

GUÍA PARA EL MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DE PROCESO Y SUPERFICIES DE CONTACTO EN EMPACADORAS DE MANGO PARA EXPORTACIÓN



Jorge A. OSUNA-GARCÍA. INIFAP-C.E. Santiago Ixcuintla
Samuel SALAZAR-GARCÍA. INIFAP-C.E. Santiago Ixcuintla
Gilles DOYON. Agriculture and Agri-Food, Canada
Yolanda NOLASCO-GONZÁLEZ. INIFAP-C.E. Santiago Ixcuintla
Ricardo GOENAGA. Tropical Agriculture Research Station. Puerto Rico, USA

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y
PECUARIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL DEL PACÍFICO CENTRO
CAMPO EXPERIMENTAL SANTIAGO IXCUINTLA

Folleto Técnico No. 1

Santiago Ixcuintla, Nayarit.

Abril de 2010

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

ING. FRANCISCO JAVIER MAYORGA CASTAÑEDA

Secretario

ING. FRANCISCO LÓPEZ TOSTADO

Subsecretario de Agricultura

ING. ANTONIO RUIZ GARCÍA

Subsecretario de Desarrollo Rural

LIC. JEFFREY MAX JONES JONES

Subsecretario de Fomento a los Agronegocios

ING. JOSÉ LUIS LÓPEZ DÍAZ BARRIGA

Oficial Mayor

ING. CARLOS CARRILLO SANTANA

Delegado de la SAGARPA en Nayarit

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. PEDRO BRAJCICH GALLEGOS

Director en Jefe

DR. SALVADOR FERNÁNDEZ RIVERA

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M.Sc.. ARTURO CRUZ VÁZQUEZ

Encargado del Despacho de la Coordinación de Planeación y Desarrollo

LIC. MARCIAL A. GARCÍA MORTEO

Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL PACÍFICO CENTRO

DR. KEIR FRANCISCO. BYERLY MURPHY

Director Regional

DR. GERARDO SALAZAR GUTIÉRREZ

Director de Investigación

M.C. PRIMITIVO DÍAZ MADEROS

Director de Planeación y Desarrollo

LIC. MIGUEL MÉNDEZ GONZÁLEZ

Director de Administración

M.C. LUIS ENRIQUE FREGOSO TIRADO

Director de Coordinación y Vinculación en Nayarit
y Jefe del Campo Experimental Santiago Ixcuintla

DIRECTORIO DEL CAMPO EXPERIMENTAL SANTIAGO IXCUINTLA

M.C. LUIS ENRIQUE FREGOSO TIRADO
DIRECTOR ESTATAL Y JEFE DE CAMPO

M.C. FELICIANO GERARDO BALDERAS PALACIOS
COCOTERO Y HORTALIZAS

M.C. JORGE ARMANDO BONILLA CÁRDENAS
BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE Y EN OVINOS

M.C. AURELIO BORRAYO ZEPEDA
BOVINOS CARNE

M.C. JOSE DE JESÚS BUSTAMANTE GUERRERO
NUTRICIÓN ANIMAL-RUMIANTES

M.C. JESÚS ALBERTO CÁRDENAS SÁNCHEZ
OVINOS Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA PECUARIA

DR. LUIS EDUARDO COSSIO VARGAS
FRUTALES TROPICALES Y SUBTROPICALES

DR. RAFAEL GÓMEZ JAIMES
SANIDAD VEGETAL

M.C. IRMA JULIETA GONZÁLEZ ACUÑA
REALIZA ESTUDIOS DE POSGRADO

Ph. D. ISIDRO JOSE LUÍS GONZÁLEZ DURÁN
MODELOS DE SIMULACIÓN Y MONITOREO AGROCLIMÁTICO

M.C. CARLOS GONZÁLEZ RIVAS
FRIJOL Y HORTALIZAS

DR. LUIS MARTÍN HERNÁNDEZ FUENTES
ENTOMOLOGÍA AGRÍCOLA

Ph. D. FILIBERTO HERRERA CEDANO
PASTIZALES Y RECURSOS FORRAJEROS

ING. JAIME GUSTAVO LÓPEZ ARRIAGA
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

Ph. D. GUILLERMO MARTÍNEZ VELÁZQUEZ
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE BOVINOS CARNE

ING. LEOCADIO MENA HERNÁNDEZ
PRODUCCIÓN DE SEMILLA FRIJOL

ING. YOLANDA NOLASCO GONZÁLEZ
INOCUIDAD DE FRUTALES Y HORTALIZAS

M.V.Z. JUAN ANTONIO OCHOA RICARDEZ
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE BOVINOS CARNE

Ph. D. JORGE ALBERTO OSUNA GARCÍA
POSTCOSECHA E INOCUIDAD

M.C. JOSÉ ANTONIO PALACIOS FRÁNCQUEZ
BOVINOS PRODUCTORES DE CARNE

M.C. MARÍA HILDA PÉREZ BARRAZA
FRUTALES TROPICALES

ING. RAÚL PLASCENCIA JIMÉNEZ
RECURSOS GENÉTICOS PECUARIOS

M.C. J. VIDAL RUBIO CEJA
NUTRICIÓN DE RUMIANTES EN PASTOREO Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

Ph. D. SAMUEL SALAZAR GARCÍA
FRUTALES TROPICALES Y SUBTROPICALES

ING. ROBERTO SÁNCHEZ LUCIO
INOCUIDAD ALIMENTARIA

Ph. D. MARIO ALFONSO URÍAS LÓPEZ
ENTOMOLOGÍA

M.C. JESÚS VALERO GARZA
AGRICULTURA ORGÁNICA

Ph. D. VÍCTOR ANTONIO VIDAL MARTÍNEZ
MEJORAMIENTO GENÉTICO Y TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA EN MAÍZ Y SORGO

