todo su apoyo, amor, paciencia y tiempo que me han brindado. Siempre me dieron esa motivación y confianza cuando lo he necesitado a lo largo de mi vida y de mi formación académica. Sin ellos no sería quien soy ahora.

A Gustavo por nunca dudar de mí y por el apoyo, amor, comprensión, palabras de aliento para seguir alcanzando mis metas y por el apoyo emocional que siempre me ha dado.

A mis amigos Alejandra, Brenda, Esmeralda, Juan Pablo, Aradid, Mauro que además de brindarme su amistad más sincera llenaron de alegría a mis días, me dieron apoyo, confianza y motivación.

A mi mejor amiga Lizette Alondra por la confianza que siempre tuvo en mí, por sus palabras de aliento y el amor que me dio a lo largo de los años. Nos volveremos a ver en un mejor lugar.

A la Doctora Lorena a quien le debo gran parte de mis conocimientos, por su apoyo, paciencia, por el tiempo y confianza que me brindó para lograr culminar este proyecto.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el conocimiento, por la formación académica, por los docentes e investigadores que me formaron, por los apoyos académicos y de investigación.

A todos aquellos que durante la realización de mi carrera me dieron su apoyo, confianza y ayuda para alcanzar mis metas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN 7

ABSTRACT 8

I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	OBJETIVO	11
	OBJETIVO GENERAL	11
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
IV.	JUSTIFICACIÓN	13
V.	HIPÓTESIS	13
VI.	MARCO TEÓRICO	14
	CAPÍTULO 1. Generalidades de la espinaca	14
	1.1 Importancia económica de la producción de espinaca	15
	1.2 Beneficios a la salud por el consumo de espinaca	16
	1.3 Presentaciones de la espinaca para su consumo	17
	CAPÍTULO 2. Principales microorganismos patógenos transmitidos por consumo de vegetales crudos	19
	2.1 Microorganismos y brotes de enfermedades por el consumo de espinaca	21
	2.2 Principales fuentes de contaminación durante la producción, cosecha, postcosecha, empaque de espinaca y medidas correctivas	23
	2.2.1 Agua	24
	2.2.2 Suelo	30
	2.2.3 Otras fuentes de contaminación	32

2.3	Desinfectantes.....	35
2.3.1	Desinfectante a base de plata coloidal	36
2.3.2	Dióxido de cloro	37
2.4	Antimicrobianos naturales	38
2.4.1	Salvia (<i>Salvia officinalis</i>).....	40
2.5	Principales actividades que se realizan en un empaque y su distribución	41
2.5.1	Proceso de la espinaca mínimamente procesada en una empacadora	44
VII.	METODOLOGÍA.....	47
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
IX.	CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	72
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Microorganismos patógenos causantes de ETAS	19
Tabla 2.	Microorganismos patógenos que comúnmente se han encontrado en hortalizas de hoja verde	20
Tabla 3.	Brotos de padecimientos causados por <i>Escherichia coli</i> por consumo de espinaca y afectaciones a la salud.....	21
Tabla 4.	Presencia de microorganismos patógenos dependiendo de la fuente de agua de riego	26
Tabla 5.	Acciones correctivas para disminuir la contaminación presente en el suelo	32
Tabla 6.	Preparación, extracción, rendimiento y técnica de extracción de los agentes antimicrobianos naturales	49
Tabla 7.	Preparación de las concentraciones de los extractos.....	52
Tabla 8.	Descripción de las etapas a las que es sometida la espinaca	55
Tabla 9.	Tratamientos de desinfección	57
Tabla 10.	Halos de inhibición en milímetros obtenidos con diferentes concentraciones de extractos	64
Tabla 11.	Porcentaje de inhibición con extractos de ruda, salvia y semilla de mamey sobre <i>Escherichia coli</i>	64
Tabla 12.	Recuentos y reducciones logarítmicas del lavado del control inoculado y de los tres lotes de espinaca baby.....	66
Tabla 13.	Reducciones logarítmicas de <i>E. coli</i> en hojas de espinaca baby inoculadas sometidas a los tratamientos de desinfección, enjuague y centrifugación	68

Tabla 14. Reducciones logarítmicas de <i>E. coli</i> en hojas de espinaca inoculadas sometidas a los tratamientos de almacenamiento a temperatura ambiente (22°C durante 3 días) y a temperatura de refrigeración (7°C por 7 días).....	70
n=3. Inóculo inicial 8.09 log ₁₀ UFC/g.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espinaca (<i>Spinacea oleracea</i> L.).....	14
Figura 2. Presentaciones comerciales de espinaca para su consumo	18
Figura 3. Tipos de fuentes de agua a usar en la precosecha a) Agua superficial, b) agua de pozo, c) agua municipal, d) agua subterránea.....	26
Figura 4. Aplicaciones del agua durante la postcosecha	29
Figura 5. Algunas prácticas para conservar la inocuidad del agua	30
Figura 6. Otras posibles fuentes de contaminación de productos agrícolas frescos.....	33
Figura 7. Micrografía electrónica de barrido que muestra a <i>Escherichia coli</i> a) internalizada en los estomas de una hoja de una hortaliza de hoja verde b) adherida a la dermis de una hoja de una hortaliza de hoja verde y mostrando flagelos (flecha).....	34
Figura 8. Esquema de actividades de una planta de empaque de hortalizas.....	42
Figura 9. Diagrama general del manejo y procesamiento de la espinaca	45
Figura 10. Diagrama general del plan de trabajo a realizar.....	47
Figura 11. Esquema de la primera etapa de la metodología.....	48
Figura 12. a) Extracto de salvia b) Extracto de ruda c) Equipo de destilación por arrastre de vapor de la salvia d) Destilación por arrastre de vapor de la ruda.....	50
Figura 13. Cepa pura de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.....	51
Figura 14. Esquema de la segunda etapa de la metodología	53

Figura 15. Espinaca “baby” usada en los tratamientos postcosecha	55
Figura 16. Reposo de hojas de espinaca “baby” para garantizar adherencia de <i>E. coli</i>	55
Figura 17. Lavado de espinaca “baby” mediante aplicación de flujo turbulento	56
Figura 18. Eliminación del exceso de agua empleando una centrífuga manual.....	57
Figura 19. Espinaca después de ser sometida a homogenización usando el stomacher.	58
Figura 20. Siembra sobre placas Petrifilm.	58
Figura 21. Espinaca embolsada lista para ser llevada a las dos temperaturas de almacenamiento.	
59	
Figura 22. a) Halos de inhibición del antibiótico ácido nalidíxico sobre <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva resistente a antibióticos. b) Halos de inhibición de <i>E. coli</i> (ECEI) sobre extracto de salvia (<i>Salvia officinalis</i>) c) Semilla de mamey con una concentración al 100%	62
Figura 23. Comparación de los tres desinfectantes en las diferentes etapas postcosecha de espinaca baby considerando tres tratamientos de desinfección.....	68
Figura 24. Comparación de los tratamientos de almacenamiento a temperatura ambiente y de refrigeración de los tres desinfectantes	70

RESUMEN

El consumo de hortalizas, especialmente las de hoja verde como la espinaca “baby”, las cuales forman parte de un elemento esencial de una dieta saludable, sin embargo en las últimas décadas se han asociado con brotes de enfermedades (ETAS) por el consumo de verduras frescas contaminadas con microorganismos entéricos como *Salmonella* y *E. coli* los cuales son microorganismos patógenos multirresistentes a antibióticos. Por lo tanto este trabajo tuvo como objetivo conocer el comportamiento de *Escherichia coli* (ECEI) inoculada en hojas de espinaca “baby” durante las diferentes etapas de postcosecha simuladas en condiciones de laboratorio. La metodología se dividió en 2 etapas, las cuales evaluaron la capacidad antimicrobiana de tres extractos de agentes antimicrobianos naturales que son la salvia (*Salvia officinalis*), ruda (*Ruta graveolens L.*) y semilla de mamey (*Pouteria sapota Jacq.*) en concentraciones de 25, 50, 75 y 100% mediante el método de pozos y etapas postcosecha de espinaca “baby” inoculada con *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) usando tres agentes antimicrobianos distintos, dos químicos (a base de plata coloidal y dióxido de cloro) y uno natural. Se encontró que la salvia (*Salvia officinalis*) presentó un efecto altamente significativo en las distintas concentraciones evaluadas y tuvo un mayor porcentaje de inhibición a la concentración de 100%. Asimismo, en las etapas postcosecha se detectó que el lavado es la etapa donde no presenta una reducción importante, sin embargo se le debe de dar mayor importancia. En la etapa de desinfección, enjuague y centrifugación, el mejor agente fue el antimicrobiano natural, los desinfectantes químicos no tuvieron diferencias significativas entre ellos. La temperatura en el almacenamiento juega un papel de gran importancia debido a que determina el retardo o aceleración crecimiento de los microorganismos. Los antimicrobianos naturales son una buena alternativa como agentes de antimicrobianos para la desinfección de hortalizas inclusive en cepas resistentes a antibióticos.

Palabras clave: *E. coli*, espinaca, antimicrobianos, salvia, dióxido de cloro, plata coloidal, postcosecha.

ABSTRACT

The consumption of vegetables, especially green leafy ones such as "baby" spinach, which are part of an essential element of a healthy diet, however in recent decades they have been associated with disease outbreaks (ETAS) due to the consumption of green fresh vegetables contaminated with enteric microorganisms such as *Salmonella* and *E. coli* which are multiresistant pathogenic microorganisms to antibiotics. Therefore, this work aimed to know the behavior of *Escherichia coli* (ECEI) inoculated in "baby" spinach leaves during the different postharvest stages simulated under laboratory conditions. The methodology was divided into 2 stages, first, one which evaluated the antimicrobial capacity of three extracts of natural antimicrobial agents are sage (*Salvia officinalis*), rue (*Ruta graveolens L.*), and mamey seed (*Pouteria sapota Jacq.*) in concentrations of 25, 50, 75 and 100% by the method of wells and postharvest stages of "baby" spinach inoculated with enteroinvasive *E. coli* (ECEI) using three different antimicrobial agents, two chemicals (based on colloidal silver and chlorine dioxide) and a natural one. It was found that the sage (*Salvia officinalis*) presented a highly significant effect in the different concentrations evaluated and had a higher percentage of inhibition at the 100% concentration. Likewise, in the post-harvest stages, it was detected that washing is the stage where it does not present a significant reduction, however, it should be given greater importance. In the disinfection, rinsing, and centrifugation stage, the best agent was the natural antimicrobial, the chemical disinfectants did not have significant differences between them. The temperature in storage plays a very important role because it determines the growth of microorganisms. Natural antimicrobials like sage are a good alternative as antimicrobial agents for the disinfection of vegetables even in antibiotic-resistant strains.

Keywords: *E. coli*, spinach, antimicrobials, sage, chlorine dioxide, colloidal silver, postharvest.

I. INTRODUCCIÓN

La espinaca *Spinacea oleracea L.* es un vegetal que proviene de la familia de los amarantáceos comestibles, presentan hojas grandes y de color verde oscuro, aporta vitaminas, fibras y minerales, aporta mínima cantidad de calorías, no contiene grasas y es fuente de antioxidantes que protegen al cuerpo del daño celular (Roberts et al., 2016).

Asimismo la espinaca es una de las verduras consumida en todo el mundo. La producción mundial de espinaca alcanzó más de 26.7 millones de toneladas en el año 2016, esto representa un valor de producción de 18 mil millones de dólares. El 91.5% de espinacas cultivadas corresponde a China y en México en el 2014 se produjeron 26,300 toneladas, la mayor parte de la cosecha se da en Guadalajara, seguido de los siguientes estados, el Estado de México, Querétaro y Puebla (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2016)

Por los excelentes beneficios a la salud, la espinaca es una verdura que debería ser consumida frecuentemente, debido a sus propiedades para la prevención de enfermedades crónicas comunes, como el cáncer, obesidad y enfermedades cardiovasculares. La espinaca es considerada como un alimento funcional además de su diversa composición nutricional (Roberts et al., 2016).

De acuerdo con lo anterior y ante la vida tan ocupada de los usuarios, las empresas de alimentos han optado por comercializar bolsas de distintos vegetales listos para su consumo (RTE), mismos que han sido sometidos a procesamientos mínimos para que puedan conservar su sabor. Sin embargo, esto ha ocasionado la aparición de distintos brotes por bacterias patógenas, ya que se ha demostrado que las verduras de hoja verde y ensaladas aun después de estos procesamientos que no son suficientes, contienen bacterias anaeróbicas mesófilas, bacterias psicotrópicas, levaduras y bacterias patógenas resistentes a antibióticos, propiciando un grave problema de salud pública, económica y social (Walia et al., 2012). *Escherichia coli*, es una bacteria patógena multirresistente a antibióticos, y es capaz de causar infecciones e intoxicaciones humanas, por el consumo de hortalizas de hoja verde como las espinacas, estos vegetales, al ser consumidas en crudo se convierten en un riesgo para la salud, ya que se utilizan ampliamente en la preparación de ensaladas. Es por lo anterior que en esta investigación se pretende conocer el comportamiento

de *Escherichia coli* inoculada en hojas de espinaca durante las diferentes etapas de postcosecha simuladas en condiciones de laboratorio.

II. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento de *Escherichia coli* inoculada sobre espinaca “baby” frente a diferentes tratamientos postcosecha.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos naturales (obtenidos mediante destilación por arrastre de vapor y maceración con etanol) y bactericidas comerciales sobre *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), utilizando el método de pozo y evaluando el halo de inhibición.
- Analizar el comportamiento de *E. coli* inoculada en hojas de espinaca “baby” durante los tratamientos postcosecha: lavado, centrifugación y desinfección (mediante agentes naturales y comerciales), mediante recuentos microbianos en placa.
- Evaluar la sobrevivencia de *E. coli* en hojas de espinaca sometida a diferentes tratamientos postcosecha almacenada en dos condiciones comunes de almacenamiento (temperatura de refrigeración y ambiente) de producto.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cambios en las tecnologías agronómicas, de procesamiento, conservación, distribución y comercialización a escala mundial han permitido a la industria de productos agrícolas suministrar gran variedad de hortalizas de hoja verde, a quienes deseen comprarlas durante todo el año. Algunos de estos productos también se están introduciendo en países donde no se cultivan habitualmente, por lo tanto, a la par se ha registrado un incremento importante de las de las importaciones.

Las hortalizas en especial las de hoja verde, se consumen en fresco y necesitan tener procesamientos y tratamientos mínimos postcosecha para mantener el sabor y textura, sin embargo, aún después de ser sometidas a dichas etapas en algunas ocasiones la microbiota autóctona o patógena puede persistir en el producto.

Existen varios reportes de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) ocasionados por microorganismo patógenos como *E. coli* (Taban y Halkman, 2011).

Adicionalmente las implicaciones económicas ocasionadas por un brote son muy graves, ya que puede provocar desde pérdidas económicas muy importantes, daños duraderos a un sector particular de la industria alimentaria hasta el cierre de la empresa o el cierre de fronteras para la exportación. Se ha estimado que aproximadamente el 30% de la población de países desarrollados contraen enfermedades transmitidas por alimentos, mientras que en países en desarrollo se han registrado hasta 2 millones de muertes (Iwu et al., 2019).

A pesar de presentarse esta situación se han realizado rastreos en los campos de cultivo de hortalizas asociados con varios brotes, no se tiene clara la identificación definitiva del modo de contaminación durante las etapas de precosecha. La evidencia que respalda estas rutas de contaminación se basa en gran parte en estudios experimentales de inoculación a nivel laboratorio y el campo (Erickson et al., 2010).

En la actualidad, no existe una media de control única que pueda garantizar la inocuidad de las verduras de hoja verde y de las ensaladas listas para comer (RTE). De ahí que exista la necesidad

de generar un sistema de inocuidad con un enfoque que abarque todos los aspectos, es decir un enfoque multidisciplinario, desde la producción, el procesamiento, la distribución y el uso del producto. Lo anterior debido a que la inocuidad de los vegetales frescos es un problema a nivel mundial que abarca tanto a los países que importan hortalizas como a los que las suministran (Taban y Halkman, 2011).

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, hay mayor demanda en el consumo de productos naturales y sin aditivos, una dieta rica en verduras, especialmente las de hoja verde, es vital para mantener la salud, debido sus innumerables propiedades alimenticias, ya que son ricas en vitaminas, minerales y fibra dietética, sobre todo cuando se consumen en fresco. Sin embargo, debido a ello las verduras de hoja verde por sus características físicas y de cultivo se han visto implicadas en brotes alimenticios; principalmente en ensaladas preparadas listas para su consumo (RTE) que son las que pueden proporcionar las condiciones para la proliferación y supervivencia de patógenos en las diferentes etapas de precosecha, cosecha y postcosecha, aumentando el riesgo en la inocuidad alimentaria e importantes pérdidas económicas por los mercados perdidos, por demanda de los consumidores, litigios y hasta el cierre de empresas y de exportaciones (Rivera, et al., 2009; García et al., 2002; Taban y Halkman, 2011.; Hussain y Dawson, 2013).

Existen pocos informes que muestren evidencia acerca del diseño de un programa de inocuidad que consideren las medidas importantes para la prevención de los peligros microbianos para la inocuidad de los alimentos. De igual modo no se ha encontrado información de las condiciones y límites críticos que deben desarrollarse para prevenir o reducir la contaminación microbiana, durante la etapas post cosecha, las cuales son la mediatas para el consumo del producto.

V. HIPÓTESIS

Escherichia coli (ECEI) es capaz de sobrevivir en espinaca baby sometida a las diferentes etapas postcosecha y almacenamiento de hortaliza.

VI. MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 1. Generalidades de la espinaca

La espinaca (*Spinacea oleracea L.*) es una verdura frondosa de hoja verde, con apariencia brillante, se estima que es originaria de Asia central y es un cultivo anual de clima templado o frío, sin embargo puede cultivarse todo el año (figura 1) (Kılıçkan et al., 2010).

Sus hojas pueden ser de redondas a puntiagudas y variar entre planas y arrugadas, aunque todas tienen una textura suave y tierna, lo que hace sus hojas delicadas.