Ph. D. JOSE FRANCISCO VILLANUEVA AVALOS
PASTIZALES Y RECURSOS FORRAJEROS

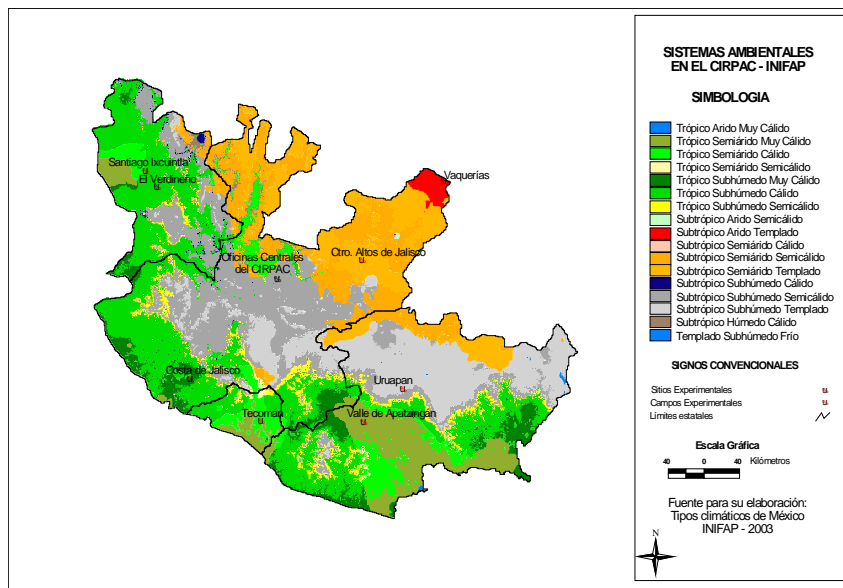
CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL PACÍFICO CENTRO (CIRPAC)

El CIRPAC comprende los cuatro estados del Pacífico Central de la República Mexicana, que son Colima, Jalisco, Michoacán y Nayarit. En su conjunto estos Estados abarcan una superficie de 154,364 km², que representan 7.5% de la superficie nacional. En esta región, viven 12'235,866 habitantes (INEGI, 2005), correspondiendo más de la mitad de ellos al Estado de Jalisco. El 42.6% de la región Pacífico Centro es apta para la ganadería, 34.56% tiene potencial forestal y 22.84% comprende terrenos apropiados para las actividades agrícolas. La región Pacífico Centro, posee una gran variedad de ambientes, que van desde el templado subhúmedo frío, hasta el trópico árido muy cálido. En la parte inferior se muestra una figura con la distribución de los ambientes en la región Pacífico Centro.

Los sistemas producto más relevantes para la región Pacífico Centro y para los que el CIRPAC realiza investigación y transferencia de tecnología son: aguacate, limón mexicano, mango, *agave tequilana*, aves-huevo, porcinos-carne, maíz, bovinos-leche, melón, maderables, pastizales y praderas, sorgo, caña de azúcar, bovinos-carne, no maderables, copra, bovinos-doble propósito, sandía, plátano, frijol, papaya, durazno, guayaba y ovinos-carne.

El CIRPAC atiende las demandas del sector en investigación, validación y transferencia de tecnología, a través de cinco campos experimentales estratégicos, tres sitios experimentales y una oficina regional ubicada en la ciudad de Guadalajara, Jalisco. La ubicación de campos y sitios experimentales se muestra abajo.

CIRPAC



GUÍA PARA EL MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DE PROCESO Y SUPERFICIES DE CONTACTO EN EMPACADORAS DE MANGO PARA EXPORTACIÓN

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares de los derechos de autor.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Progreso 5. Barrio de Santa Catarina. Delegación Coyoacán
México, D.F. 04010
Teléfonos: (55) 3971-8700 conmutador

Primera Edición 2010
Impreso en México

ISBN: 978-607-425-320-7

Folleto Técnico No. 1
Abril de 2010

Campo Experimental Santiago Ixcuintla
Km. 6 Entronque Carr. Internacional a Santiago Ixcuintla. Apdo. Postal 100, Santiago
Ixcuintla, Nayarit.
Tel. y Fax (323) 235-0710

La cita correcta de esta obra es:
Osuna-García, J. A., S. Salazar-García, G. Doyon, Y. Nolasco-González y R. Goenaga.
2010. Guía para el monitoreo de la calidad del agua de proceso y superficies de
contacto en empacadoras de mango para exportación. INIFAP, CIRPAC. Campo
Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico No. 1, Santiago Ixcuintla, Nayarit,
México.

Impreso en México con 500 Ejemplares

Financiado por IICA-PROCINORTE

Printed in Mexico

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Microorganismos indicadores en alimentos	5
1.1. Mesófilos aerobios (o cuenta total)	5
1.2. Cuenta de hongos y levaduras	6
1.3. Cuenta de coliformes totales	6
1.4. Coliformes fecales	7
1.5. <i>Escherichia coli</i>	8
2. Posible contaminación del fruto de mango en agua de proceso y superficies de contacto en las empacadoras de mango	8
II. OBJETIVOS	9
III. DESCRIPCIÓN DE METODOS UTILIZADOS	9
1. Método P/A Broth 8319	9
2. Método P/A Broth 8364 con MUG	11
3. Método P/A Pathoscreen Medium	14
4. Método de Prueba de paletas	16

IV.	RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA COLECTA Y MANEJO DE LA MUESTRA	20
V.	RESULTADOS OBTENIDOS EN MUESTREOS REALIZADOS EN EMPACADORAS DE MANGO PARA EXPORTACIÓN EN LOS ESTADOS DE NAYARIT Y SINALOA.	21
VI.	CONCLUSIONES	24
VII.	RECOMENDACIONES	24
VIII.	LITERATURA CONSULTADA	25

I. INTRODUCCIÓN

Inocuidad alimentaria implica la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando sean preparados o ingeridos de acuerdo con su uso previsto (Codex Alimentarius, 2005). Esto se puede lograr minimizando los peligros biológicos (microbiológicos, fitosanitarios y zoonosarios), físicos (clavos, vidrios, uñas) y los químicos (plaguicidas, metales pesados, hormonas) durante todo el proceso de producción, empaque, comercialización y consumo (Almonte, 2000). Sin embargo, la comunidad internacional no solo considera la inocuidad alimentaria, sino también la calidad alimentaria, que en su concepto más amplio incluye además de la calidad por atributos (tamaño, color, olor, apariencia y sabor), otros factores adicionales como aspectos nutricionales, integridad, autenticidad, éticos, culturales, religiosos, así como aquellos relacionados al ambiente.

Actualmente la mayoría de los países desarrollados consideran el concepto de calidad alimentaria en su forma más amplia, es decir, en términos prácticos los aspectos de calidad alimentaria están íntimamente relacionados a los de inocuidad alimentaria, debido a que ambos aspectos son manejados íntegramente a lo largo de la cadena producción-consumo. Bajo este contexto, queda de manifiesto que la inocuidad alimentaria se ha convertido en una prioridad tanto para la salud pública como para mantener la competitividad, posicionamiento y mayor acceso a los mercados nacional e internacional. De hecho, además de tener implicaciones en la salud de los consumidores, la inocuidad alimentaria tiene impacto en la oferta, demanda, flujos comerciales, higiene y sanidad laboral, lo cual repercute en los costos de la cadena producción-consumo. Pese a lo anterior, los consumidores de los países desarrollados con alto poder adquisitivo están dispuestos a pagar el costo de un régimen regulatorio

que garantice estándares más altos y exigen a sus gobiernos mayor vigilancia para garantizar el abasto de alimentos inocuos, mediante la disminución de factores de riesgo (Almonte, 2000).

La característica de la economía actual de producir y consumir en un entorno globalizado conduce a la competencia y las exigencias en los requerimientos de calidad en los alimentos, que por ende llevan implícita la inocuidad como una necesidad para poder competir y permanecer en los mercados. Estos mercados obedecen a la demanda de la población a consumir alimentos más nutritivos, idóneos y producidos bajo condiciones sanitarias socialmente aceptables, que no provoquen enfermedades que pueden tener un impacto negativo tanto en lo social como en lo económico (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell, 2001).

En los países desarrollados el incremento en el consumo de frutas y hortalizas para una dieta más saludable ha conllevado al aumento de la exposición a microorganismos patógenos (virus, parásitos y bacterias). La tendencia al alza en las enfermedades de transmisión alimenticia (ETA's), ha tenido sus implicaciones políticas, de tal forma que los importadores exigen el cumplimiento de normas o estándares de calidad e inocuidad a través de certificaciones que garantizan que el alimento es producido bajo la aplicación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA's), Buenas Prácticas de Manejo (BPM's), Buenas Prácticas de Higiene (BPH's) y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en Inglés). De hecho, el HACCP está integrado en las regulaciones oficiales de la Unión Europea (Decreto 94/356/CEE), Canadá, los Estados Unidos de América (Código de Regulaciones Federales 123) y México (Norma Oficial Mexicana-128-SSA1-1994) (Higuera-Ciapara y Noriega-Orozco, 2000).

México es el primer país exportador de mango en el mundo y mantener dicha posición en el futuro dependerá en gran medida de la adopción de BPA's, BPM's y BPH's que aseguren la inocuidad de este producto. La consolidación del mango mexicano en los mercados que actualmente concurre estará sujeta a que se cumplan los requisitos de sanidad y calidad que los países consumidores exigen. Quien no responda rápido a estas exigencias estará en riesgo de quedarse rezagado y consecuentemente se perderán mercados ya conquistados y se dejarán de percibir divisas e ingresos que repercutirán en la pérdida de fuentes de trabajo, lo que afectaría la economía nacional. En el 2008, en México se produjeron 1.7 millones de toneladas de mango en una superficie estimada de 182 mil hectáreas (SIAP-SAGARPA, 2008).

México exporta del 12 al 14% de su producción total. Las exportaciones se realizan por conducto de la Asociación de Empacadores de Mango para Exportación (EMEX, A. C.), la cual integra 80 empresas en nueve estados del país y procesa el 90% de las exportaciones mexicanas de mango. En el 2007 México exportó 44 millones de cajas con valor de 176 millones de dólares. Los principales compradores fueron los Estados Unidos de América (87.5%), Canadá (8.4%), la Unión Europea (1.5%) y Japón (2%) (EMEX, A. C., 2008). La cosecha de mango en México inicia en enero-febrero en el estado de Chiapas y termina en agosto-septiembre en Sinaloa, Sonora y Baja California Sur (Crane *et al.*, 2009). Los principales cultivares que se exportan son Tommy Atkins (32.5%), Ataulfo (25.3%) Kent (20.9%), Keitt (11.6%) y Haden (9.4%) (EMEX, A.C., 2008).

Debido a la importancia socioeconómica del mango, no sólo es fundamental prevenir la contaminación microbiológica mediante la aplicación de las BPA's, BPM's y BPH's, sino que también es necesario certificarse ante terceros para demostrar que en

realidad se están llevando a cabo estas prácticas y que ellas son eficaces para minimizar los riesgos de contaminación. Las normativas de las leyes mexicanas en lo referente a la calidad microbiológica de agua y alimentos, consideran solamente métodos tradicionales en microbiología, los cuales bajo los avances tecnológicos, se encuentran superados en la mayoría de los casos y la normativa vigente no se ha modificado. Cabe reconocer que el establecimiento de Normas Oficiales Mexicanas para alimentos son de reciente creación, dado que la mayoría de ellas surgen a partir de 1993-1994, y es a partir del 2000 y 2001 que se empiezan a generar propuestas de nuevas normas oficiales y modificaciones a las ya existentes, aunado con las necesidades de los mercados para el consumo de frutas y hortalizas frescas (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell, 2001).