Figura 1. Espinaca (*Spinacea oleracea L.*)

Fuente: (Abu et al., 2019)

Al ser una hortaliza de estación fría, tiende a perder humedad rápidamente y a marchitarse, por lo que debe cosecharse en el momento más fresco del día. Tiende a tener un periodo corto de crecimiento que va desde los 30 a los 50 días con una temperatura óptima de crecimiento de 15 a 20°C, pero es extremadamente resistente al frío ya que puede sobrevivir incluso a temperaturas de 0°C siempre y cuando ésta temperatura no sea persistente ya que puede afectar su crecimiento. Generalmente al final del invierno siembran las semillas, después cuando han crecido las plántulas se comienza a formar una roseta de hojas. Al llegar el verano, los días son más cálidos, lo que induce la formación de brotes, por lo que la espinaca comienza su fase reproductiva al crecer un pedúnculo de aproximadamente 1 metro de altura, con flores estaminadas y/o flores pistiladas (Ribera et al., 2020).

La espinaca crece mejor en suelos ligeramente básicos, con pH entre 6- 7.5, aunque se ha reportado que se tiene un buen cultivo en suelos con pH levemente mayor a 8, en suelos ácidos tiene problemas para su crecimiento y en alcalinos tiende a desarrollar clorosis. Tiene un sistema radicular pivotante, poco profundo, va desde 15 a 20 cm y ramificado con buenos niveles de nitrógeno, fosforo y potasio en el suelo. Puede llegar a crecer hasta 1 metro de altura. La calidad del suelo es de gran importancia para su crecimiento, ya que necesita suelos con buen drenaje y estructura, ya que si se cultiva en suelos muy arcillosos, éstos tenderán a inundarse provocando que se dificulte su desarrollo y la planta se ponga amarilla por lo que requiere de suelos ricos en materia orgánica (Morelock y Correl, 2008; SIAP, 2019; Marhuenda y García, 2015). Mientras que la producción de semillas de espinaca se genera principalmente en Dinamarca, ya que cubre más del 70% del suministro mundial.

El tiempo de crecimiento varía en función de la ubicación geográfica y el periodo del año, su cosecha oscila entre 4 a 9 semanas para la espinaca baby, donde se buscan hojas que tengan de 9 a 12 centímetros y para la espinaca adulta va de las 6 a las 15 semanas con hojas de 15 a 20 centímetros (Marhuenda y García, 2015).

Asimismo, la espinaca es una verdura que se consume principalmente en forma fresca y se puede utilizar en distintos platillos en ensaladas o en forma cocida para ser utilizada como guarnición. Finalmente, es una de las principales hortalizas que emplea la industria de productos listos para comer (RTE).

1.1 Importancia económica de la producción de espinaca

La espinaca es una hortaliza que se cultiva ampliamente, por ello es económicamente relevante por su consumo fresco y su procesamiento.

En el 2015, las hortalizas fueron consideradas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como el séptimo producto de mayor producción a nivel mundial, con aproximadamente 275 millones de toneladas anuales; de esas el 70% se venden como verduras frescas enteras, en países como Estados Unidos y la Unión Europea esas cifras van

en aumento. Los países que exportan vegetales frescos son China, seguido de México y de Países Bajos.

En el 2018, México se posicionó en el octavo lugar a nivel mundial en producción y exportación de productos agrícolas (CEDRSSA, 2020).

Sin embargo, aunado a los beneficios económicos que se han presentado, brotes por el consumo de alimentos contaminados han propiciado un problema de salud pública, con implicaciones económicas. Un solo evento de brote puede traer consigo pérdidas inimaginables, se ha estimado que 300,000 hospitalizaciones y 5000 muertes en Estados Unidos están relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos.

El costo estimado de incidentes de inocuidad alimentaria para la economía de Estados Unidos es de siete mil millones de dólares, lo cual proviene de notificar a los consumidores, retirar los alimentos de las tiendas y pagar daños por demandas, por ejemplo, el brote por *Escherichia coli* en espinaca en el 2006, tuvo una pérdida económica estimada de 350 millones de dólares en los Estados Unidos (Hussain y Dawson, 2013).

1.2 Beneficios a la salud por el consumo de espinaca

La espinaca tiene un contenido de agua extremadamente alto con un 92% aproximadamente, es muy bajo en grasas y carbohidratos, es una fuente rica en proteínas vegetales y en comparación con otras verduras de hoja verde, tiene un alto contenido de fibra, además es una verdura que se destaca por su alto contenido de sustancias bioactivas y vitaminas tales como la vitamina C (ácido ascórbico), A, E y K. También es una fuente importante de micronutrientes como los flavonoides como la quercetina, miricetina, espinacetina, luteína, jaceídina, patuletina, epóxido de luteína, neoxantina, ácido glucurónico 3,5,7,30, 4'pentahidroxi-6-metoxiflavona, feofitina b, neoluteína, fenoles como los polifenoles, ejemplo de uno es el ácido paracumárico, el ortocumárico y ácido ferúlico y carotenoides como la luteína, violaxantina y β caroteno, asimismo contiene mayor cantidad de éstos en comparación con la zanahoria. Adicionalmente tiene propiedades antioxidantes, al igual que sus extractos derivados tales como: glucurónido, patuletina, neoxantina y espinacetina (Pérez et al., 2019; Ramaiyan et al., 2020).

Adicionalmente actúa como cofactor de enzimas que participan en la síntesis de colágeno, carnitina y neurotransmisores; ayuda a la estimulación del sistema inmune.

La composición de minerales de la espinaca es determinada por la estación del año en la que es cultivada. La espinaca que es cultivada entre los meses de octubre y noviembre contiene mayor cantidad de nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, cobre, zinc y manganeso, en comparación de aquella que es cultivada en épocas de verano.

Algunas de las propiedades y beneficios a la salud que proporciona el consumo de esta hortaliza de hoja verde, es que posee actividad antiinflamatoria, ayuda a regular el perfil lipídico, tiene propiedades anticancerígenas, controla el colesterol, obesidad, hipoglucemiantes e hipolipidémicas, además que consumirla contribuye a tener una dieta balanceada y sana, la cual ayuda a la prevención de enfermedades crónicas (Roberts et al., 2016).

Sin embargo, se ha encontrado que dependiendo de los tratamientos postcosecha que reciba para su consumo, influyen en la cantidad de micronutrientes como por ejemplo hervir o cocer al vapor la espinaca disminuye significativamente los porcentajes de folato y vitamina C.

1.3 Presentaciones de la espinaca para su consumo

La espinaca se puede consumir tanto fresca como lista para su consumo en bolsas de polipropileno o procesada en diferentes formas como congelada, enlatada, deshidratada o en pure en comida para bebé (figura 2) (Bergquist et al., 2005). La presentación que ha ido ganando más popularidad en los últimos años es la de la espinaca embolsada fresca y lista para su consumo.



Figura 2. Presentaciones comerciales de espinaca para su consumo

a) espinaca fresca, b) espinaca en bolsas de polipropileno, c) espinaca congelada, d) espinaca enlatada, e) espinaca deshidratada, f) espinaca en pure

Antes de ser sometidas a los distintos procesamientos, las hojas de las espinacas son cortadas, clasificadas y limpiadas mediante el uso de desinfectantes; generalmente las hojas se usan intactas, aunque también pueden ser cortadas en trozos más pequeños, para su posterior tratamiento.

Siempre se debe retirar el exceso de agua de la superficie de las hojas para disminuir su carga microbiana, ya que la humedad favorece la descomposición de las hojas (Sinha et al., 2011).

CAPÍTULO 2. Principales microorganismos patógenos transmitidos por consumo de vegetales crudos

La propagación de enfermedades transmitidas por patógenos presentes en alimentos como las verduras frescas o mínimamente procesadas está aumentando, lo que representa importantes amenazas para la salud pública. De acuerdo con Wadamori et al., (2017) en el 2011, se produjeron un total de 5,048 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en la Unión Europea (UE). Los patógenos responsables más comunes fueron *Campylobacter* (220,209 casos), seguidos de *Salmonella* (95,548) y *E. coli* patógena (9,485).

Los microorganismos patógenos causantes de enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados (ETAS) mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos patógenos causantes de ETAS

Bacterias	Protozoarios	Virus
<i>Campylobacter spp</i>	<i>Cyclospora</i>	Hepatitis A
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>cayetanensis</i>	Enterovirus y ecovirus
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Cryptosporidium</i>	Rotavirus
<i>Bacillus cereus</i> <i>enterotoxigénico</i>	<i>parvum</i>	
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 otras <i>E. coli</i> productoras de toxina Shiga	<i>Giardia lamblia</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	
<i>Salmonella spp</i>		
<i>Shigella spp</i>		

Staphylococcus aureus

enterotoxigénica

Staphylococcus

cholerae

Fuente: (Steele y Odumeru, 2004; Elizaquível *et al.*, 2012; Yukiko *et al.*, 2017)

Algunos de los microorganismos patógenos presentes en vegetales se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos patógenos que comúnmente se han encontrado en hortalizas de hoja verde

Tipo de Vegetal	Patógeno
Lechuga	<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp, <i>Salmonella</i> spp, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> <i>Bacillus cereus</i> , <i>Cyclospora</i> sp.
Cilantro	<i>E. Coli</i> , <i>Ascaris Lumbricoides</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Espinaca	<i>E. Coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas</i> ssp, <i>Salmonella Typhimurium</i>
Perejil	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>aeromonas</i>
Albahaca	<i>Salmonella</i> y <i>Cyclospora</i> ssp.

Fuente: (Elviss *et al.*, 2009; Xanthopoulos *et al.*, 2010; Elhariry, 2011; Cerón *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015; Mayton *et al.*, 2018; Luna *et al.*, 2019; Azimirad *et al.*, 2021)

Aunque algunos parásitos y virus están implicados en brotes asociados al consumo de productos frescos contaminados, las bacterias patógenas representan el principal peligro microbiológico de este tipo de productos y mas aun debido a que algunas de estas bacterias presentan multiresistencia a antibióticos (Iwu *et al.*, 2019).

2.1 Microorganismos y brotes de enfermedades por el consumo de espinaca

Se han encontrado diversas bacterias y virus causantes de enfermedades transmitidas por alimentos los cuales se han vistos implicados en brotes, ya que son organismos capaces de sobrevivir en productos frescos. Sin embargo, los microorganismos con mayor probabilidad de causar brotes alimenticios son los patógenos entéricos como *Salmonella* y *E. coli*. (Aruscavage et al., 2006).

El centro para el control de enfermedades de Estados Unidos (CDC) valora que cada año 76 millones de personas contraen infecciones relacionadas con el consumo de alimentos, de ellos el 12% corresponde al consumo de frutas y verduras frescas (Klonsky, 2006).

A continuación se presentan los brotes causados por *Escherichia coli* y sus repercusiones a la salud (Tabla 3).

Tabla 3. Brotes de padecimientos causados por *Escherichia coli* por consumo de espinaca y afectaciones a la salud

Año	Lugar	Presentación del producto	Afectaciones en la salud
1982-2002	Estados Unidos	Hojas de espinaca	Intoxicación alimentaria por <i>E. coli</i> O157: H7.
2003	Estados Unidos	Espinaca recién cortada	Dos muertes.
2004	Estados Unidos	Espinaca en bolsa	Ciento dos hospitalizaciones y tres muertes.
2006	Utah, Nuevo México, Wisconsin, Washington, Oregón, California, Idaho, Arizona, Wyoming, Colorado,	Espinaca fresca	Infección de 199 personas por <i>Escherichia coli</i> O157:H7, 51% de los pacientes fue hospitalizado, 16% experimentó síndrome urémico hemolítico (SUH) y

	Nebraska, Minnesota, Illinois, Michigan, Indiana, Kentucky, Tennessee, Ohio, Pensilvania, Nueva York, Maine, Virginia occidental, Virginia, Delaware, Connecticut, Nevada.		tres únicamente con infección gastrointestinal.
2012	Connecticut, Massachusetts, Nueva York, Pennsylvania y Virginia.	Mezcla de espinacas orgánicas y diferentes marcas de verdura de hoja verde.	Treinta y tres personas enfermas, infectadas por la cepa de <i>E. coli</i> STEC O157: H7. 63% de las personas infectadas eran mujeres. El 46% fueron hospitalizados, dos personas desarrollaron síndrome urémico hemolítico (SUH), no se reportaron muertes.
2016	Inglaterra, Gales y Escocia,	Hojas de ensalada mixta, entre ellas espinaca	Infección de 161 personas por una cepa poco común de <i>E. coli</i> O157, 154 en Inglaterra, 6 en Gales, 1 en Escocia; sesenta fueron hospitalizados con síntomas leves hasta intensos con presencia de diarrea

			sanguinolenta y fuerte dolor abdominal y dos muertes
2020	Arizona, California, Illinois, Indiana, Kansas, Michigan, Minnesota, Missouri, Dakota del norte, Ohio, Oregón, Pensilvania, Tennessee, Texas, Utah, Virginia, Washington, Wyoming.	Variedad de verduras de hoja verde que incluyen espinaca y lechuga romana.	Cuarenta personas infectadas con la cepa de <i>E. coli</i> O157: H7, el 60% eran mujeres, solo se tiene información disponible de 34, de las cuales 20 fueron hospitalizadas y 4 desarrollaron síndrome urémico hemolítico (SUH), no se reportaron muertes.

Fuentes: (CDC, 2006; Klonsky, 2006; CDC, 2012; Wadamori et al., 2017; CDC, 2020)

2.2 Principales fuentes de contaminación durante la producción, cosecha, postcosecha, empaque de espinaca y medidas correctivas

La contaminación microbiológica de los vegetales puede ocurrir a lo largo de la cadena de producción, las fuentes de contaminación precosecha ocurren por medio de heces de humanos o animales, suelo, fertilizantes orgánicos tratados inadecuadamente, presencia de animales salvajes o domésticos, equipo, manipulación humana y agua. Durante la cosecha ocurren por la manipulación, mediante las herramientas y el equipo que pueden estar contaminados. Mientras que las de postcosecha el riesgo de contaminación puede presentarse por microorganismos entéricos presentes en el agua de lavado, manipulación, almacenamiento y transporte (Patel et al., 2010).

Los microorganismos presentes generalmente son residentes transitorios de las plantas y únicamente aparecen después de la contaminación del medio ambiente.

La viabilidad de la mayoría de los patógenos en el ambiente disminuye con el tiempo; varios estudios indican que *Escherichia coli* sobrevive en los campos de 4 a 8 semanas, en agua y aguas residuales menos de 30 días (Patel et al., 2010).

2.2.1 Agua

En cualquier punto donde el agua entra en contacto con productos frescos, puede verse afectada la calidad y la inocuidad de éstos, determinando la contaminación por microorganismos patógenos. Los estudios han revelado que el agua de riego puede ser una fuente importante de patógenos durante la temporada de producción.

Los parámetros que influyen directamente en la persistencia de microorganismos patógenos en el agua, aguas residuales y el suelo son el pH, la temperatura, la humedad, el antagonismo de los microorganismos autóctonos del suelo y la radiación UV; siendo la temperatura uno de los factores más importantes (Steele y Odumeru, 2004)).

La vigilancia de la inocuidad de aguas y alimentos se realiza mediante la detección de bacterias indicadoras de contaminación, como son los organismos coliformes de origen fecal como *Escherichia coli*, que conforma la familia de los coliformes fecales, quienes sólo habitan el intestino humano o animal, convirtiéndolos en excelentes indicadores de contaminación de agua y alimentos además de la presencia de microorganismos entéricos patógenos (Rivera et al., 2009).

Los recuentos de coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, estreptococos fecales y huevos de nematodos son los indicadores microbianos más comúnmente utilizados por las pautas de calidad del agua para determinar la calidad del agua de riego. Debido a que los recuentos de coliformes totales y coliformes fecales pueden enumerar bacterias de origen no fecal, los recuentos de *E. coli* actualmente se consideran el peligro biológico mayormente asociado a un indicador de la contaminación fecal del agua. Lo anterior debido a que en el grupo de los coliformes fecales y

totales, se estima que *E. coli* genérica es la especie que con mayor probabilidad indica que el agua podría presentar contaminación fecal reciente.

El manual de los lineamientos para la reutilización del agua de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) recomienda la ausencia de coliformes fecales detectables en las aguas residuales para regar cultivos que se consuman crudos y menos de 200 coliformes fecales por 100 mL en las que se utilizan para regar cultivos que serán procesados. Por ende, la calidad microbiológica de agua recomendada para el riego de cultivos que se consuman en fresco necesita ser superior a la de los cultivos que serán procesados, ya que los productos que tienen una mayor superficie, como son las verduras de hoja, y que también puedan presentar superficies rugosas, fomentan el alojamiento de los patógenos.

- Precosecha

El agua de producción puede ser utilizada en varias operaciones que incluyen el agua de riego, aplicación de pesticidas, fertilizantes, enfriamiento y control de heladas (CFSAN, 1998).

El agua agrícola puede contaminarse de forma indirecta o directa por los desechos humanos o animales que hayan sido manejados incorrectamente. La contaminación por desechos humanos puede originarse por un mal diseño en los sistemas sépticos, así como su mal funcionamiento o por el desbordamiento combinado de alcantarillado y alcantarillado pluvial. Otra fuente de contaminación ocurre mediante fuentes in situ, como es el desecho de animales de pastoreo, almacenamiento de estiércol, lagunas de estiércol escurrimiento durante el manejo de los mejoradores de suelo (CFSAN, 1998).

Diversos factores influyen en los riesgos del agua usada para la producción de vegetales incluyendo la fuente del agua usada, ya que en gran medida la calidad del agua depende de esto, la fuente puede ser superficial, de pozo o municipal (figura 3). Se puede asumir que el agua subterránea es la que tiene menor probabilidad a estar contaminada con altos niveles de patógenos, a menos que el pozo sea de poca profundidad o de construcción muy antigua o contruidos incorrectamente pueden entrar en contacto con el agua superficial, pudiendo ser más

susceptibles a la contaminación, mientras que las fuentes de agua superficial son las que están mayormente expuestas a contaminación por patógenos.

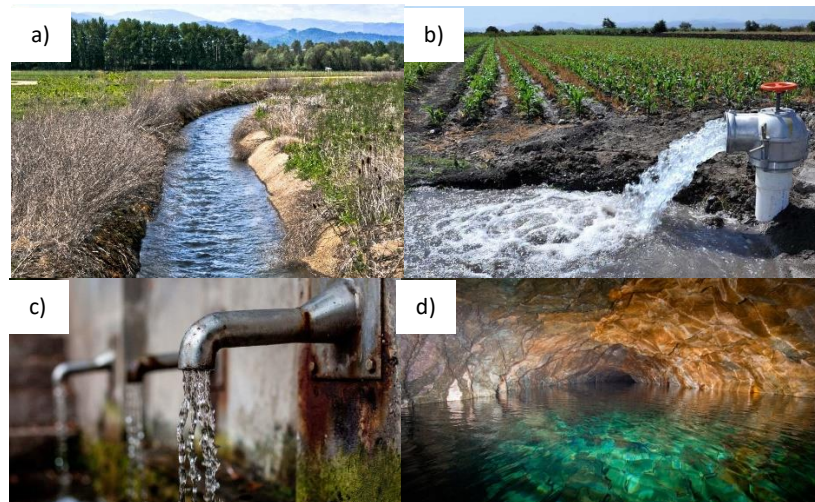


Figura 3. Tipos de fuentes de agua a usar en la precosecha a) Agua superficial, b) agua de pozo, c) agua municipal, d) agua subterránea

La calidad e inocuidad del agua utilizada para el riego depende de la fuente que se utilice, en la tabla 4 se enlistan los microorganismos patógenos que pueden estar presentes en el agua de riego.

Tabla 4. Presencia de microorganismos patógenos dependiendo de la fuente de agua de riego

Fuente de agua	Microorganismos patógenos presentes
Aguas residuales crudas, tratadas de manera ineficiente o diluida	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Shigella spp</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Cyclospora cayetanensis</i> y <i>Toxoplasma gond</i> , enterovirus y Hepatitis A
Aguas superficiales	<i>Salmonella spp</i> , <i>E. coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>
Aguas subterráneas poco profundas	Suelen encontrarse microorganismos en una tasa muy mínima, cuando están presentes

Agua de lluvia tratadas incorrectamente o sin tratar	<p>puede haber <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus</i> y <i>Clostridium</i></p> <p>La inocuidad de esta agua se puede comprometer por el método de recolección, en agua de lluvia recolectada en la azotea se encuentran, <i>E. coli</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Aeromonas spp.</i>, <i>Listeria spp.</i> y <i>Campylobacter spp</i></p>
--	--

Fuente: (CFSAN, 1998; Liu et al.,2013; Produce Safety Rule, 2017; Iwu et al., 2019).

Del mismo modo influye el método de aplicación durante la producción agrícola, que puede ser por aspersión, goteo, surco/rodada y finalmente cuando es aplicada al ocurrir la siembra, durante la producción o justo antes de la cosecha; la contaminación de las partes comestibles de los productos agrícolas puede verse afectadas por el método de riego. Se ha encontrado que *E. coli* puede sobrevivir al menos 50 días en agua recolectada de una gran variedad de fuentes superficiales que incluyen ríos, arroyos, embalses municipales y lagos (Steele Odumeru, 2004; Produce Safety Rule, 2017; Murray et al., 2017; Iwu et al., 2019)

La aplicación de agua de riego contaminada mediante riego por aspersión presenta mayores riesgos para los productos agrícolas, ya que puede conducir a la internalización tanto de *E. coli* O157 como de *Salmonella spp.* en la parte comestible de hortalizas de hoja verde a través de estomas abiertos. Se ha demostrado que la internalización se produce bajo diversas condiciones como a absorción de patógenos a través de las raíces de las plantas y la internalización de estas células a través de tejidos dañados o cortados. Una vez que los patógenos se han internalizado en la planta, adherido o colonizado en ella, forman biopelículas con las que pueden protegerse de las condiciones extrínsecas impuestas durante los tratamientos posteriores a la cosecha, especialmente a la del lavado, debido a que su resistencia a los desinfectante puede aumentar significativamente (Choi et al., 2011; Liu et al.,2013; Gómez et al.,2013; Murray et al., 2017)

El riesgo de contraer una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) por el consumo de alimentos contaminados por microorganismos patógenos presentes en el agua de riego dependerá de numerosas variables como la carga microbiana del patógeno, su período de latencia antes de que se vuelva infeccioso, su persistencia en el medio ambiente y en los alimentos, su capacidad de multiplicarse fuera de un huésped mamífero, su dosis infecciosa para los seres humanos y la respuesta del huésped, además la capacidad del patógeno para sobrevivir en el medio ambiente y en vegetales son determinantes para causar una infección humana (Steele y Odumeru, 2004).

Una práctica para garantizar la inocuidad del agua es asegurándose que los pozos se encuentren correctamente contruidos y protegidos, además de tratar el agua para reducir las cargas microbianas, hay preocupación acerca de la inocuidad del agua, los productores tienen la posibilidad de reducir los riegos cambiando el método, tiempo de aplicación, o fuente de agua, al igual que mejorando la inocuidad del agua de riego antes de su aplicación. Se requiere restringir el uso del agua de riego de mala calidad microbiológica a cultivos que probablemente se consuman crudos, al ocurrir algún evento de inundación evitar la cosecha, evaluar la calidad del agua cada determinado tiempo dependiendo de la fuente de agua que se emplee, garantizar la inocuidad durante el lavado postcosecha de frutas y verduras (CFSAN, 1998).

El método de riego puede dar una oportunidad para la reducción de contaminación al evitar el contacto entre el agua y los productos agrícolas frescos (Produce Safety Rule, 2017).

Los productores deben evaluar sus áreas de producción en términos de la proximidad al suelo, debido a que pueden presentar un riesgo potencial por escurrimientos de agua contaminada por lluvias (CFSAN, 1998).

- Postcosecha

El agua de postcosecha se utiliza durante el enjuague, el enfriamiento, lavado, encerado y transporte de los productos frescos (figura 4), si este tipo de agua no es manejada correctamente tiene la posibilidad de transmitir la contaminación ampliamente, ya que se puede dispersar los

microorganismos con mayor facilidad al entrar en contacto directo el agua con el producto y puede ser una fuente de contaminación o contaminación cruzada (CFSAN, 1998).

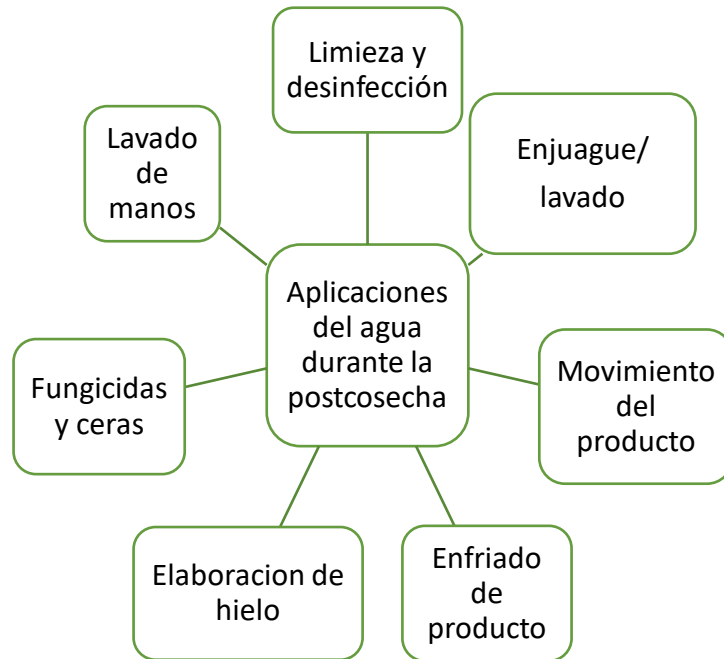


Figura 4. Aplicaciones del agua durante la postcosecha

Fuente: (Produce Safety Rule 2017).

Se recomienda que la calidad de agua cumpla con los requisitos de la EPA de Estados Unidos de América para el agua potable y otros indicadores similares para coliformes totales y con la Norma oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 sobre Salud Ambiental, Agua Para Uso Y Consumo Humano- Límites Permisibles De Calidad Y Tratamientos A Que Debe Someterse El Agua Para Su Potabilización, todo esto para que el agua pueda considerarse segura e higiénica, la cual tiene como límites máximos permisibles de coliformes totales 2 NMP/100 mL, 2 UFC/100 mL y de coliformes fecales no detectable NMP/100 mL, Cero UFC/100 mL (EPA, 2021; Secretaría de salud, 1994).

Adicionalmente, en la postcosecha puede haber contaminación en el agua de lavado. En las empacadoras frecuentemente se adiciona al agua de lavado una solución clorada para reducir los recuentos microbianos, pero los lavados solo pueden reducir aproximadamente de 1 Log₁₀ a 2

Log₁₀ en los recuentos microbianos totales, esto debido a que el desinfectante que se añade al agua de lavado se utiliza para evitar la propagación de la contaminación cruzada a través del agua (figura 5) (Aruscavage et al., 2006; Produce Safety Rule, 2017).

Al usar hielo para el enfriamiento postcosecha, éste debe estar preparado con agua libre de *Escherichia coli* genérica detectable en una muestra de 100 mL. Asimismo, el equipo para fabricación y almacenaje de hielo debe limpiarse y desinfectarse periódicamente y evitar contaminación cruzada, preferiblemente no se deben apilar cajas que contengan producto con hielo sobre otras cajas (Produce Safety Rule, 2017).



Figura 5. Algunas prácticas para conservar la inocuidad del agua
Fuente: (CFSAN, 1998).

2.2.2 Suelo

El uso de fertilizantes orgánicos, como el estiércol u otros componentes biológicos de origen animal utilizados para mejorar la estructura del suelo, como la harina de huesos, harina de sangre, harina de plumas, emulsión de pescado, que no hayan sido tratados adecuadamente pueden ser una fuente de contaminación, debido a que puede contener bacterias, virus y parásitos fecales, incluyendo algunos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Cryptosporidium*. Además la contaminación de hortalizas de hoja verde puede ocurrir mediante salpicadura de lluvia o agua de riego sobre las hojas.

Las pilas de estiércol ubicadas junto a las operaciones de cultivo representan de igual manera un riesgo de contaminación debido al escurrimiento, vectores vertebrados e insectos o aerosoles, también existe riesgo de contaminación en lugares donde se realizan operaciones con ganado o aves de corral, en zonas o áreas cercanas de almacenamiento, tratamiento, o eliminación de biosólidos o aguas residuales municipales y en donde hay altas concentraciones de vida silvestre cercanas al lugar de cultivo (CFSAN, 1998; Gil et al., 2015; Produce Safety Rule, 2017)

Existen algunos factores que alteran la supervivencia de los patógenos y su riesgo asociado en suelos fertilizados con fertilizantes orgánicos como son: el tipo de fertilizante, su manejo durante el almacenamiento, método de aplicación, tasa de aplicación, periodo de tiempo entre aplicación, siembra y cosecha (Gil et al., 2015).

La capacidad de los patógenos para sobrevivir en el suelo depende en gran medida de los factores abióticos tales como la temperatura, el pH, la humedad del suelo, tipo de suelo y de los factores bióticos como su composición, la diversidad del consorcio microbiano, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria* pueden subsistir en el suelo durante 7 a 25 semanas según el tipo de suelo, el nivel de humedad, temperatura en el que se encuentren (Van Veen et al., 1997; Guo et al. 2002; Jiang et al. 2004); Lang y Smith, 2007; Zhang et al., 2009; Erickson et al. 2010; Luna, et al., 2019).

Para disminuir la contaminación presente en el suelo se pueden aplicar acciones correctivas, así como de buenas prácticas agrícolas y programas estrictos de prácticas de higiene, las cuales ayudan a minimizar los riesgos (tabla 5).

Tabla 5. Acciones correctivas para disminuir la contaminación presente en el suelo

Acciones correctivas
Tratamiento térmico a fertilizantes orgánicos de origen animal previo a su utilización.
Revisión del método y tiempo de aplicación de los fertilizantes orgánicos de origen animal para lograr la seguridad de los usuarios,
Verificar el entorno de cultivo para la identificación de fuentes de materia fecal.
Situar las áreas de almacenamiento y tratamiento de los fertilizantes orgánicos lo más alejados posible de las áreas de producción y manipulación de los productos.
Añadir barreras físicas en áreas de almacenamiento y tratamiento de fertilizantes orgánicos para contener lixiviados.
Implementación de medidas para evitar la recontaminación de éste tipo de fertilizantes.

Fuente: (Produce Safety Rule 2017).

2.2.3 Otras fuentes de contaminación

Se puede presentar la contaminación cruzada por la manipulación humana o cuando el producto está en contacto con una superficie, herramientas, equipo o agua contaminada.

Los microorganismos patógenos pueden contaminar las hortalizas al entrar en contacto con material diferente a los productos agrícolas frescos o mediante los contenedores de cosecha, agua, superficies de contacto u otras fuentes como las mostradas en la figura 6.



Manos de los trabajadores



Ropa de los trabajadores



Contenedores de los productos agrícolas frescos



Mesas de empaque y
bandas transportadoras



Herramientas y equipo

Figura 6. Otras posibles fuentes de contaminación de productos agrícolas frescos
Fuente: (Produce Safety Rule, 2017).

Los tractores que han estado en contacto con fertilizante de origen animal no tratado o parcialmente tratado y posteriormente son usados en los campos de producción agrícola pueden ser una fuente de contaminación.

La capacidad de supervivencia de *E. coli* en el medio ambiente y en vegetales es un determinante importante en el riesgo de infección humana, los empleados infectados que trabajan con productos frescos que no recibirán ningún tratamiento aumentan el riesgo de propagar enfermedades transmitidas por alimentos, debido a esto es de suma importancia que las personas que están en contacto directo con hortalizas frescas deben seguir de manera estricta los requisitos de higiene y salud, mediante la utilización de barreras físicas como es el uso de guantes y desinfectantes para las herramientas, superficies de los equipos con el propósito de reducir eficazmente los riesgos, de igual manera, es ideal contar con un plan de inocuidad durante toda la cadena de procesamiento. Otra medida que puede tomarse en cuenta es la incorporación el fertilizante de origen animal al suelo antes de sembrar, la competencia de los microorganismos patógenos con los autóctonos puede reducir a los patógenos y al mismo tiempo el riesgo de contaminación, no es recomendable aplicarlo durante la temporada de crecimiento o antes de la cosecha ni en campos donde se produzcan hortalizas frescas ya que puede representar un riesgo (CFSAN, 1998; Sousa, 2015).

Se ha demostrado que el daño a las plantas también puede influir en la colonización de *E. coli* en hortalizas de hoja verde, ya que la lechuga dañada mecánicamente ha aumentado la persistencia de *E. coli* genérica, así como de *E. coli* O157: H7 en el campo. Se ha comprobado el crecimiento de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en el tejido vegetal dañado debido a la disponibilidad de nutrientes y al entrar en contacto con la planta o sus extractos son capaces de regular su expresión genética (Critzler y Doyle.,2010; Luna, et al., 2019)

Algunas bacterias patógenas se internalizan en las hojas por medio de los estomas (figura 7a) las cuales pueden sobrevivir y penetrar en el interior de la planta en el apoplasto, donde tienen la capacidad de permanecer en ese entorno con baja actividad metabólica, pudiendo perdurar a cambios drásticos de temperatura, pH, osmolalidad y privación de nutrientes. Asimismo, varias investigaciones han coincidido que las diferencias genotípicas entre plantas y patógenos entéricos pueden influir en la colonización por patógenos transmitidos en alimentos. Se ha observado que las diferencias entre los cultivares de espinaca es un factor importante en la colonización de *E. coli* O157:H7 en la superficie de las hojas (figura 7b), por ejemplo las *E. coli* diarreogénicas, que han desarrollado mecanismos de adhesión vegetal que varían según la cepa y la planta involucrada (Critzler y Doyle.,2010; Luna, et al., 2019).

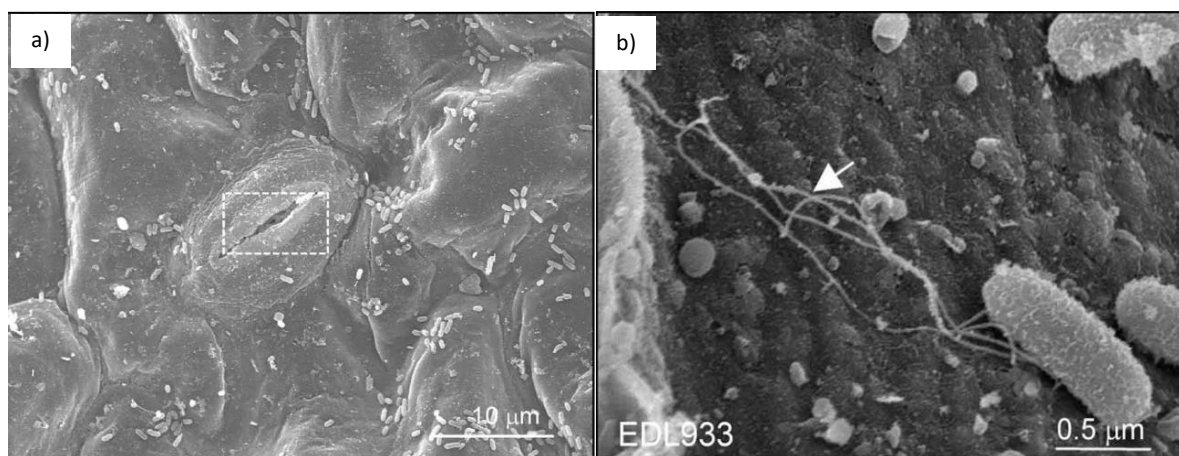


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido que muestra a *Escherichia coli* a) internalizada en los estomas de una hoja de una hortaliza de hoja verde b) adherida a la dermis de una hoja de una hortaliza de hoja verde y mostrando flagelos (flecha)

Fuente: (Saldaña et al., 2011)

En el caso de *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC), suele usar varios mecanismos los cuales incluyen adhesinas, fimbrias, flagelos y efectores codificados por LEE para la colonización y adhesión. De manera similar ocurre con *E. coli* (STEC), la cual tiene varios genes y/o estructuras asociadas con la formación de biopelículas para la colonización de plantas, además estas cepas con diferentes serogrupos (O26, O45, O103, O111, O121, O145, O91, O113, y O128, los tres últimos con la capacidad de provocar enfermedades graves en humanos y algunos mamíferos, han mostrado la capacidad para formar biopelículas en superficies abióticas, la cual podría ayudarlas en la persistencia en el medio ambiente y a la presencia de reservorios de genes de resistencia a antibióticos, ya que se ha comprobado que poseen multiresistencia (Luna, et al., 2019).