Por otro lado, la detección en el laboratorio de los microorganismos patógenos puede ser muy complicada, muy lenta y/o muy costosa para determinaciones rutinarias. Además, es concluyente cuando se encuentra un microorganismo patógeno, pero puede haber casos en que no se detecte por razones circunstanciales como el clima o la cantidad de individuos infectados que están contaminando, a pesar de que el manejo del alimento implique el riesgo de que el patógeno aparezca en cualquier momento. En todo caso, los métodos actuales utilizados para la detección de microorganismos patógenos en alimentos no facilitan un enfoque preventivo. Por esas razones, las normas en materia de alimentos establecen la calidad microbiológica en términos de microorganismos indicadores. Estos son organismos (o grupos) que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de microorganismos patógenos en los alimentos. Además de que su detección en el laboratorio es más sencilla, rápida y/o económica, los microorganismos

indicadores permiten un enfoque de prevención de riesgos puesto que advierten de un manejo inadecuado y/o contaminación.

1. Microorganismos indicadores en alimentos

– Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso:

Mesófilos aerobios (o cuenta total)

Cuenta de hongos y levaduras

Cuenta de coliformes totales

– Indicadores de contaminación fecal:

Coliformes fecales

Escherichia coli

La selección de indicadores en un alimento depende fundamentalmente de los riesgos implicados y de lo que se requiera saber para liberar, controlar o mejorar el alimento, manteniendo el enfoque preventivo. A continuación se presentan los indicadores mencionados y cuál es su utilidad (Koburger y Martha, 1984; Ashbolt *et al.*, 2001; Pierson y Smoot, 2001).

1.1. Mesófilos aerobios (o cuenta total)

Esta determinación estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. El grupo de los mesófilos aerobios incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30°C. Indica el grado de contaminación de una muestra y las condiciones que han favorecido o reducido la carga microbiana. Desde luego, no se aplica a alimentos fermentados y puede dar escasa información sobre el manejo del alimento cuando éste es poco favorable para el desarrollo

microbiano por su pH ó potencial de agua (a_w), por ejemplo. Este grupo es un indicador importante en alimentos frescos, refrigerados y congelados, en lácteos y en alimentos listos para consumir.

1.2. Cuenta de hongos y levaduras

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, por lo que son frecuentes en la microbiota habitual de muchos alimentos; se dispersan fácilmente por el aire y el polvo. Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos; sin embargo, también pueden ser causantes de la descomposición. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde las condiciones no favorecen el crecimiento bacteriano, por ejemplo: pH ácido, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, presencia de antibióticos u otros antibacterianos. Como grupo indicador son útiles para evidenciar grado general de contaminación en alimentos con estas características o cuando los mesófilos aerobios no son útiles, como en alimentos fermentados. También, son indicadores del riesgo de desarrollo de hongos toxigénicos en alimentos como frutos secos, especias, cereales y otros granos, y sus derivados.

1.3. Cuenta de coliformes totales

Las bacterias del grupo coliforme se definen como: bacilos cortos, Gramnegativos, anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa a 35°C, en menos de 48 horas, con producción de ácido y gas. Incluye los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Durante mucho tiempo se

consideraron evidencia de contaminación fecal, pero se ha demostrado que muchos de ellos pueden vivir e incluso crecer en el suelo, el agua y otros ambientes. Actualmente se consideran un excelente indicador de la eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección, así como de calidad sanitaria en agua, vegetales y diversos productos procesados. Su determinación se basa generalmente en la capacidad de fermentar lactosa. Se pueden utilizar los métodos del número más probable (NMP) que es un método estadístico en tres fases y permite el hallazgo de cantidades muy bajas de coliformes. También se pueden detectar por cuenta en placa utilizando agar bilis-rojo violeta en el cual las colonias fermentadoras de lactosa causan el vire del indicador; pueden detectarse por filtración en membrana (*Millipore*) e incubación en medios adecuados, por métodos rápidos como Petrifilm y reacciones cromogénicas o fluorogénicas.

1.4. Coliformes fecales

Dentro del grupo coliforme, los de origen fecal son capaces de fermentar la lactosa también a 44.5 °C; se consideran el indicador más adecuado de contaminación con heces de animales y humanos, por ejemplo en pescados y mariscos, carnes, leche, alimentos listos para consumir, entre otros. La determinación se hace a partir de la segunda etapa (confirmativa) del método del NMP, cultivando en caldo lactosado con incubación a 44.5 °C. Generalmente se combinan las determinaciones, según se requiere.

1.5. *Escherichia coli*

Se considera indicador de contaminación fecal reciente, humana o animal en productos como agua embotellada, leche, jugos, alimentos infantiles, y alimentos procesados, en general. Se caracteriza por ser coliforme termotolerante (fermenta lactosa a 44.5°C) que produce indol a partir de triptofano y produce β -glucuronidasa, características que se usan para su identificación en laboratorio, generalmente en la etapa final del NMP o de alguno de los otros métodos, incluyendo Petrifilm.

2. Posible contaminación del fruto de mango en agua de proceso y superficies de contacto en las empacadoras de mango.

El fruto de mango no está contaminado de origen, sin embargo, desde la cosecha en huerto, traslado a la empacadora y proceso durante el empacado es factible que éste sea contaminado por microorganismos patógenos tales como *Salmonella sp* y *E. coli*. Osuna *et al.* (2007) señalaron que durante el manejo del empacado del mango para exportación se identificaron tres puntos críticos de control: las tinas de lavado, las tinas de hidrotérmico y las tinas de hidrogenfriado. Asimismo, comentaron que la falta de higiene en las cajas de transporte, bandas y bancos puede propiciar la contaminación del fruto. Además, Soto *et al.* (2007) indicaron que el agua de proceso utilizada en las empacadoras de mango para exportación es el vehículo de transporte de microorganismos patógenos cuando los controles de sanitización son deficientes y que existe un potencial muy grande de contaminación de éstos a la pulpa del mango, especialmente cuando son sometidos a enfriamiento después de haber pasado por el tratamiento cuarentenario contra mosca de la fruta, el cual consiste en sumergir los

frutos en agua caliente a 46.1 °C por 75 a 110 min, dependiendo del tamaño (Báez-Sañudo *et al*,1995; Avena, 1997)

Por los riesgos de contaminación que se tienen en el fruto de mango durante el proceso en la empacadora, es recomendable monitorear los niveles de desinfectantes, así como la presencia de microorganismos patógenos mediante la aplicación de pruebas microbiológicas rápidas.

II. OBJETIVOS

Esta guía pretende ser una herramienta en la evaluación integral de la inocuidad en las empacadoras de mango para exportación o mercado nacional, fomentando la aplicación de pruebas microbiológicas rápidas en la determinación de Presencia/Ausencia (P/A) de los microorganismos indicadores en el monitoreo de la calidad microbiológica de agua de proceso y superficies de contacto. Los resultados positivos al utilizar estos métodos rápidos de muestreo microbiológico indicarán una higiene inadecuada o la posible presencia de patógenos, dando la pauta para recomendaciones y acciones correctivas a proponer para controlar el proceso.

III. DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS UTILIZADOS

1. Método P/A Broth 8319 (Hach, 2008a)

Es un método sencillo que indica la presencia o ausencia de coliformes totales en muestras de agua. El método es una simple modificación del método del tubo múltiple. Se utiliza caldo de lactosa y lauril triptosa con púrpura bromocresol, el cual

detecta la formación de acidez durante la fermentación de la lactosa por las bacterias coliformes.

Recomendaciones para obtener mejores resultados

Seguir las siguientes medidas para evitar la contaminación de la muestra y el recipiente de muestra: Use cofia o cubre cabello y tapaboca como medida preventiva durante el muestreo; lávese las manos con agua y jabón antes de iniciar la toma de muestras; desinfecte el área de trabajo con solución bactericida.

Toma de la muestra

Se toman 100 mL de la muestra a evaluar en un recipiente o bolsa estéril. La muestra se puede tomar también directamente de la llave. Se vacía la muestra en el frasco con el medio P/A Broth de muestra hasta la línea de llenado. La muestra toma un color rojo púrpura. Se incuba la muestra a 35°C por 24 a 48 horas.

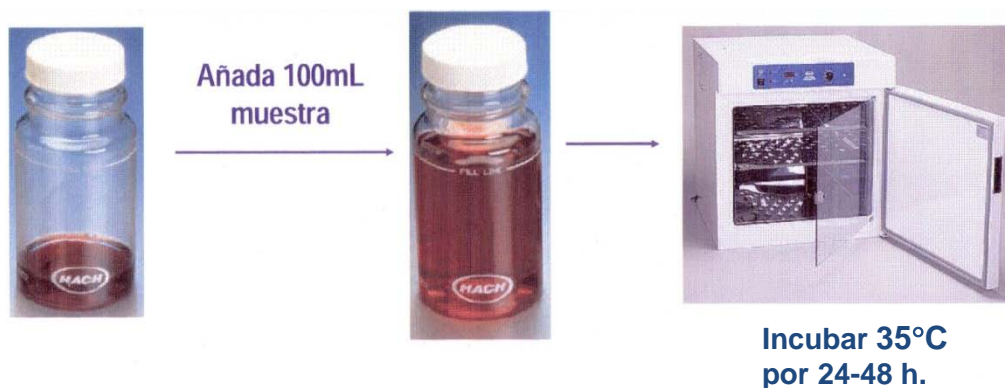


Figura 1. Toma e incubación de la muestra.

Interpretación de los resultados

Después de 24 horas de incubación, el cambio de color de rojo púrpura a amarillo o amarillo-café indica una prueba presuntivamente positiva para coliformes totales. Si no se da el cambio de color, incubar otras 24 horas adicionales y volver a revisar el cambio de color. Si después de 48 horas de incubación la muestra aún tiene color rojo púrpura, la prueba es negativa para coliformes totales.



Figura 2. Interpretación de resultados para Coliformes totales.

2. Método P/A Broth 8364 con MUG (Hach, 2008a)

Este método detecta simultáneamente la presencia/ausencia de coliformes totales y *E. coli*. Además de contener el caldo lactosa y lauril triptosa con púrpura bromocresol, contiene el reactivo MUG (4-metil-umbeliferil- β -D-glucorónico). Este reactivo MUG es hidrolizado por acción de la enzima β -D-glucoronidasa (enzima específica de *E. coli*) liberando el producto 4-metil-umbeliferona, que tiene la propiedad de emitir fluorescencia azul/verde cuando se ilumina con luz ultravioleta. El MUG

detecta la no producción de gas de la *E. coli* y trabaja bien ante la presencia de microorganismos competitivos.

Recomendaciones para obtener mejores resultados

Seguir las siguientes medidas para evitar la contaminación de la muestra y el recipiente de muestra: Use cofia o cubre cabello y tapaboca como medida preventiva durante el muestreo; lávese las manos con agua y jabón antes de iniciar la toma de muestras; desinfecte el área de trabajo con solución bactericida.

Toma de la muestra

Se toman 100 mL de la muestra a evaluar en un recipiente o bolsa estériles. Se vacía la muestra en el frasco con el medio de P/A Broth con MUG hasta la línea de llenado. La muestra toma un color rojo púrpura. Se incuba la muestra a 35°C por 24 h.