E. coli O157: H7 puede colonizar e internalizar plantas de espinaca o lechuga gracias a que es retenido por varias partes de la planta como son las hojas y brotes inclusive después de recibir un lavado o de ser sometidos a desinfecciones.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) puede adherirse de forma difusa a la epidermis, teniendo una penetración de alrededor de 20 a 100 μm en los estomas y zonas de unión de hojas de espinaca cortadas. Asimismo se ha demostrado que *E. coli* O157: H7 puede ingresar a la planta por medio del sistema radicular para así llegar a la parte comestible de la hoja de la lechuga (Luna, et al., 2019).

A pesar de la creciente importancia de los productos frescos como vehículo de patógenos hacia los humanos, actualmente 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 de la planta y de la población (Berger et al., 2010). Por ello, es importante el empleo de mejores desinfectantes para reducir lo mayor posible la carga microbiana presente en los vegetales crudos.

2.3 Desinfectantes

Existe una gran cantidad de desinfectantes disponibles para su uso en los tratamientos de agua en la postcosecha y de los consumidores para reducir las poblaciones bacterianas iniciales en productos mínimamente procesados. Sin embargo, la mayoría de estos métodos son poco confiables, entre los más utilizados se encuentran la plata coloidal, ácido láctico y el hipoclorito de

sodio siendo este último el mayormente utilizado, no obstante puede ser corrosivo en ciertos materiales como el acero inoxidable y se ha demostrado que la exposición prolongada al vapor de cloro puede causar irritación de la piel y del tracto respiratorio de los trabajadores, además de afectar negativamente al ambiente. Algunos otros que han ganado interés en los últimos años incluyen al dióxido de cloro, ozono, ácidos orgánicos, ácidos peroxiacético y peróxido de hidrogeno; a pesar de que el cloro es uno de los mayormente usados, ha mostrado un mínimo efecto para inhibir bacterias en este tipo de superficies (Klockow y Keener, 2009; Joshi et al., 2013; Sousa, 2015; Produce Safety Rule, 2017).

La eficiencia de un agente antimicrobiano dependerá de su estado químico y físico, además de las condiciones de tratamiento como es la temperatura, el pH, y el tiempo de contacto, la resistencia a los patógenos y la naturaleza de la superficie de la verdura o fruta.

Antes de usar un desinfectante ya sea químico u orgánico se debe rectificar que esté aprobado para usarse en el agua que tiene contacto con frutas y verduras frescas, para el caso de los desinfectantes orgánicos se debe consultar su certificador orgánico para asegurar su aceptabilidad, la cual se puede verificar en la página de la EPA. Para asegurar la eficacia de los desinfectantes se deben seguir las pautas para calcular la cantidad de desinfectante necesaria para el volumen de agua requerido en función de la concentración deseada del desinfectante, así como entender los factores que afectan la eficacia de estos como puede ser el pH, la temperatura, la luz solar y como se ven afectados por la carga orgánica. No se deben exceder los niveles indicados y permitidos de desinfectante en el agua de lavado, ya que las concentraciones excesivas pueden llegar a dañar el equipo, reducir la calidad de desinfección, además puede llegar a ser perjudicial tanto para los trabajadores como para los consumidores (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1998; Produce Safety Rule, 2017).

2.3.1 Desinfectante a base de plata coloidal

Este tipo de desinfección es uno de los más usados en México en hogares y restaurantes, consiste en una combinación de partículas metálicas de plata y una cubierta proteica la cual evita que las partículas de plata sedimenten. Entre los diferentes aditivos proteicos que pueden usarse, el

mayormente utilizado es la grenetina, la cual encapsula las partículas de plata, dándoles una mayor flotabilidad, la presencia de este aditivo proteico crea un gran riesgo de contaminación bacteriana (Secretaría de salud, 2015).

Asimismo se ha reportado que las soluciones coloidales de plata tienen acción antibacteriana contra Gram positivas y Gram negativas, como en *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Balandin et al., 2015).

La acción microbicida de la plata coloidal se debe a la generación de especies de oxígeno reactivas (EROS) y a la inducción del estrés oxidativo (EO), como resultado del desacoplamiento del transporte de electrones y la desactivación de enzimas, generalmente a causa de la desnaturalización de los enlaces disulfuro de las proteínas bacterianas, lo cual conduce a la muerte celular. Asimismo, en las células eucariotas como en las bacterias el blanco principal para su toxicidad se debe a la alteración de la pared celular y de la membrana celular bacteriana, lo cual inhibe los procesos de respiración e interactúa con el azufre que contiene la membrana bacteriana y con los grupos fosfato del DNA, debido a esto, se impide la replicación y se inactiva la enzima fofo-manosa isomerasa, la cual cataliza la conversión de manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, intermediario de la glucólisis (del Rocío et al., 2017).

2.3.2 Dióxido de cloro

El dióxido de cloro (ClO_2) es un gas sintético, el cual tiene un color verde amarillento y olor similar al cloro. Cuando se le adiciona agua forma clorito iónico, que es un compuesto muy reactivo. A altas concentraciones reacciona con agentes reductores.

Su solubilidad en agua es de 8 g/L a 20 °C, por lo que es altamente soluble, además tiene un gran efecto en el control del sabor y el olor. Existen tres procedimientos para la obtención de dióxido de cloro: el primero es mediante la oxidación del clorito de sodio, el segundo la reducción del clorato y finalmente la electrolisis de clorito de sodio (Cavero, 2020).

Es un potente desinfectante, su potencial bactericida es independiente del pH pero tiene una mejor desinfección en pH entre 4 y 9, es desinfectante que el cloro para el tratamiento de esporas

además requiere poco tiempo de contacto. Sin embargo tiene menor efecto microbicida que el ozono, pero mayor que el cloro (Villanueva, 2010).

En las últimas décadas ha sido ampliamente usado como desinfectante de productos frescos, además eficiencia en un amplio rango de pH, menor reactividad con materia orgánica, alta efectividad a bajas concentraciones, además su principal subproducto el ion clorito (ClO_2) y el ion clorato (ClO_3), está clasificado como producto no cancerígeno. Las desventajas es que es una sustancia muy inestable, se descompone fácilmente cuando es expuesto a la radiación UV, lo cual podría ocurrir en las operaciones de lavado de productos crudos (Tomás et al., 2012; Cavero, 2020).

Su mecanismo de acción sobre microorganismos incluye la capacidad para oxidar proteínas actuando sobre aminoácidos específicos, interfiere el crecimiento de microorganismos por acción a nivel del ciclo de Krebs en los microorganismos modificando la acción del ácido nucleico provocando que el microorganismos no sintetice ácidos nucleicos ni proteínas y altera la funcionalidad de las membranas celulares (Manual, 1999; Zoffoli et al., 2005).

Se ha demostrado su efectividad contra bacterias, virus, esporas y microorganismos patógenos resistentes como la Legionella, quistes améebicos, Giardia, *E. Coli*, y *Cryptosporidium* y virus de la hepatitis, entre otros (Noss et al., 1986).

2.4 Antimicrobianos naturales

La resistencia a antibióticos es uno de los principales problemas de la población en lo referente a salud pública, debido a que en los últimos años ha habido un incremento significativo de cepas de microorganismos resistentes a múltiples fármacos en todo el mundo, lo que ha ocasionado un problema de infecciones microbianas, algunas de ellas que podían ser tratadas con antibióticos, hoy en día ya no es posible.

Uno de los factores principales que contribuyen a la resistencia antimicrobiana se debe al uso no controlado e inapropiado de fármacos, además los desechos hospitalarios, domésticos e industriales han propiciado que se agrave más la situación.

La intensa actividad del metabolismo bacteriano propio del sistema gastrointestinal determina el incremento del intercambio del material genético siendo este, por consiguiente, el lugar de elección para la transferencia a gran escala de los genes de resistencia. De este modo, la transmisión de los factores de resistencia puede dar lugar a un problema mayor, la multiresistencia, condición que implica que dichos microorganismos no sean solamente resistentes a una serie de antimicrobianos, sino que esa condición continúe siendo transferible, transformándose dichas bacterias en verdaderos reservorios para la resistencia a los antimicrobianos como son los fármacos (Bonelli et al., 2014).

Esta resistencia intrínseca o adquirida la presentan varios patógenos y es uno de los problemas más importantes de la actualidad, por lo que ha habido un creciente interés por agentes antimicrobianos alternativos como son los naturales (Fournomiti et al., 2015)

Los extractos naturales derivados de plantas aromáticas pueden ser una gran alternativa, se ha comprobado que su capacidad fitoquímica ejerce actividad antimicrobiana contra patógenos sensibles y resistentes mediante diferentes mecanismo de acción. Además de proporcionar actividad antimicrobiana, también pueden ejercer efectos antioxidantes sin producir toxicidad, con buena viabilidad económica y actividad farmacológica; dichas propiedades pueden ayudar en la conservación de alimentos (Chouhan et al., 2017).

Adicionalmente, los antimicrobianos de origen natural llevan a cabo mecanismos diferentes a los de los antimicrobianos sintéticos, por lo que funcionan sobre cepas resistentes, los mecanismos de acción se llevan a cabo dentro de la célula, la cual se realiza en partes para garantizar la supervivencia de la célula, alguno mecanismos pueden llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteínas, en la síntesis de su genética. Sin embargo, en la actualidad hay pocos estudios acerca de la inhibición microbiana utilizando extractos o aceites naturales, aunque se sabe que los antimicrobianos no pueden tener algún efecto sino hasta que se rebasa alguna concentración crítica (Sauceda, 2011; Orlanda y Nascimento., 2015)

2.4.1 Salvia (*Salvia officinalis*)

La salvia es el género más grande de la familia de las *Lamiaceae*, abarca alrededor de 900 especies a nivel mundial, pero solo algunas son importantes económicamente por sus distintos usos como agente conservador, especia y en la producción de té. La salvia (*salvia officinalis*) es una planta aromática subarborescente perenne; se ha reconocido su actividad antimicrobiana, a la cual se le atribuyó la presencia de altas concentraciones de 1,8-cineol, α -tuyona, alcanfor y salviol. Adicionalmente se han determinado más de 300 componentes volátiles, de los cuales se han caracterizado más de 120 componentes, tales como alcaloides, carbohidratos, ácidos grasos, derivados glucosídicos (por ejemplo, glucósidos cardíacos, glucósidos flavonoides, saponinas), compuestos fenólicos (por ejemplo, cumarinas, taninos), poliacetilenos, esteroides, terpenos / terpenoides (por ejemplo, diterpenoides, triterpenoides, sesquiterpenoides) y ceras. Los flavonoides más abundantes en el extracto son el ácido rosmarínico y el ácido elágico, seguidos del ácido clorogénico y la quercetina (Edris et al., 2007; Fournomiti et al., 2015; Sehnal et al., 2019).

Sus extractos alcohólicos y acuosos son ricos en flavonoides ácido rosmarínico, ácidos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido 3-cafeoilquínico, además contiene ácido oleanólico y el ácido ursólico, dos terpenoides que poseen acción inhibitoria en el crecimiento de bacterias multirresistentes a fármacos como son Gram positivas como *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* y Gram negativas entre las que se encuentran *Aeromonashydrophila*, *Aeromonassobria*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas morgani*, *Salmonella anatum*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigellasone*, *Pseudomonas aeuroginosa*, *S. enterditis*, así como induce efectos antifúngicos, antivirales y antipalúdicos. Además se ha demostrado que la *S. officinalis* tiene efecto en bacterias que presentan resistencia a antibióticos como la vancomocina, la penicilina, ampicilina y la metilicina (Ghorbani et al., 2017).

El mecanismo de acción de la salvia sobre bacterias Gram negativas y positivas es que actúa sobre la permeabilidad de la membrana celular. El trabajo publicado por Ghorbani et al., 2017 indica que el consumo de *S. officinalis* no provoca efectos secundarios graves.

2.5 Principales actividades que se realizan en un empaque y su distribución

Una empacadora es una instalación donde se combinan y/o preparan productos frescos perecederos que incluyen frutas y verduras para cumplir con los requisitos de un mercado objetivo; es el lugar donde se aplican tratamientos de postcosecha, centrándose en que los productos sean seguros y de buena calidad para lo que aplican buenas prácticas en las cadenas de suministro y son las que prevén un ambiente limpio para el lavado, clasificación, tratamiento y empaquetado adecuado de los productos.

Durante el empaque participan diversos componentes, los cuales deben trabajar óptimamente en conjunto para conservar la calidad del producto y garantizar la inocuidad de los productos eliminando o reduciendo la contaminación microbiana, química y física y poder asegurar la salud de los consumidores.

Una planta empacadora también podría servir como un punto de recolección o acumulación, un área de almacenamiento temporal antes de la distribución, un punto de despacho de diferentes productos, los cuales tienen distintos destinos.

En la figura 8 se muestra un diagrama de las principales actividades realizadas por una planta empacadora



Figura 8. Esquema de actividades de una planta de empaque de hortalizas

Las actividades principales que realiza una planta de empaque son:

- 1.- Recepción. Donde se realiza una inspección rápida en búsqueda de daños, descomposición, materiales extraños, residuos químicos, plagas, o roedores. En esta etapa se asigna un código que identifica al proveedor, fecha de cosecha y de entrega, lugar de producción y numero de lote. Si es posible, se realizan pruebas químicas rápidas para buscar residuos químicos.
- 2.- Selección del producto. Se evalúa detenidamente el producto y se elimina las partes que no son deseadas o aquellas que visualmente no tengan buena apariencia y las que puedan contribuir al deterioro. La separación y recorte se deben realizar con el equipo adecuado, guantes, cuchillos afilados de acero inoxidable.
- 3.- Clasificación. Los productos son seleccionados de acuerdo con su calidad y tamaño, se clasifican de acuerdo con el mercado se siguen los estándares nacionales o de importación, incluyendo aspectos por su tamaño, peso, color o calidad visual.

Cuando se trata de grandes volúmenes de producto, este tipo de operaciones se realizan de forma mecanizada para agilizar el proceso.

4.- Lavado. Elimina el látex, restos de suelo, residuos químicos, disminuye la carga microbiana, insectos y otros materiales de la superficie del producto. Se debe tener sumo cuidado de no que no se cause daño físico durante este proceso. Existen diferentes tipos de lavado como:

- Lavado por inmersión. Se debe cambiar el agua con frecuencia y es necesario el uso de antimicrobianos. El agua debe tener temperatura templada, ya que el agua fría puede ocasionar la absorción del agua por parte del producto, provocando que los microorganismos se internalicen, haciendo que los tratamientos posteriores de desinfección y lavado sea ineficientes.
- Lavado por aspersión. Se usa un chorro de agua limpia. Esto también puede propiciar la propagación de microorganismos por el contacto directo en la superficie o por la formación de aerosoles, por lo que es recomendable el uso de desinfectantes. En comparación con el método de inmersión, este método es más efectivo.

Independientemente del tipo de lavado a utilizar se debe seguir a las buenas prácticas de manufactura como es el no reutilizar el agua de lavado para evitar la contaminación de los productos.

5.- Eliminación del exceso de humedad. Después del lavado es necesario que se eliminen las gotas que permanecen en la superficie antes de empacar, almacenar o transportar, para evitar la descomposición. Esto se puede conseguir mediante el secado por goteo en rejillas o mediante el apilamiento piramidal de las cajas.

6.- Embalaje. Se clasifica en dos, los productos que se empacan a granel para la comercialización al mayoreo o los que son empaquetados al menudeo.

Los materiales de empaque deben ser cómodos de manipular y de brindar protección contra daños mecánicos y permitir la circulación del aire. Los empaquetados al menudeo deben contener una etiqueta con información sobre el peso, el país de origen, entre otros, deben ser atractivos al

consumidor. El etiquetado es necesario para promover la marca y distinción del producto para conseguir su trazabilidad (Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific Bangkok, 2012).

La espinaca al ser empacada en bolsas puede sufrir lesiones en sus hojas durante el almacenamiento o el transporte ya que se apilan las bolsas, bandejas o inclusive al tirar y agarrar las bolsas, propiciando la internalización de microorganismos, la tasa de descomposición, lo cual afecta las cualidades nutricionales, sensoriales de la espinaca motivo por el cual el producto se vuelve inadecuado para el consumo (Ariffin et al., 2017).

7.- Preenfriamiento. Los lugares de almacenamiento están generalmente diseñados para mantener sus cargas a temperaturas ya establecidas, por lo que el producto ya debe estar a la temperatura deseada al ingresar a la etapa de almacenamiento para evitar sobrecargar de trabajo a la unidad de refrigeración o para que el producto pueda llegar a tener la temperatura deseada, en la espinaca la temperatura corresponde a 0°C. Por lo que en esta etapa se baja la temperatura del producto y se deja enfriar por algún tiempo (Sinha et al., 2011).

8.- Almacenamiento en frío. Después del preenfriamiento, los productos deben cargarse inmediatamente en el transporte para su envío a su destino, en caso de tardar en la transportación, el producto debe conservarse a baja temperatura para evitar que se sobrecaliente y su posible deterioro, el cual puede realizarse mediante enfriamiento con aire (que representa un menor riesgo) y por agua de enfriamiento y hielo, representan un riesgo de contaminación patógena por la reutilización del agua que puede provocar la contaminación cruzada (Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific Bangkok, 2012).