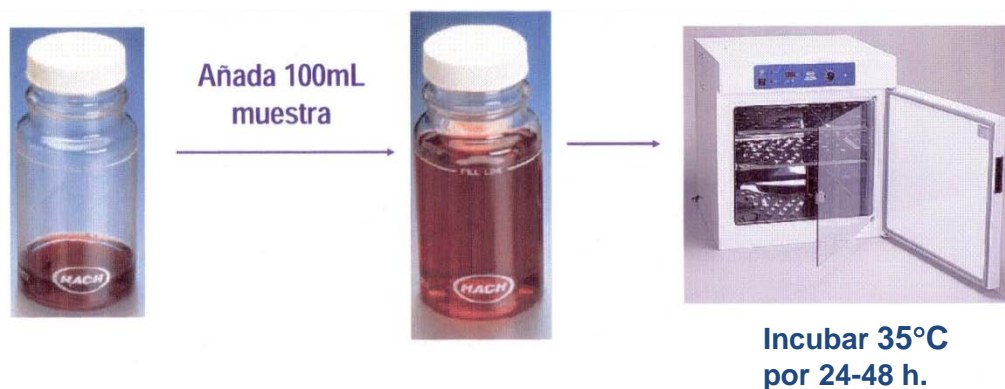


Figura 3. Toma e incubación de la muestra.

Interpretación de los resultados

El cambio de color de rojo púrpura a amarillo o amarillo-café después de 24 h de incubación indica la presencia de coliformes totales. Para detectar *E. coli*, examinar las muestras bajo luz ultravioleta (lámpara portátil de onda larga) y si la muestra presenta fluorescencia es positiva para *E. coli*.



Figura 4. Interpretación de resultados para *Coliformes totales*

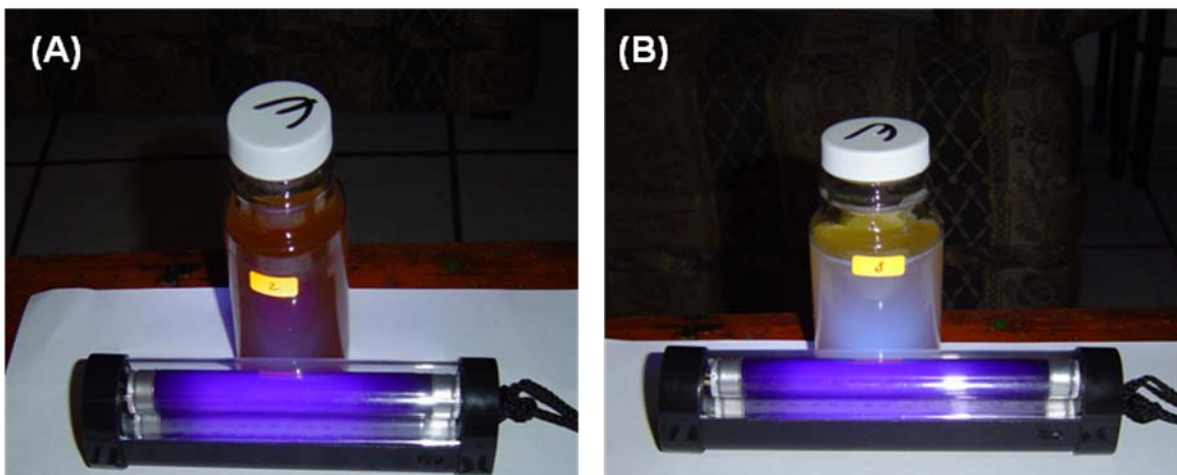


Figura 5. Interpretación de resultados para *Escherichia coli*.

Si no fluoresce es negativo (A); si hay fluorescencia es positivo (B).

3. Kit de campo P/A Pathoscreen™ Medium para detectar bacterias (Hach, 2008b)

Este método detecta la presencia de sulfuro de hidrógeno producido por bacterias asociadas a contaminación fecal en agua. El citrato de amonio y el tiosulfato de sodio en el medio sirven como indicador del sulfuro de hidrógeno. Entre las bacterias asociadas con contaminación fecal están *Salmonella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Edwardsiella* y algunas especies de *Klebsiella*. La *E. coli* nativa no interfiere con la prueba de Pathoscreen, la cual la hace una excelente alternativa para coliformes. Además, el medio en forma de polvo esterilizado es fácil de usar y produce resultados confiables y fáciles de interpretar. Este método ha sido diseñado para monitorear agua de consumo humano o de proceso como es el caso del agua empleada en las empacadoras de mango.

Toma de la muestra

Los frascos deben ser esterilizados previos a la toma de cada muestra. Se lavan los frascos con agua y jabón para luego continuar con el procedimiento de esterilización, el cual consiste en adicionar de 10 a 12 gotas de hipoclorito de sodio al 5.25%, el cual viene incluido en el kit. Girar el frasco completamente para que se cubran todas las paredes y tapa del frasco y dejarlo así por 2 minutos; enseguida enjuagar el frasco varias veces con agua de la muestra a tomar. Después de esto el frasco estará listo para usarse.

Para coleccionar la muestra, se llena el frasco previamente esterilizado hasta los hombros con aproximadamente 20 mL de la muestra y se agrega el contenido de un sobre de medio Pathoscreen en polvo. Para evitar la contaminación esterilice frotando

el exterior del sobre con alcohol antes de abrir. Cierre el frasco inmediatamente e inviértalo y agítelo para mezclar completamente la muestra con el medio. Coloque el frasco en un lugar con temperatura de 25 a 35°C por 24 a 48 h. En lugares donde no se alcancen estas temperaturas, se recomienda utilizar incubadora.

Interpretación de los resultados

Se evalúa la reacción después de 24 horas; si el color cambia de amarillo a negro, el resultado es positivo. Si no hay cambio de color, continúe incubando las muestras negativas por 24 horas adicionales. Si después de 48 horas de incubación la muestra aún tiene color amarillo, la prueba es negativa. Una prueba positiva está basada en la formación del sulfuro ferroso negro.



Figura 6. Toma e incubación de muestras



Figura 7. Interpretación de resultados para bacteria (*Salmonella*)

Si no ocurre cambio de color es negativo (A); Color negro es positivo (B).