2.5.1 Proceso de la espinaca mínimamente procesada en una empacadora

Los productos de espinaca mínimamente procesados pueden ser hojas frescas enteras, o recién cortadas empacadas a condiciones de atmosfera modificada u atmosfera común. Después de que las hojas son seleccionadas, enteras o recortadas, se clasifican y se limpian con desinfectantes para reducir la carga microbiana que pudiera estar presente, posteriormente las hojas enteras o recortadas son secadas mediante centrifugación antes del envasado, el procesamiento se describe

mejor en la figura 9. Un factor que no debe pasar desapercibido es la temperatura de almacenamiento, transporte y venta, ya que ésta puede afectar de respiración de las hojas de espinaca propiciado la alteración de la atmosfera pudiendo volverse anaerobia (Sinha et al., 2011).

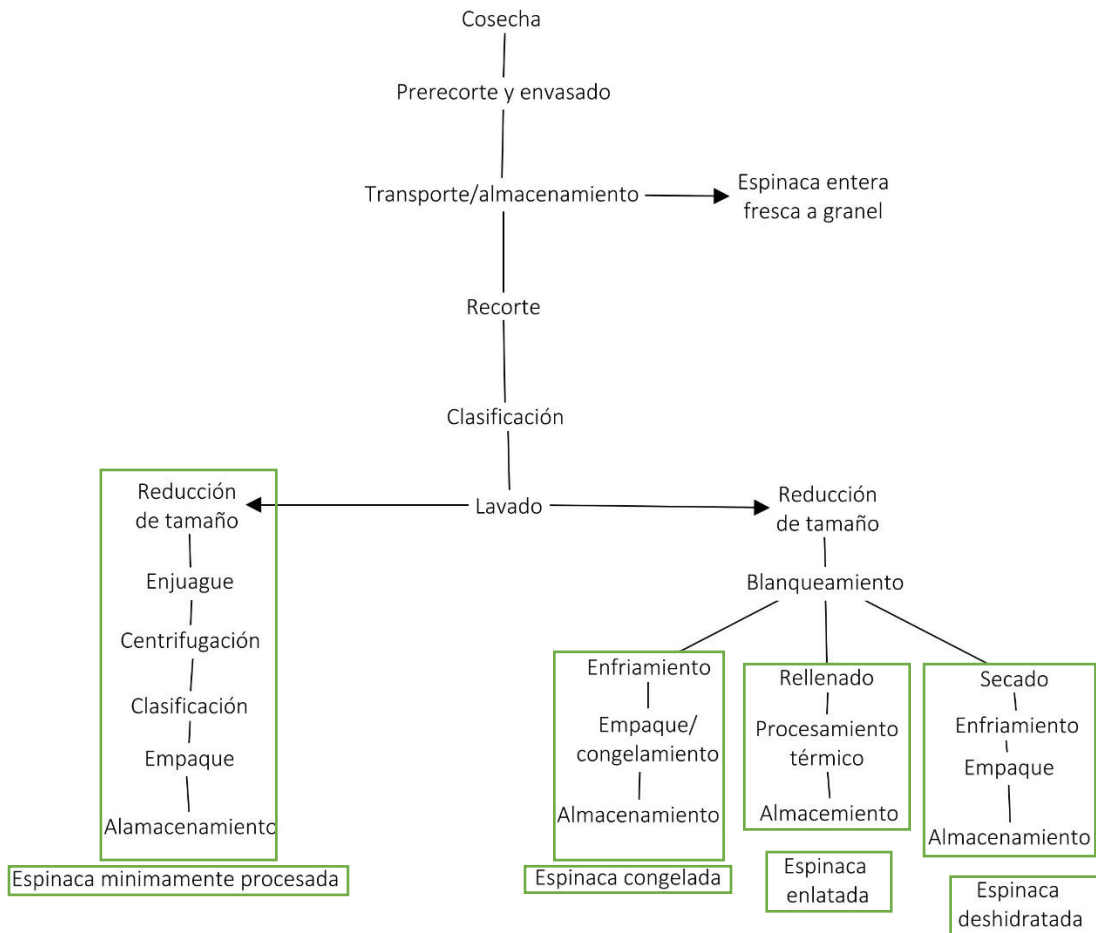


Figura 9. Diagrama general del manejo y procesamiento de la espinaca

Fuente: (Sinha et al., 2011).

Se deben definir las zonas dentro de una empacadora para el control de limpieza y desinfección de las diferentes áreas que podrían afectar los productos agrícolas frescos, las zonas se dividen de la siguiente manera de acuerdo con el manual del curso de capacitación para productores (Produce Safety Rule, 2017)

- Zona 1. Cualquier superficie que tenga contacto directo con los productos agrícolas frescos como las bandas, rodillos, cepillos, mesas de selección, manos de los trabajadores, recipientes o fregaderos. Estas zonas son de mayor preocupación, debido a que se puede tener contaminación cruzada, por esta razón es el área donde se tiene mayor impacto inmediato en la inocuidad.
- Zona 2. Área inmediata adyacente a la zona 1, la cual incluye superficies que no presentan contacto directo con los productos agrícolas frescos pero se encuentran muy cerca de éstos. Representan un riesgo indirecto que al mismo tiempo podría poner en riesgo la inocuidad del producto. Puede tratarse de boquillas de atomización, estructuras del equipo, paredes laterales, entre otras superficies que se encuentren cercanas.
- Zona 3. Área adyacente a la zona 2, se trata de áreas dentro de la empacadora como los pisos, botes de basura, áreas de almacenamiento, área de tráfico de personal, drenajes, montacargas, teléfonos, entre otros. Esta zona puede actuar como adyacentes de plagas o reservorio de microorganismos patógenos si la suciedad o el agua estancada o desechos no se remueven de manera periódica.
- Zona 4. Cualquier área que pueda tener impacto en la inocuidad de los productos agrícolas frescos, el cual podría estar fuera del entorno donde se manipulan o empaacan los productos, como son las áreas que se encuentran fuera del empaquen, es decir, que se refiere a los factores ambientales como el estiércol o pilas de composta, tráfico de áreas de carga y descarga. Inclusive los campos adyacentes al área de empaque.

Para reducir los riesgos de contaminación se necesita desarrollar prácticas de saneamiento las cuales pueden incluir la capacitación de trabajadores, limpieza y desinfección de superficies de contacto directo con el producto fresco, limpieza de equipos y herramientas, de enfriadores, cámara de refrigeración y cuartos fríos, así como la limpieza de vehículos de transporte (Produce Safety Rule, 2017).

VII. METODOLOGÍA

El plan de trabajo que se utilizó en esta investigación se observa en la figura 10.

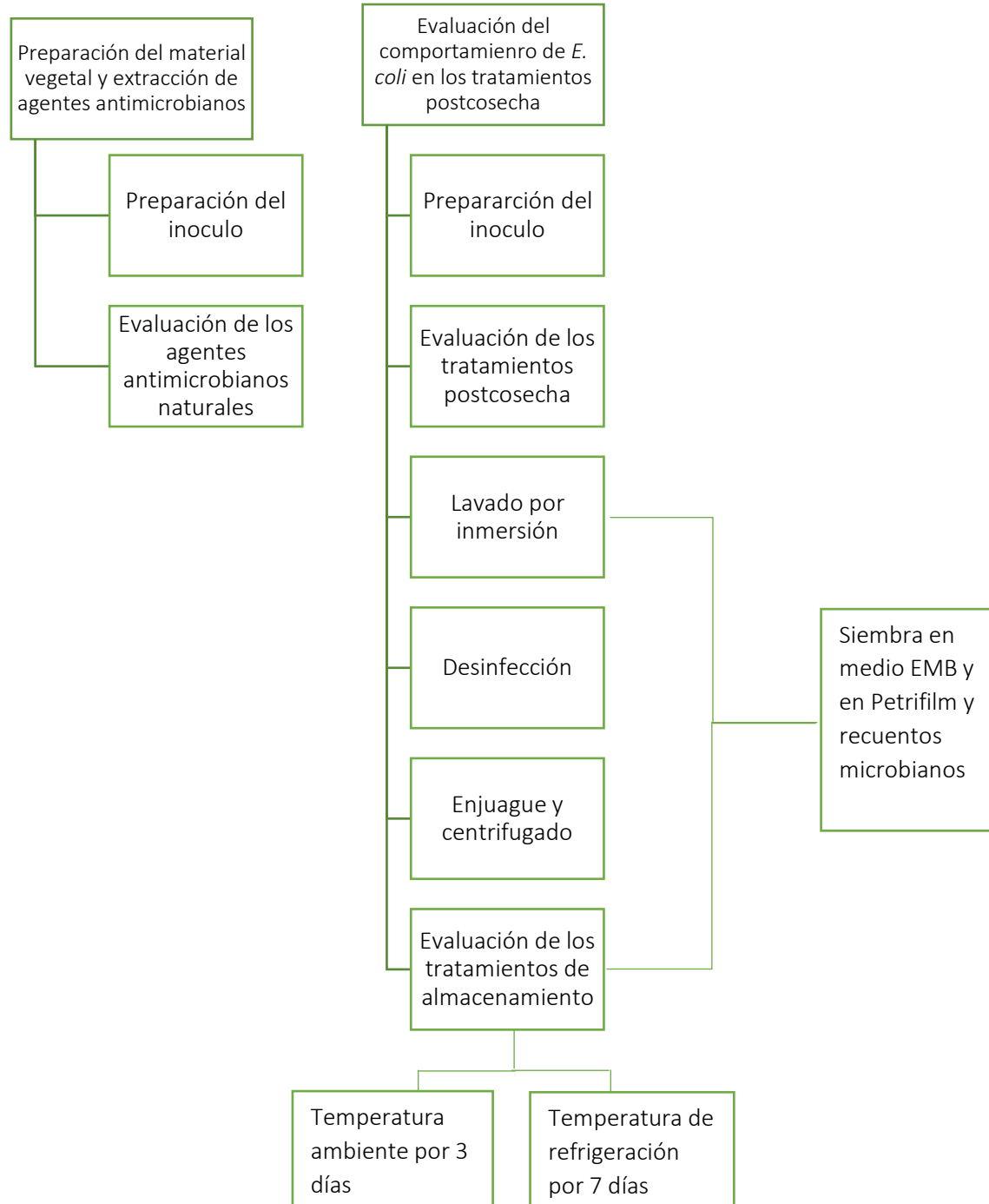


Figura 10. Diagrama general del plan de trabajo a realizar

La metodología de esta investigación constó de 2 etapas, la etapa 1 sobre extracción y análisis de los agentes antimicrobianos naturales y la etapa 2 acerca de la evaluación de los tratamientos postcosecha de espinaca “baby” inoculada con *Escherichia coli*, mismas que se detallan a continuación.

Etapa 1. Extracción de agentes antimicrobianos naturales

En la figura 11 se ilustra un esquema general de lo que se realizó en la primera etapa

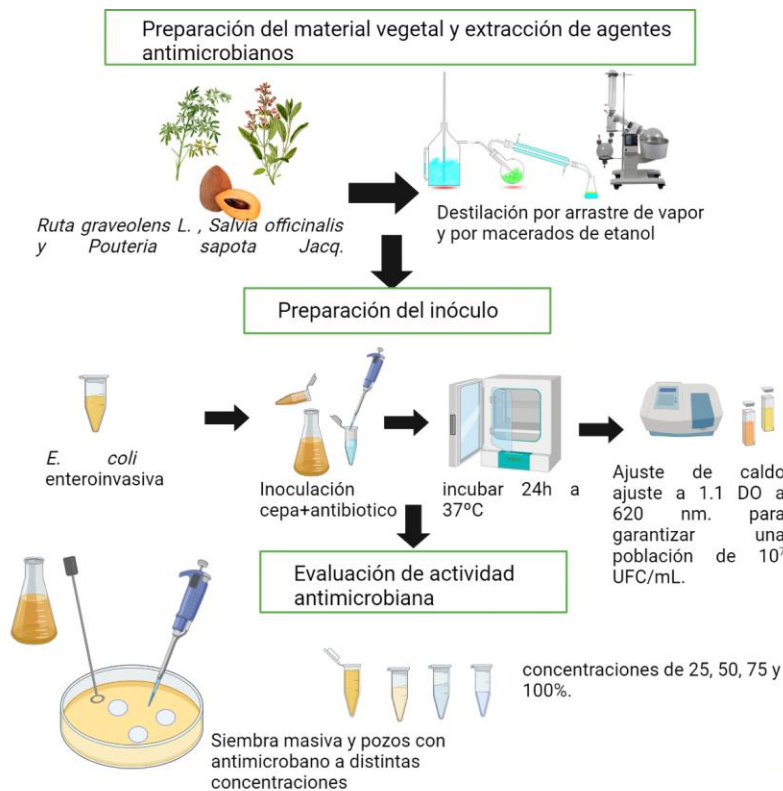


Figura 11. Esquema de la primera etapa de la metodología

7.1. Preparación del material vegetal y extracción de agentes antimicrobianos.

Se utilizaron tres agentes antimicrobianos naturales, para la ruda (*Ruta graveolens L.*) se ocuparon sus hojas frescas y para la salvia (*Salvia officinalis*) se usaron sus hojas y tallos secos, figura 12. Los vegetales fueron sometidos a destilación por arrastre de vapor para la obtención de los aceites

esenciales. El tercer agente antimicrobiano fue la semilla de mamey (*Pouteria sapota Jacq.*), su extracto fue obtenido mediante maceración con etanol y concentrado con el uso del rotavapor.

Para calcular el rendimiento se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{masa del aceite esencial (g)}}{\text{masa de hojas secas (g)}} * 100$$

En la tabla 6 se resumen los procedimientos y técnicas utilizadas para la obtención de los agentes antimicrobianos naturales.

Tabla 6. Preparación, extracción, rendimiento y técnica de extracción de los agentes antimicrobianos naturales

Antimicrobiano	Preparación	Rendimiento	Técnica de extracción
<i>Ruta graveolens L.</i>	210 g de material vegetal fresco + 1500 mL de agua destilada	0.02%	Destilación por arrastre de vapor
<i>Salvia officinalis</i>	150 g de material vegetal seco + 1500 mL de agua destilada	5.06%	Destilación por arrastre de vapor
<i>Pouteria sapota Jacq.</i>	Semilla de mamey seca, pulverizada y tamizada.		Maceración con etanol al 95% y retiro de etanol con un rotavapor

Fuente: autoría propia.

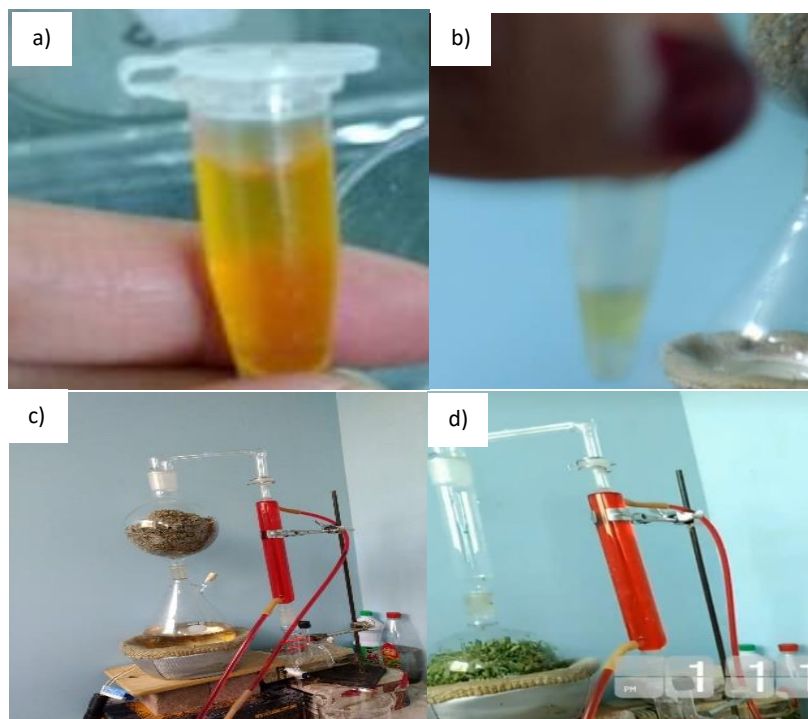


Figura 12. a) Extracto de salvia b) Extracto de ruda c) Equipo de destilación por arrastre de vapor de la salvia d) Destilación por arrastre de vapor de la ruda

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se valorará la actividad antimicrobiana mediante el método de pozos, los extractos serán dispersados con un buffer salino de fosfatos para obtener concentraciones de 25, 50, 75 y 100%. Se realizarán pozos con capacidad 30 μ L en placas de medio TSA (Agar Soya Trypticaseína) previamente sembradas de forma masiva con la cepa *Escherichia coli*, se depositará cada agente antimicrobiano en los pozos. Posteriormente las placas serán incubadas a 37° C por 24 horas y finalmente se medirá el halo de inhibición generado alrededor de cada pozo (Alzoreky y Nakahara, 2003). Se seleccionará el antimicrobiano más efectivo, considerando el que presente un mayor halo de inhibición.

7.2. Preparación del inóculo.

Se utilizó una cepa de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) (figura 13) almacenada previamente a -80°C, la cual fue inoculada en caldo TSB (Soya Trypticaseína) y se le añadió antibiótico (ácido nalidíxico)

mismo que se incubó a 37°C por 24 horas en agitación, y posteriormente se realizó un ajuste a 1.1 DO a 620 nm. para garantizar una población de 10^7 UFC/mL. Para confirmar la población del microorganismo en estudio se realizaron recuentos en medio EMB (Eosina de Azul de Metileno) mediante el método de extensión en superficie.