4. Método de paletas de prueba (Hach, 2008c)

Este método es más apropiado para pruebas de tamiz semi-cuantitativas. Permite el monitoreo rápido y fácil de muestras de agua, superficies sólidas y líquidos no viscosos donde pueden existir condiciones no sanitarias. Sirve para dar una indicación de cómo está cambiando la carga microbiana en un lugar. Fácilmente se puede detectar la contaminación en equipo de proceso y en superficies que tienen contacto con el alimento. El método de paletas sirve para la detección de bacterias aerobias totales y coliformes totales al mismo tiempo; para esto, la paleta tiene doble lado con medios de cultivo selectivos, un lado contiene agar Bilis Rojo Violeta (color rojo) para coliformes totales y el otro lado tiene el agar extracto de Triptona/TTC (color ámbar) para bacterias aeróbicas totales. El lado de paleta tiene un molde de cuadrícula para el conteo fácil de colonias.

Recomendaciones para obtener mejores resultados

Use cofia o cubre cabello, tápese la boca como medida preventiva durante el muestreo. Lávese las manos con agua y jabón antes de iniciar la toma de muestras. No toque el área de la paleta donde está el medio de cultivo. Después de obtenidos los resultados de las pruebas de paletas, se deben desechar las paletas, para lo cual se recomienda esterilizarlos en autoclave por 15 minutos a 121°C a 103 kPa o con 10 mL de blanqueador comercial (solución de hipoclorito de sodio al 5.25%) por 30 minutos.

Toma de la muestra

Para el uso de las paletas de prueba en sólidos y superficies planas, primero remueva la paleta del tubo. Después, presione un lado de la paleta en la superficie a muestrear; voltee la paleta y presione el otro lado en una nueva área de superficie a muestrear. Regrese la paleta al tubo y cierre con la tapa. Incube a temperatura de 35 a 37°C por 24 h a 48 h.

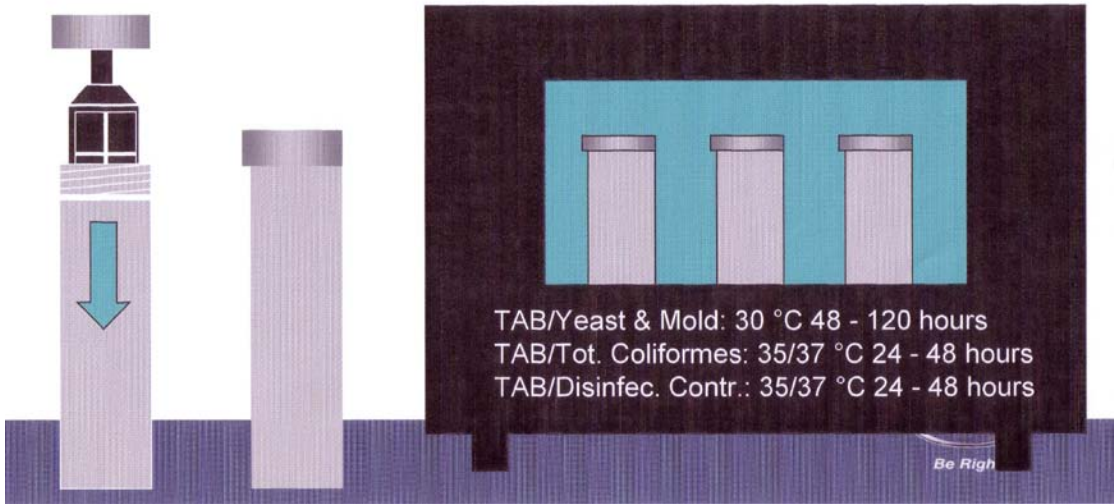
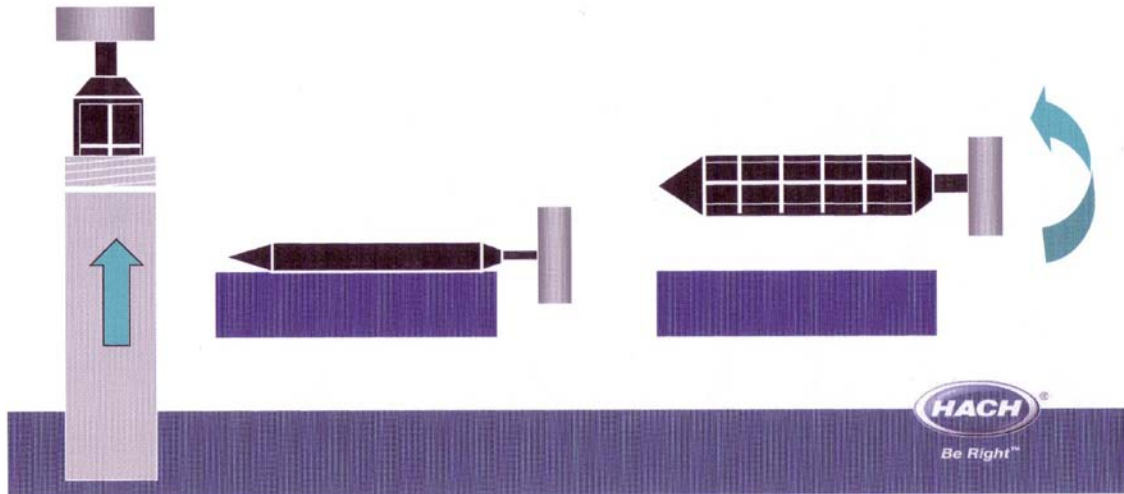


Figura 8. Toma de muestra en el método de paletas.

Interpretación de los resultados:

Después del tiempo de incubación, compare con la tabla de densidad de colonias que viene en el manual de la prueba y se muestra en la Figura 9, o realice el conteo de colonias utilizando la cuadrícula de la paleta.