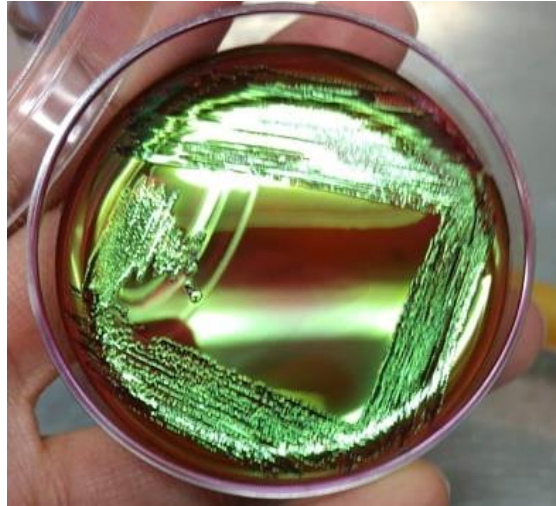


Figura 13. Cepa pura de *Escherichia coli* enteroinvasiva

7.3. Evaluación de los agentes antimicrobianos naturales

Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de pozos, los extractos se dispersaron con un buffer salino de fosfatos para obtener concentraciones de 25, 50, 75 y 100% (tabla 7). Se realizaron pozos con capacidad 30 μ L en placas de medio TSA (Agar Soya Trypticaseína) previamente sembradas de forma masiva con la cepa de *Escherichia coli*, donde fueron depositados cada uno de los agente antimicrobianos. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37° C por 24 horas y finalmente se midió el halo de inhibición generado alrededor de cada pozo (Alzoreky y Nakahara, 2003).

Se seleccionó el antimicrobiano más efectivo, considerando el que presentó un mayor halo de inhibición.

Tabla 7. Preparación de las concentraciones de los extractos

Concentraciones (%)	Preparación
25	150 μ L de extracto + 450 μ L de buffer salino
50	300 μ L de extracto + 300 μ L de buffer salino
75	450 μ L de extracto + 150 μ L de buffer salino
100	Sin diluir

Etapa 2. Evaluación del comportamiento de *E. coli* inoculado en hojas de espinaca “baby”

En la figura 14 se presenta la metodología que se siguió en la etapa 2.

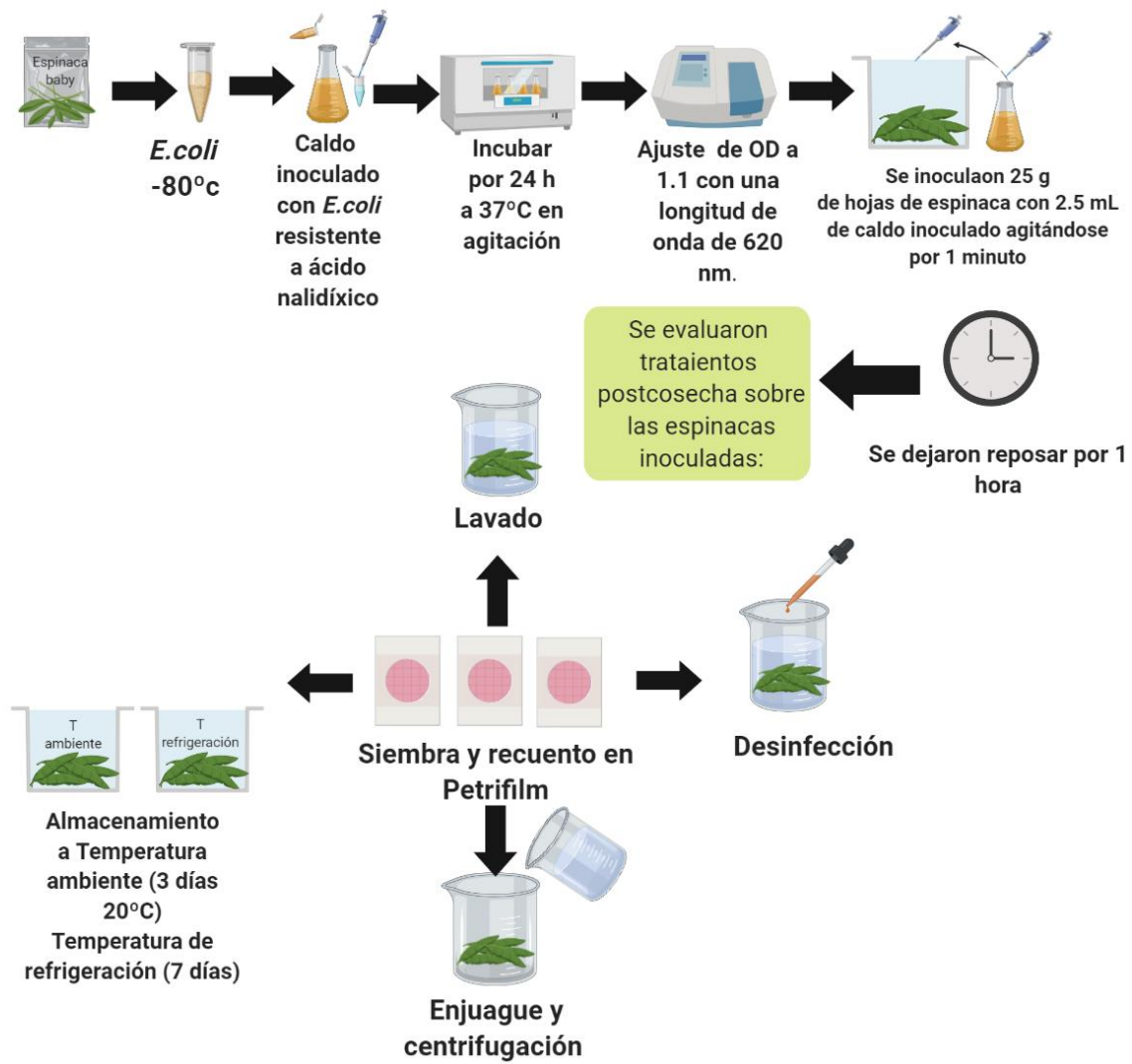


Figura 14. Esquema de la segunda etapa de la metodología

Etapa 2. Evaluación de los tratamientos postcosecha

7.4. Preparación del inóculo

Se realizó el mismo procedimiento mencionado en el punto 7.2 para garantizar una población de 10^7 UFC/mL, se realizó el recuento en medio EMB (Eosina Azul de Metileno).

7.5. Evaluación de los tratamientos postcosecha (lavado, desinfección, enjuague y centrifugado; tabla 8). Se utilizó la metodología propuesta por Neal et al., (2012), previo a la inoculación de las espinacas de la marca “vegeta listos” (figura 15) a las hojas se les aplicó un pretratamiento con hipoclorito de sodio al 5% (5mL/1L de agua). Posteriormente, se inocularon 25 gramos de hojas adicionando 2.5 mililitros de caldo TSB inoculado (10^7 UFC/mL) en una bolsa plástica hermética estéril, se agitaron las espinacas vigorosamente durante un minuto y se dejaron reposando durante una hora a una temperatura aproximada de 22°C para garantizar la adherencia (figura 16).



Figura 15. Espinaca “baby” usada en los tratamientos postcosecha



Figura 16. Reposo de hojas de espinaca “baby” para garantizar adherencia de *E. coli*.

Tabla 8. Descripción de las etapas a las que es sometida la espinaca

Etapas	Descripción
Lavado	Inmersión de hojas de espinaca baby en 1 litro de agua destilada sometida a un flujo turbulento.
Desinfección	Reducción de la carga microbiana de las hojas de espinaca al agregarse algún antimicrobiano ya sea químico o natural.
Enjuague y centrifugación	Eliminación del agente antimicrobiano con agua destilada.
Almacenamiento a temperatura ambiente	Acopio de la espinaca a temperatura ambiente durante tres días.
Almacenamiento a temperatura de refrigeración	Acopio de espinaca a temperatura de refrigeración durante siete días.

7.6 Lavado por inmersión.

Se sumergieron 10 gramos de hojas de espinaca baby previamente inoculadas en un litro de agua destilada esterilizada, en la cual se le provocó un flujo turbulento durante 1 minuto, mediante un agitador magnético (figura 17) (Neal et al., 2012).



Figura 17. Lavado de espinaca “baby” mediante aplicación de flujo turbulento

7.7. Desinfección.

En esta etapa se evaluaron tres tipos de desinfectantes, los cuales dos fueron químicos (dióxido de cloro (ClO_2) y plata coloidal) y uno fue natural (*Salvia officinalis*). Para los desinfectantes químicos uno fue a base de plata coloidal y el otro de tipo industrial. Mientras que el natural correspondió al que presentó el mayor halo de inhibición evaluado en el punto 7.3.

A las hojas provenientes del lavado se les retiró el exceso de agua y fueron sumergidas en la solución desinfectante.

Tabla 9. Tratamientos de desinfección

Tratamiento de desinfección	Preparación de la Solución desinfectante	Tiempo de contacto
1. Plata coloidal	8 gotas en 1 litro de agua	10 minutos
2. Dióxido de cloro (ClO ₂)	2.5 mL en 1 litro de agua	15 minutos
3. Salvia (<i>Salvia officinalis</i>)	300 µL en 1 litro de agua	10 minutos

Las soluciones desinfectantes fueron preparadas de acuerdo con las especificaciones del fabricante a excepción del agente antimicrobiano natural, que fue preparado con forme a las especificaciones del antimicrobiano a base de plata coloidal (tabla 9).

7.8. Enjuague y centrifugado.

Se retiraron las hojas de la solución desinfectante y fueron enjuagadas con agua destilada a chorro por 1 minuto, después se les eliminó el exceso de agua con el uso de una centrifugadora comercial (figura 18).



Figura 18. Eliminación del exceso de agua empleando una centrífuga manual.

7.9. Siembra y recuentos.

Al finalizar cada tratamiento, 10 gramos de las hojas de espinaca fueron puestas en bolsas de plástico estériles y se les añadieron 90 mL de diluyente (peptona de caseína al 1%), fueron homogenizadas en un stomacher durante 1 minuto (figura 19). Pasado ese tiempo, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^9 y la siembra se realizó sobre medio EMB y en placas Petrifilm (figura 20), se incubaron a 37°C durante 24 horas para finalmente realizar los conteos (Neal et al., 2012). Los análisis se realizaron por triplicado en 2 análisis independientes.



Figura 19. Espinaca después de ser sometida a homogenización usando el stomacher.

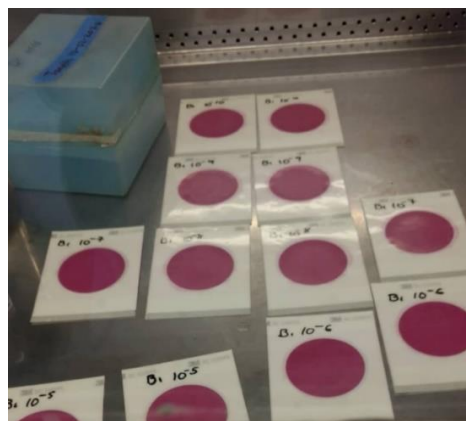


Figura 20. Siembra sobre placas Petrifilm.

7.10. Evaluación de los tratamientos de almacenamiento.

Al completarse los tres tratamientos, las hojas se empaclaron en bolsas Ziploc y se almacenaron a dos temperaturas, a temperatura ambiente durante 3 días y refrigeradas durante 7 días y (figura 21) (Tian et al., 2012). Al concluir con los días de almacenamiento, a las hojas se les realizó el recuento siguiendo el procedimiento descrito en el punto 7.9.



Figura 21. Espinaca embolsada lista para ser llevada a las dos temperaturas de almacenamiento.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bacterias patógenas representan el mayor problema microbiológico en hortalizas de hoja verde frescas y sus ensaladas listas para su consumo (RTE). Los microorganismos con mayor probabilidad de causar brotes, los cuales cada vez se presentan con mayor frecuencia, por el consumo de alimentos contaminados son los entéricos como *Escherichia coli*; esta bacteria además de ser patógena presenta multiresistencia a antibióticos, siendo un problema importante de salud pública (Aruscavage et al., 2006; Iwu et al., 2019).

A nivel nacional, el principal antimicrobiano utilizado en los hogares es el que ocupa plata coloidal como principio activo, el cual tiene reportado ser un eficiente agente desinfectante contra bacterias Gram positivas y Gram negativas como lo es *E. coli*. debido a la generación de oxígeno reactivo y la inducción al estrés oxidativo lo que ocasiona la desactivación de enzimas, alteraciones en la pared y membrana celular así como la desnaturalización de los enlaces disulfuro de las proteínas bacterianas (de Rocío et al., 2017).

El dióxido de cloro es otro antimicrobiano usado ampliamente en la industria de alimentos para la desinfección de hortalizas, de igual manera, se ha demostrado ser efectivo en bacterias como *Escherichia coli*, ya que tiene la capacidad de oxidar proteínas, altera la funcionalidad de la membrana celular, además modifica la acción del ácido nucleico (Noss et al., 1986; Manual, 1999; Zoffoli et al., 2005).

A consecuencia de la creciente actividad multirresistente de bacterias tanto Gram positivas como negativas, se ha optado por buscar distintas alternativas, entre ellas el uso de agentes antimicrobianos naturales como los extractos de *Salvia officinalis*, el cual se ha demostrado su efectividad en *E. coli* gracias debido a que contiene más de 300 componentes, entre los más importantes se encuentra la presencia de altas concentraciones de 1,8-cineol, α -tuyona, alcanfor y salviol. Algunos de los terpenos que posee tienen actividad inhibitoria en el crecimiento de las bacterias. Actualmente no se conocen específicamente el mecanismo de acción de gran parte de antimicrobianos de origen natural, en la salvia se ha encontrado que actúa sobre la membrana celular (Chouhan et al., 2017; Fournomiti et al., 2015 y Ghorbani et al., 2017).

8.1 Evaluación de los Agentes antimicrobianos naturales

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de ruda (*Ruta Graveolens* L.), salvia (*Salvia officinalis*), semilla de mamey (*Pouteria sapota* J.) comparados con el antibiótico ácido nalidíxico (figura 22), sobre *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI). Asimismo, se presenta en la tabla 10, los halos de inhibición de los agentes evaluados.

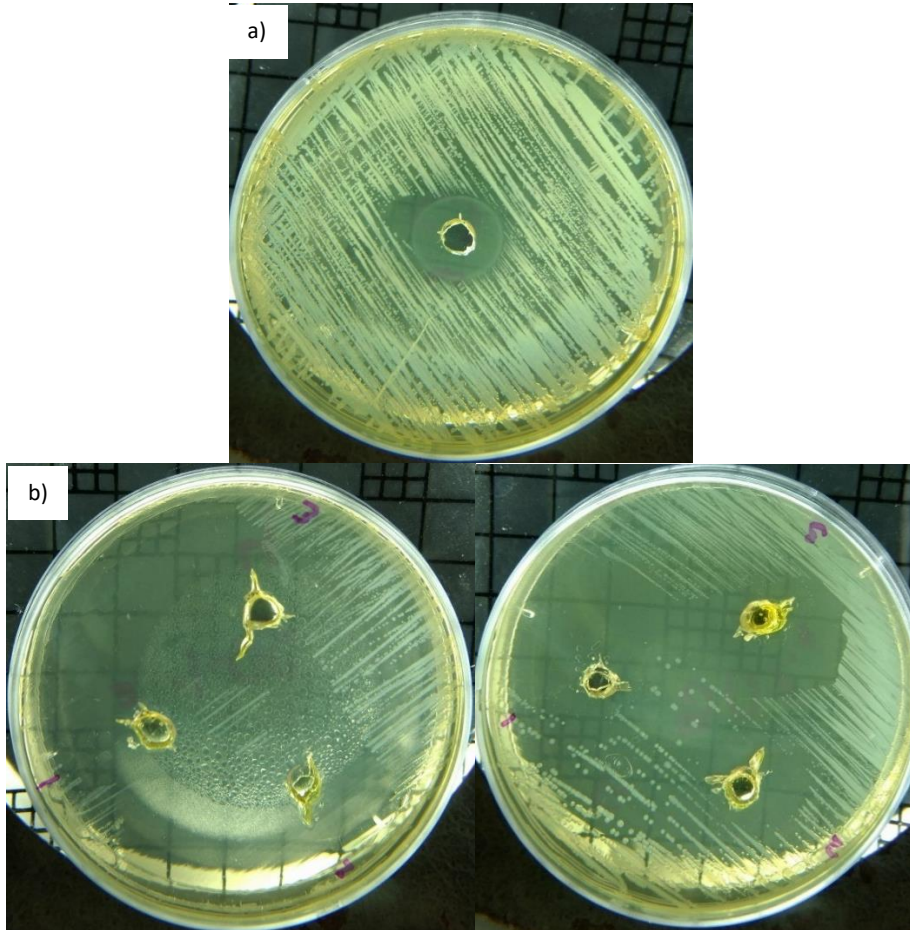




Figura 22. a) Halos de inhibición del antibiótico ácido nalidíxico sobre *Escherichia coli* enteroinvasiva resistente a antibióticos. b) Halos de inhibición de *E. coli* (ECEI) sobre extracto de salvia (*Salvia officinalis*) c) Semilla de mamey con una concentración al 100%

Se puede observar que la salvia fue el único extracto donde se obtuvo inhibición en la concentración de 25%; en comparación con el trabajo de Bozin et al, (2007), la cepa de *Escherichia coli* multirresistente fue evaluada a dos concentraciones de extracto de salvia, de 20 y 50%; la cual presentó un promedio de halos de inhibición de 13.8 mm y 14.2 mm respectivamente; en la presente investigación a concentraciones de 25 y 50% se obtuvo inhibición de 10.16 mm y 14.36 mm, esto puede deberse a la técnica de destilación que se usó en cada trabajo, ya que Bozin et al, (2007), hidrodestilación usando n-hexano como solvente y en esta investigación se empleó destilación por arrastre de vapor.

Asimismo, de acuerdo con Mikulášová et al., (2009) y Mosafa et al (2014) *E. coli* es una de las bacterias Gram negativas con mayor susceptibilidad a los extractos de *S. officinalis* de las hojas y tallos, aunque presenta mayor efecto en extractos obtenidos mediante destilación por arrastre de vapor que los extractos etanólicos, además de mostró que a mayor concentración de extracto es mayor la inhibición. Se comparó también la investigación realizada por Pierozan et al., (2009), el cual empleó el método de difusión con discos con extracto puro de *Salvia officinalis*, obteniendo 7.95 mm de halo de inhibición. En el presente trabajo, como se presenta en la tabla 10, a la concentración de 100%, se obtuvo un halo de inhibición de 14.6 mm, ésta diferencia puede estar

ocasionada debido a que en la investigación de Pierozan et al., (2009) se añadieron 5 μ L en cada disco en el presente trabajo se usaron 30 μ L en cada pozo, asimismo se ha señalado que la variabilidad de los factores ambientales en los cuales se cultivó la *Salvia officinalis*, pueden ocasionar diferencias importantes en la composición fenólica y por ende en sus propiedades antimicrobianas, ya que la salvia recolectada en el mes de Mayo es una fuente rica en fenoles, en comparación con otros meses del año (Generalic et al., 2012).

Se debe resaltar que, que no existen artículos que reporten la inhibición de *E. coli* con extracto de salvia (*Salvia officinalis*) empleando el método de pozos, únicamente se ha encontrado por medio de inhibición mínima inhibitoria como el realizado por Delamare et al., (2007) y Miguel et al., (2011) donde obtuvieron baja sensibilidad de *Escherichia coli*.

La salvia fue la que presentó mayores halos de inhibición en la concentración de 100% en comparación con los otros antimicrobianos, además la concentración se observó diferencia significativa entre los tratamientos (25 y 100%) ($p=0.0158$) y una mayor inhibición en la concentración del 100% (23 mm de halo), sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre las concentraciones de 50 y 75%.

Por otra parte, la inhibición presentada por el uso del extracto de semilla de mamey (*Pouteria sapota* J.) no presentó inhibición en la menor concentración de extracto, aunque si obtuvo tuvo diferencia significativa en las concentraciones del 50 y 75% (tabla 11). Además, no se encontró ninguna investigación que haya evaluado la inhibición de los extractos de *Pouteria sapota Jacq.* por lo que no se pueden comparar los resultados obtenidos con otro trabajo.

Finalmente, los extractos de ruda (*Ruta graveolens* L.) no mostraron inhibición en todas las concentraciones, siendo los extractos de este vegetal los menos efectivos sobre *E. coli*, lo cual podría deberse a que el extracto de la ruda se obtuvo de ruda fresca en lugar de ruda seca en comparación con lo propuesto por Haddouchi et al., (2013) y Orlanda et al. (2015), donde se destila la planta seca, además la eficacia de los extractos también podría deberse a las condiciones climatológicas, geográficas, periodo de cosecha y procedimientos de extracción los cuales podrían

hacer que sus propiedades cambien. También se ha demostrado que la luz tiene un efecto decisivo en la composición del aceite (Haddouchi et al., 2013)

Tabla 10. Halos de inhibición en milímetros obtenidos con diferentes concentraciones de extractos

	Halo de inhibición (mm)			
	Concentraciones de los extractos (%)			
	25	50	75	100
Ruda (<i>Ruta graveolens</i> L)	N/A	N/A	N/A	N/A
Salvia (<i>Salvia officinalis</i>)	10.16 ± 0.8 b	14.36±1.2 ab	15.33±1.5 ab	23±3.14 a
Semilla de mamey (<i>Pouteria sapota</i> J.)	N/A c	10.5± 3.2 b	11.16± 3.7 b	18.83±3.1 a

N/A: No presenta actividad. Las letras minúsculas iguales indican que no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$)

Tabla 11. Porcentaje de inhibición con extractos de ruda, salvia y semilla de mamey sobre *Escherichia coli*.

	Porcentaje de inhibición (%)			
	Concentraciones de los extractos (%)			
	25	50	75	100
Ruda (<i>Ruta graveolens</i> L)	N/A	N/A	N/A	N/A
Salvia (<i>Salvia officinalis</i>)	26.23±1.9 c	37.07±3.0 ab	39.57±3.9 ab	59.35±8.1 a

Semilla de mamey (<i>Pouteria</i> <i>sapota</i> J.)	N/A c	27.15±8.2 b	28.88±9.6 b	48.71±8.0 a
--	-------	-------------	-------------	-------------

N/A: No presenta actividad. Los porcentajes de halo de inhibición se calcularon con los halos de inhibición del antibiótico ácido nalidíxico = 38.75 mm. Las letras minúsculas iguales indican que no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

Al haber una mejor respuesta de inhibición con los extractos de salvia en comparación con los demás agentes antimicrobianos en la concentración del 100% se optó por seleccionar este agente como desinfectante que corresponde a la siguiente etapa de la investigación.

8.2 Tratamientos postcosecha previos a la desinfección

El procesamiento de productos recién cosechados tiene mayor posibilidad a de causar daño a los tejidos vegetales reduciendo su vida útil (Oliveira et al., 2010). En este trabajo a las hojas de espinaca antes de someterlas a cualquier tratamiento se les realizó un pretratamiento con hipoclorito de sodio con tiempo de contacto de 15 minutos en un litro de agua destilada para garantizar que no hubiera crecimiento de *E. coli* en el tejido vegetal.

A partir de las hojas inoculadas con *E. coli* (Log_{10} 8 UFC/mL) y sometidas al tratamiento de lavado, se obtuvieron los siguientes resultados, 6.81 ± 0.1 UFC/g, 7.63 ± 1.2 Log_{10} UFC/g y 7.22 ± 0.4 Log_{10} UFC/g para los lotes 1, 2 y 3, respectivamente (tabla 12), lo que indica que el lavado no es suficiente para reducir la carga microbiana de *E. coli*, por lo que se recomienda acompañar a este tratamiento con otras operaciones postcosecha. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wendel et al., (2009) y Poimenidou et al., (2016) que indican que no se logran reducciones significativas después del lavado de las hojas de los vegetales verdes, lo que hace que este tratamiento no disminuya el riesgo de contraer una ETA al ser consumidos.

Tabla 12. Recuentos y reducciones logarítmicas del lavado del control inoculado y de los tres lotes de espinaca baby

	Recuentos Log ₁₀ UFC/g	Reducciones Log ₁₀ UFC/g
Control (S/L)	10.5	0
Lote 1 (DPC)	6.81± 0.1 a	1.21±0.1 a
Lote 2 (DD)	7.63±1.2 a	0.43±0.1 b
Lote 3 (DS)	7.22±0.4 a	0.87±0.8 a

S/L. control sin ser sometido a lavado; DPC hojas de espinaca que después del lavado serán sometidas a desinfectante a base de plata coloidal; DD, hojas de espinaca que después del lavado serán sometidas a desinfectante dióxido de cloro; DS, hojas de espinaca que después del lavado serán sometidas a desinfección por salvia.

De acuerdo con Gómez et al., (2013) el lavado es una etapa a la cual se le debe prestar mucha atención debido a que pueden llegar a internalizarse los microorganismos patógenos especialmente de *E. coli* y *Salmonella* haciendo que sea más complicada su eliminación.

8.3 Tratamientos de desinfección, enjuague y centrifugación

En la figura 23 se puede observar que en el control inoculado (lote que no recibió ningún tratamiento) se tuvieron recuentos de 10.56 Log₁₀ UFC/g. Asimismo, se observó diferencia altamente significativa en los recuentos (P=0.001) dependiendo del agente desinfectante utilizado. El lote 3, el cual corresponde a las hojas desinfectadas con el antimicrobiano natural de *Salvia officinalis* tuvo los recuentos más bajos en las etapas de desinfección, enjuague y centrifugación (0.81 Log₁₀ UFC/g), pudo comprobarse el efecto inhibitorio de la salvia en el crecimiento de *Escherichia coli*, en una matriz alimentaria, no fueron encontrados trabajos similares para realizar la comparación con lo obtenido en el presente trabajo.

En relación con los productos del lote 1, sometidos al desinfectante a base de plata coloidal en la etapa de desinfección tuvieron recuentos con valores de 7.88 Log₁₀ UFC/g y finalmente la espinaca probada con el lote 2, desinfectante de dióxido de cloro, presentaron recuentos de 7.71 Log₁₀ UFC/g, lo que indica que los agentes químicos de desinfección comerciales no redujeron de manera

importante el crecimiento de *Escherichia coli* en espinaca, ni presentaron diferencias significativas entre ambos lotes ($p \geq 0.05$) (Tabla 13).

Los resultados obtenidos con el lote 1, donde se aplicó desinfectante a base de plata coloidal coinciden con los resultados presentados por Rangel et al., (2017) quienes demuestran que esta solución tiene un efecto muy limitado para la reducción de bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos en verduras de hoja verde como en el caso de la espinaca baby. De la misma manera ocurre con el dióxido de cloro, de acuerdo con Tomás et al., (2012), reportaron reducciones $< 1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ después de ser tratadas con esta solución y en este trabajo se obtuvieron reducciones de 0.37 ± 0.04 (tabla 13)

El efecto significativo que mostraron con los desinfectantes comerciales sobre verduras de hoja verde como la espinaca, pueden atribuirse a la capacidad que tienen ciertos patógenos como *E. coli* en la formación de biopelículas, la fuerte adhesión a las hojas y a la presencia de poblaciones internalizadas. Sin embargo. Chen et al (2013) describe que el dióxido de cloro es un desinfectante eficaz en verduras de hoja verde como las acelgas, no obstante, eso no concuerda con lo obtenido en este trabajo, estas variaciones pueden estar relacionadas con la carga inicial del inóculo, concentración de los desinfectantes, condiciones de lavado y desinfección (Barrera et al., 2012 y Tomás et al., 2012).

Además no se encontraron diferencias significativas tanto en los recuentos como en las reducciones logarítmicas entre el lote 1 y el 2 después de recibir los tratamientos de desinfección, enjuague y centrifugación (Figura 22).

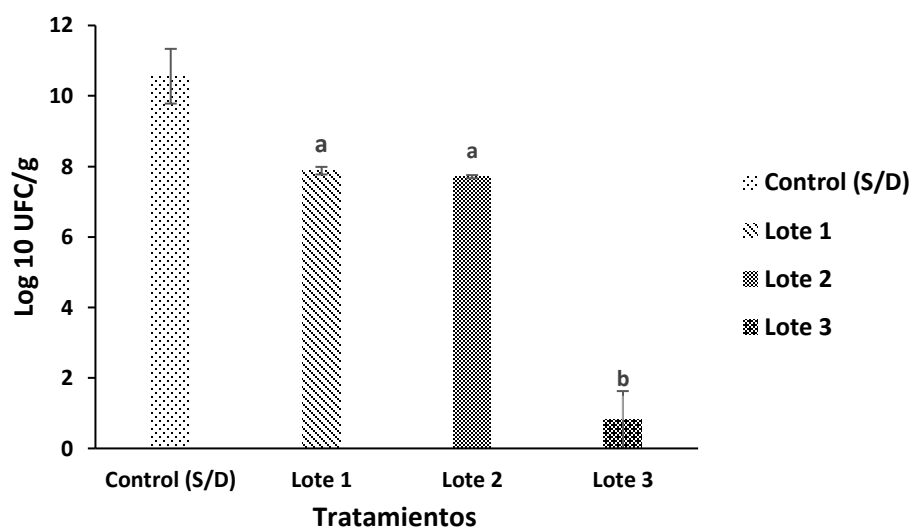


Figura 23. Comparación de los tres desinfectantes en las diferentes etapas postcosecha de espinaca baby considerando tres tratamientos de desinfección.

Se consideró un inóculo inicial de 8.09 Log₁₀ UFC/ g de *Escherichia coli* (ECEI) con un número de replicas n=3. Las letras minúsculas iguales indican que no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos (p≤ 0.05)

Tabla 13. Reducciones logarítmicas de *E. coli* en hojas de espinaca baby inoculadas sometidas a los tratamientos de desinfección, enjuague y centrifugación

Muestras	Reducciones logarítmicas (UFC/g)
Control (S/T)	0
Lote 1	0.21± 0.1 b
Lote 2	0.37± 0.0 b
Lote 3	6.86± 0.4 a

Se consideró un inóculo inicial de 8.09 Log₁₀ UFC/ g de *Escherichia coli* (ECEI) con un número de replicas n=3. Tabla 1. Reducciones logarítmicas del lavado del control inoculado y de los tres lotes de espinaca baby. Las letras minúsculas iguales indican que no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos (p≤ 0.05).

Condiciones de almacenamiento

El tratamiento de almacenamiento a temperatura ambiente se almacenó durante 3 días a una temperatura aproximada de 22°C ± 4°C, en la figura 24 se aprecia un incremento en el crecimiento

de *E. coli* sobre las hojas de espinaca, el cual es más notable en el lote 2, el cual fue correspondiente a un producto sometido a desinfección con dióxido de cloro, teniendo un resultado de 10.56 Log₁₀ UFC/g. Los datos mencionados se relacionan con los obtenidos por Ngnitcho et al., (2017), donde a partir del tercer día de almacenamiento a temperatura ambiente los niveles de los recuentos de *Escherichia coli* comenzaron a ser inaceptables a pesar de haber pasado por la etapa de desinfección. Las condiciones de almacenamiento principalmente la temperatura presenta un papel sumamente importante en la conservación de hortalizas mínimamente procesadas, debido a que un incremento en este parámetro disminuye su vida útil de producto. De acuerdo con Patel et al., (2011) al inocularse *E. coli* sobre hojas de espinaca, el patógeno requiere entre 24 y 48 horas cuando crece a temperatura ambiente (temperatura aproximada de 22°C), de forma significativa lo que también concuerda con los resultados obtenidos.

Los recuentos en la etapa de almacenamiento a temperatura de refrigeración, en donde se almacenaron las muestras a 7°C por 7 días, se puede observar que se obtuvieron recuentos muy similares entre los lotes 1 y 2 (Figura 24), siendo esta última el que tuvo mayores recuentos (5.89 Log₁₀ UFC/g), sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados son similares a los obtenidos por López et al., (2011) que resaltan que las espinacas envasadas al someterse a condiciones de refrigeración disminuyen la riqueza, diversidad y uniformidad de la microbiota bacteriana. Esta tendencia se observó en este estudio con la reducción del crecimiento de *E. coli*.

El lote 3 de hojas de espinaca sometidas a la desinfección con la salvia se obtuvieron recuentos mínimos o nulos de *E. coli*, mostrando con efecto altamente significativo de la interacción del agente desinfectante y la condición de almacenamiento (Figura 24), en comparación con los demás lotes. Cabe mencionar que las hojas de espinaca desinfectadas mostraron condiciones organolépticas mejores dando un aspecto de más conservadas junto con un aroma agradable característico del extracto de *Salvia officinalis*.

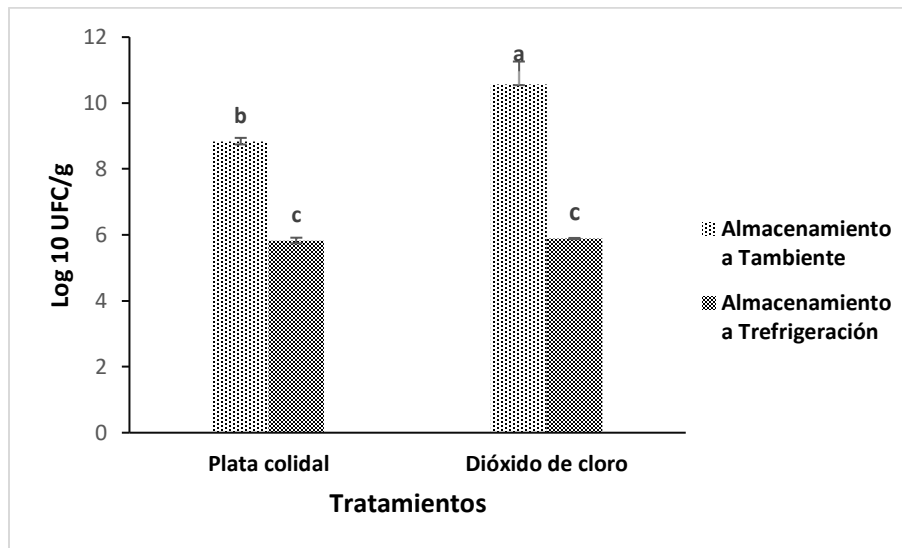


Figura 24. Comparación de los tratamientos de almacenamiento a temperatura ambiente y de refrigeración de los tres desinfectantes

Número de replicas n=3, Las letras minúsculas iguales indican que no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$)

En la tabla 14, puede notar que la temperatura de almacenamiento influye en el crecimiento de *E. coli*, ya que hay diferencia en las reducciones entre las dos temperaturas, con valores entre 1.69 y 2.26 Log₁₀ UFC/ g para los lotes 1 y 2, así mismo, se confirma que la eficacia del tratamiento de desinfección se ve favorecida al combinarse temperaturas cercanas a la refrigeración.

Tabla 14. Reducciones logarítmicas de *E. coli* en hojas de espinaca inoculadas sometidas a los tratamientos de almacenamiento a temperatura ambiente (22°C durante 3 días) y a temperatura de refrigeración (7°C por 7 días).

Desinfectante	Almacenamiento 3 días (T 22°C)	Almacenamiento 7 días
Plata coloidal	0 d	2.26 ±0.0 b
Dióxido de cloro	0 d	1.69 ±0.1 c
Salvia officinalis	8.09 a	8.09 ±0 a

n=3. Inóculo inicial 8.09 log₁₀ UFC/g.

Las letras minúsculas iguales indican que no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

El lote 3, que corresponde al antimicrobiano natural redujo notablemente la población de *Escherichia coli* (ECEI) para ambas temperaturas de almacenamiento por lo que este antimicrobiano es una buena alternativa para utilizarse como agente antimicrobiano en microorganismos como *Escherichia coli* que pueden crecer y sobrevivir en distintos vegetales, como lo es la espinaca.

IX. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

De acuerdo con los resultados obtenidos y los objetivos propuestos en esta investigación se proponen las siguientes conclusiones y algunas sugerencias relacionadas con la continuación del trabajo de investigación:

- Se determinó que *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECEI) inoculada en espinaca “baby” presentó la capacidad de sobrevivir a las distintas etapas postcosecha simuladas en los experimentos realizados en el laboratorio.
- Los antimicrobianos de extractos naturales presentan una respuesta favorable a la inhibición y reducción del crecimiento de *E. coli*, la mayor actividad la presentó el extracto de *Salvia officinalis* en una concentración del 100%.
- Las hojas de espinaca inoculadas sometidas al tratamiento de lavado presentaron recuentos altos, lo que lo hace ineficiente esta operación postcosecha para la reducción de *E. coli* al obtenerse recuentos de entre 6.81 a 7.63 Log₁₀ UFC/g, por lo que se sugiere emplear otros tratamientos que puedan ayudar a la reducción de este patógeno.
- En los tratamientos de desinfección, enjuague y centrifugación de las hojas de espinaca al aplicarse distintos antimicrobianos se puede ver una diferencia significativa en la disminución de los recuentos de *E. coli*, al emplearse el antimicrobiano de origen natural, ya que tuvo una disminución de 6.86 ± 0.4 y una diferencia significativa en comparación con los otros dos agentes antimicrobianos a pesar de agregar una mínima cantidad de antimicrobiano en un litro de agua.
- En el almacenamiento se concluye que la temperatura de almacenamiento juega un papel determinante para la conservación de la espinaca y en el crecimiento del patógeno, ya que a temperatura ambiente incrementaron los recuentos más que 1 logaritmo, a diferencia de la temperatura de refrigeración de además de retardar el crecimiento de los microorganismos, ayudó a conservar mejor la espinaca.
- Al emplearse la salvia como desinfectante y luego someter las hojas a almacenamientos a distintas temperaturas se observó que aun estando a una temperatura ambiente, las hojas

de espinaca no presentaron deterioro en relación con el olor del producto, a diferencia de las otras espinacas sometidas con los otros antimicrobianos.

- Finalmente, se demostró las reducciones logarítmicas significativas se alcanzaron las hojas sometidas a una desinfección con extractos al 100 % de salvia y con ambas temperaturas de almacenamiento.
- Los extractos de salvia (*Salvia officinalis*) son un producto GRAS el cual es considerado seguro y apto para el consumo humano por la FDA, por lo que es una buena alternativa como antimicrobiano.
- Se sugiere continuar estudiando los extractos de salvia como una alternativa de desinfección en superficies que pudiesen estar en contacto con el producto en los empaques de hortalizas.
- También resulta interesante evaluar su actividad antimicrobiana pero durante las operaciones precosecha empleándolo en el agua de riego.
- Además es atractivo valorar su eficiencia antimicrobiana durante la cosecha como desinfectante de superficies en las herramientas.
- Se sugiere su aplicación en otros vegetales que también se consumen crudos y están implicados en brotes de ETAS por su consumo como lechuga, cilantro o jitomate.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abu Al-Qumboz, M. N., & Abu-Naser, S. S. (2019). Spinach Expert System: Diseases and Symptoms. *International Journal of Academic Information Systems Research (IJASIR)*, 3(3), 16-22.

Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of food microbiology*, 80(3), 223-230.

Ariffin, S. H., Gkatzionis, K., & Bakalis, S. (2017). Leaf injury and its effect towards shelf-life and quality of ready-to-eat (RTE) spinach. *Energy Procedia*, 123, 105-112.

Aruscavage, D., Lee, K., Miller, S., & LeJeune, J. T. (2006). Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of food science*, 71(8), R89-R99.

Azimirad, M., Nadalian, B., Alavifard, H., Panirani, S. N., Bonab, S. M. V., Azimirad, F., ... & Zali, M. R. (2021). Microbiological survey and occurrence of bacterial foodborne pathogens in raw and ready-to-eat green leafy vegetables marketed in Tehran, Iran. *International journal of hygiene and environmental health*, 237, 113824.

Balandin, G. V., Suvorov, O. A., Shaburova, L. N., Podkopaev, D. O., Frolova, Y. V., & Ermolaeva, G. A. (2015). The study of the antimicrobial activity of colloidal solutions of silver nanoparticles prepared using food stabilizers. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3881-3886.

Barrera, M. J., Blenkinsop, R., & Warriner, K. (2012). The effect of different processing parameters on the efficacy of commercial post-harvest washing of minimally processed spinach and shredded lettuce. *Food Control*, 25(2), 745-751.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology*, 12(9), 2385-2397.

Bergquist, S. Å., Gertsson, U. E., Knuthsen, P., & Olsson, M. E. (2005). Flavonoids in baby spinach (*Spinacia oleracea* L.): changes during plant growth and storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24), 9459-9464.

Bonelli, R. R., Moreira, B. M., & Picão, R. C. (2014). Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, 17(1-2), 24-36.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(19), 7879-7885

Cavero Olguin, V. H. (2020). Dióxido de cloro, los milagros no existen. *Revista CON-CIENCIA*, 8(1), 79-98.

Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). (1998). Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables. -, de FDA Sitio web: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-fruits-and-vegetables?fbclid=IwAR2rG7ojrgtsLfq6Bmxu4aTmXdmM_Eeb7D6yVAVmHsnLml2IKTpS2sZH3ZY

Centers of Disease Control and Prevention. (2006). Multistate Outbreak of E. coli O157:H7 Infections Linked to Fresh Spinach (FINAL UPDATE). USA government Sitio web: <https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>

Centers of Disease Control and Prevention. (2012). Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing Escherichia coli O157:H7 Infections Linked to Organic Spinach and Spring Mix Blend (Final Update). USA government Sitio web: <https://www.cdc.gov/ecoli/2012/O157H7-11-12/index.html>

Centers of Disease Control and Prevention. (2020). Outbreak of E. coli Infections Linked to Leafy Greens. ., de USA government Sitio web: <https://www.cdc.gov/ecoli/2020/o157h7-10-20b/index.html>

Chen, X. N., Li, B. J., Meng, L. C., & Fan, S. X. (2013). Research progress in preservation of postharvest leafy vegetables. In *Advanced Materials Research* (Vol. 749, pp. 401-407). Trans Tech Publications Ltd

Choi, S., Bang, J., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. (2011). Survival and colonization of *Escherichia coli* O157: H7 on spinach leaves as affected by inoculum level and carrier, temperature, and relative humidity. *Journal of applied microbiology*, 111(6), 1465-1472.

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.

Critzer, F. J., & Doyle, M. P. (2010). Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current opinion in biotechnology*, 21(2), 125-130

CEDRSSA. (2020). Análisis de la producción y consumo de hortalizas. De Cámara de diputados Sitio web:

http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/88Ana%CC%81lisis_produccio%CC%81n_consumo_hortalizas.pdf

Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food chemistry*, 100(2), 603-608

Del Rocío Coutiño, E. M., Lagunes, L. Á., & Helguera, O. A. (2017). Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2), 39-54.

Edris, A. E., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Stoyanova, A., & Slavchev, A. (2007). Chemical composition, antimicrobial activities and olfactive evaluation of a *Salvia officinalis* L.(sage) essential oil from Egypt. *Journal of Essential Oil Research*, 19(2), 186-189.

Elhariry, H. M. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiology*, 28(7), 1266-1274.

Elizaquível, P., Sánchez, G., & Aznar, R. (2012). Quantitative detection of viable foodborne E. coli O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25(2), 704-708.

Elviss, N. C., Little, C. L., Hucklesby, L., Sagoo, S., Surman-Lee, S., De Pinna, E., & Threlfall, E. J. (2009). Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International journal of food microbiology*, 134(1-2), 83-88.

EPA. (2021). Revised Total Coliform Rule And Total Coliform Rule. -, de United States Environmental Protection Agency Sitio web: <https://www.epa.gov/dwreginfo/revised-total-coliform-rule-and-total-coliform-rule>

Erickson, M. C., Webb, C. C., Diaz-Perez, J. C., Phatak, S. C., Silvoy, J. J., Davey, L., ... & Doyle, M. P. (2010). Surface and internalized *Escherichia coli* O157: H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water. *Journal of food protection*, 73(6), 1023-1029.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific Bangkok. (2012). Good practice in the design, management and operation on a fresh produce packinghouse. de FAO Sitio web: <http://www.fao.org/3/i2678e/i2678e00.pdf>

Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., Papaemmanouil, V., ... & Alexopoulos, A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial ecology in health and disease*, 26(1), 23289.

García-Gómez, R., Chávez-Espinosa, J., Mejía-Chávez, A., & Durán-de-Bazúa, C. (2002). Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Revista latinoamericana de microbiología*, 44(1), 24-30.

Generalčić, I., Skroza, D., Šurjak, J., Možina, S. S., Ljubenković, I., Katalinić, A., ... & Katalinić, V. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & biodiversity*, 9(2), 441-457.

Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 433-440.

Gil, M. I., Selma, M. V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., & Allende, A. (2015). Pre-and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(4), 453-468.

Gómez-López, V. M., Marín, A., Allende, A., Beuchat, L. R., & Gil, M. I. (2013). Postharvest handling conditions affect internalization of Salmonella in baby spinach during washing. *Journal of Food protection*, 76(7), 1145-1151

Grant, J., Wendelboe, A. M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C., & Rolfs, R. T. (2008). Spinach-associated Escherichia coli O157: H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerging infectious diseases*, 14(10), 1633.

Guo, X., Chen, J., Brackett, R. E., & Beuchat, L. R. (2002). Survival of Salmonella on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil. *Journal of food protection*, 65(2), 274-279.

Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., & Benmansour, A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria. *Food chemistry*, 141(1), 253-258.

Hussain, M. A., & Dawson, C. O. (2013). Economic impact of food safety outbreaks on food businesses. *Foods*, 2(4), 585-589.

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.

Jiang, X., Islam, M., Morgan, J., & Doyle, M. P. (2004). Fate of *Listeria monocytogenes* in bovine manure-amended soil. *Journal of food protection*, 67(8), 1676-1681.

Joshi K., Mahendran R., Alagusundaram K., Norton T., Tiwari B.K. 2013. Novel disinfectants for fresh produce. *Trends in Food Science & Technology* 34:54-61

Kilickan, A., Üçer, N., & Yalçın, I. (2010). Some physical properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) seed. *African Journal of Biotechnology*, 9(5).

Klockow, P. A., & Keener, K. M. (2009). Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1047-1053.

Klonsky, K. (2006). E. coli in spinach, foodborne illnesses, and expectations about food safety. *Agricultural and Resources Economics Update. Gianni Foundation of Agricultural Economics, University of California*, 10(2), 1-4.

Lang, N. L., & Smith, S. R. (2007). Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *Journal of applied microbiology*, 103(6), 2122-2131.

Liu, C., Hofstra, N., & 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(2-3), 119-128

Lopez-Velasco, G., Welbaum, G. E., Boyer, R. R., Mane, S. P., & Ponder, M. A. (2011). Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1203-1214.

Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M., Martínez de la Peña, C., Silva, J. L., & Luna-Guevara, M. L. (2019). The role of pathogenic *E. coli* in fresh vegetables: Behavior, contamination factors, and preventive measures. *International journal of microbiology*, 2019.

Manual, EPA Guidance (1999). Alternative disinfectants and oxidants. Disinfectant use in water treatment, Washington DC.

Marhuenda, J., García, J. (2015). 12. Cultivos agrícolas al aire libre. CAJAMAR CAJA RURAL (289-301). España: Serie Agricultura.

Mayton, H. M., Marcus, I. M., & Walker, S. L. (2019). *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* adhesion to spinach leaf surfaces: Sensitivity to water chemistry and nutrient availability. *Food microbiology*, 78, 134-142.

Mikulášová, M. Á. R. I. A., & Vaverková, Š. T. E. F. Á. N. I. A. (2009). Antimicrobial effects of essential oils from *Tanacetum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L., growing in Slovakia. *Nova Biotechnologica*, 9(2), 161-166.

Morelock, T. E., & Correll, J. C. (2008). Spinach. In *Vegetables I* (pp. 189-218). Springer, New York, NY.

Mosafa, E., Yahyaabadi, S., & Doudi, M. (2014). In-vitro antibacterial properties of sage (*Salvia officinalis*) ethanol extract against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(10), 42-46.

Neal, J. A., Marquez-Gonzalez, M., Cabrera-Diaz, E., Lucia, L. M., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., ... & Castillo, A. (2012). Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Food Research International*, 45(2), 1123-1128.

Ngnitcho, P. F. K., Khan, I., Tango, C. N., Hussain, M. S., & Oh, D. H. (2017). Inactivation of bacterial pathogens on lettuce, sprouts, and spinach using hurdle technology. *Innovative food science & emerging technologies*, 43, 68-76

Oliveira, M., Usall, J., Solsona, C., Alegre, I., Viñas, I., & Abadias, M. (2010). Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded 'Romaine' lettuce. *Food Microbiology*, 27(3), 375-380.

Orlanda, J. F., & Nascimento, A. R. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L.(Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African Journal of Botany*, 99, 103-106.

Patel, J., Millner, P., Nou, X., & Sharma, M. (2010). Persistence of enterohaemorrhagic and nonpathogenic *E. coli* on spinach leaves and in rhizosphere soil. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1789-1796.

Patel, J., Sharma, M., Millner, P., Calaway, T., & Singh, M. (2011). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 attached to spinach harvester blade using bacteriophage. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), 541-546

Perez-Marin, D., Torres, I., Entrenas, J. A., Vega, M., & Sánchez, M. T. (2019). Pre-harvest screening on-vine of spinach quality and safety using NIRS technology. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 207, 242-250.

Pierozan, M. K., Pauletti, G. F., Rota, L., Santos, A. C. A. D., Lerin, L. A., Di Luccio, M., ... & Oliveira, J. V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Food Science and Technology*, 29, 764-770.

Poimenidou, S. V., Bikouli, V. C., Gardeli, C., Mitsi, C., Tarantilis, P. A., Nychas, G. J., & Skandamis, P. N. (2016). Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157: H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. *International journal of food microbiology*, 220, 6-18

Produce Safety Rule (2017). Módulo 3. En Curso de capacitación para productores. USA: Produce Safety Alliance.

Ramaiyan, B. et al. (2020). 8. Spinach (*Spinacia oleracea* L.). In *Antioxidants in Vegetables and Nuts - Properties and Health Benefits* (159-173). Singapore: Springer Nature.

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.

Ribera, A., Bai, Y., Wolters, A. M. A., van Treuren, R., & Kik, C. (2020). A review on the genetic resources, domestication, and breeding history of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Euphytica*, 216(3), 1-21.

Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., & López-Orbegoso, J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(1), 45-48.

Roberts, J. L., & Moreau, R. (2016). Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food & function*, 7(8), 3337-3353.

Rodríguez, M., Zapata, M. E., Solano, M. A., Lozano, D., Torrico, F., & Torrico, M. C. (2015). Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. *Gaceta Médica Boliviana*, 38(2), 31-36.

Saldaña, Z., Sánchez, E., Xicohtencatl-Cortes, J., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2011). Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in microbiology*, 2, 119

Salgado, D. C., & Vallejos, N. G. (2015). Diagnóstico de indicadores entéricos en cilantro (*Coriandrum sativum*) y perejil (*Petroselinum sativum*) que se expenden en mercados populares del norte de la ciudad de Quito. *Enfoque UTE*, 6(1), 45-54.

Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7(1), 153-170.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2016). Mitos y realidades de la espinaca. 17/07/21, de Gobierno de México Sitio web: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/mitos-y-realidades-de-la-espinaca>

Secretaría de salud. (2015). Plata coloidal, características, peligros y aplicación. 30/07/21, de Gobierno de México Sitio web: <https://www.gob.mx/salud/articulos/plata-coloidal-caracteristicas-peligros-y-aplicacion?idiom=es>

Sehnal, K., Hosnedlova, B., Docekalova, M., Stankova, M., Uhlirova, D., Tothova, Z., ... & Kizek, R. (2019). An assessment of the effect of green synthesized silver nanoparticles using sage leaves (*Salvia officinalis* L.) on germinated plants of maize (*Zea mays* L.). *Nanomaterials*, 9(11), 1550.

SIAP. (2019). Espinaca. Secretaria de Agricultura y Desarrollo rural Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/501233/Espinaca_compressed.pdf

Sinha, N. K., Hui, Y. H., Evranuz, E. Ö., Siddiq, M., & Ahmed, J. (2010). *Handbook of vegetables and vegetable processing*. John Wiley & Sons.

Soto Beltran, M., Jimenez Edeza, M., Viera, C., Martinez, C. I., & Chaidez, C. (2013). Sanitizing alternatives for *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* on bell peppers at household kitchens. *International journal of environmental health research*, 23(4), 331-341.

Sousa Oliveira, M. P. D. (2015). Microbial safety of lettuce: foodborne pathogens incidence, their pathogenic potential and biopreservative strategies (Doctoral dissertation, Universitat de Lleida).

Steele, M., & Odumeru, J. (2004). Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of food protection*, 67(12), 2839-2849.

Taban, B. M., & Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens?. *Anaerobe*, 17(6), 286-287

Tian, J. Q., Bae, Y. M., Choi, N. Y., Kang, D. H., Heu, S., & Lee, S. Y. (2012). Survival and growth of foodborne pathogens in minimally processed vegetables at 4 and 15 C. *Journal of food science*, 77(1), M48-M50.

Tomás-Callejas, A., López-Gálvez, F., Sbodio, A., Artés, F., Artés-Hernández, F., & Suslow, T. V. (2012). Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* cross-contamination on fresh-cut Red Chard. *Food Control*, 23(2), 325-332

van Veen, J. A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 121-135.

Villanueva Tapia, M. C. (2010). Uso de dióxido de cloro y su comparación con el hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección del acondicionamiento de carnes de exportación.

Wadamori, Y., Gooneratne, R., & Hussain, M. A. (2017). Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1396-1403.

Walia, S., Rana, S. W., Maue, D., Rana, J., Kumar, A., & Walia, S. K. (2013). Prevalence of multiple antibiotic-resistant Gram-negative bacteria on bagged, ready-to-eat baby spinach. *International journal of environmental health research*, 23(2), 108-118.

Wendel, A. M., Johnson, D. H., Sharapov, U., Grant, J., Archer, J. R., Monson, T., ... & Davis, J. P. (2009). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August–September 2006: the Wisconsin investigation. *Clinical infectious diseases*, 48(8), 1079-1086.

Xanthopoulos, V., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2010). Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. *Food Control*, 21(4), 393-398.

Zhang, G., Ma, L., Beuchat, L. R., Erickson, M. C., Phelan, V. H., & Doyle, M. P. (2009). Lack of internalization of *Escherichia coli* O157: H7 in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after leaf surface and soil inoculation. *Journal of food protection*, 72(10), 2028-2037.