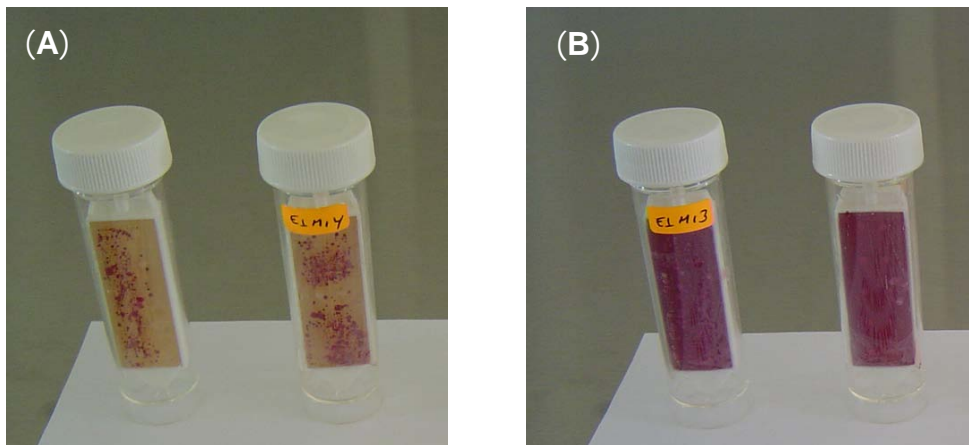


Figura 9. Resultados en paletas para bacterias aerobias totales (A) y en bacterias coliformes totales (B).

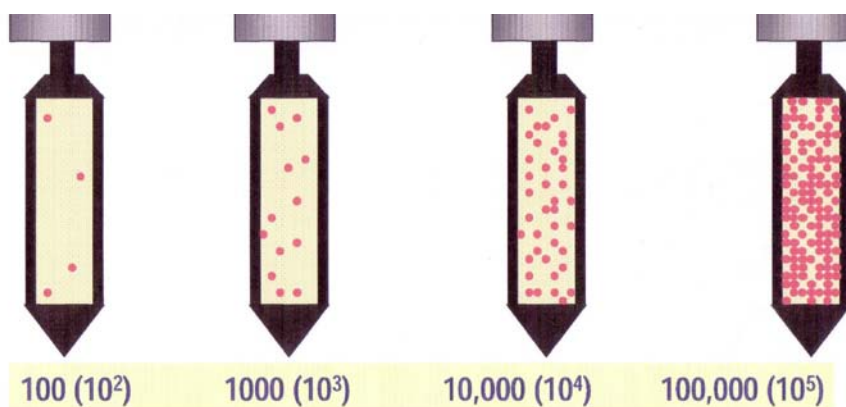


Figura 10. Tabla de densidad de colonias para interpretación de resultados para paletas.

IV. RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA COLECTA Y MANEJO DE LAS MUESTRAS

La muestra de agua debe ser propiamente tomada para asegurar que las variaciones sean detectadas y que resulten representativas de la fuente de muestreo. Para tener una muestra representativa, se debe dejar el agua correr de la llave, hidrante o bomba a una velocidad considerable sin salpicar, esto por dos o tres minutos antes de tomar la muestra. No varíe la velocidad del flujo del agua mientras se toma la muestra. Se debe tomar suficiente volumen de muestra para el análisis, por lo general un mínimo de 100 mL de muestra es suficiente. Durante la colecta de la muestra se debe evitar su contaminación. La muestra se puede tomar en bolsas o frascos estériles, estos se deben manejar cuidadosamente, abrirlos sólo antes de tomar la muestra y cerrarlos inmediatamente después de la toma. También se debe evitar el contacto del frasco o bolsa con la boca de la llave. En el caso de que el muestreo sea de algún reservorio de

agua, se llena el frasco de muestra debajo de la superficie del agua. No se debe muestrear cerca de la orilla. Se debe quitar la tapa del frasco, tomarlo de la base y sumergirlo boca abajo dentro del agua para evitar tomar residuos de la superficie del agua. Se llena el frasco posicionándolo boca arriba y dejando que se llene lentamente. Inmediatamente hay que etiquetar los frascos para identificarlos durante su procesamiento. El análisis de la muestra se debe realizar lo más pronto posible después de su colecta. El tiempo máximo entre la colecta y el análisis de la muestra no debe ser mayor de 8 horas (tiempo máximo de 6 horas en el traslado de la muestra y 2 horas máximo de proceso). Si se excede de las 8 horas, la muestra se debe mantener a 4 °C, pero sin congelarse. El tiempo máximo entre el muestreo y al análisis (incluyendo la refrigeración) no debe exceder 24 horas. Las fallas en la colecta y transporte inapropiado causarán resultados incorrectos.

V. RESULTADOS OBTENIDOS EN MUESTREOS REALIZADOS EN EMPACADORAS DE MANGO PARA EXPORTACIÓN EN LOS ESTADOS DE NAYARIT Y SINALOA

Se muestrearon dos empacadoras en Nayarit y 12 en Sinaloa (Osuna *et al.*, 2009). Las muestras de agua de proceso (fuente, tinas de lavado, tinas de hidrotérmico, tinas de hidrogenfriado) se analizaron con los métodos P/A Broth 8319, P/A Broth 8364 con MUG y el Kit de campo Pathoscreen TM Medium, en tanto que las superficies de contacto (cajas de campo y empaque, bandas y bancos y fruto empacado) se examinaron con el método de paletas de prueba. En cada empacadora se realizó al

menos un muestreo por cada caso específico. Los muestreos se realizaron durante Julio-Agosto, 2008.



Figura 11. Toma de muestras en agua de proceso.



Figura 12. Toma de muestras en superficies de contacto.

Los resultados muestran que la presencia de Coliformes totales, *E. coli* y *Salmonella* se detectó en diferentes grados en agua de proceso de todas las empacadoras.

Cuadro 1. Resultados de Coliformes totales en empacadoras.

MUESTRAS	BROTH 8319 (P/A Coliformes totales)														Frecuencia (%)
	1N	2N	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S	11S	12S	
Fuente	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	85.7
Lavado	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	64.3
Hidrotérmico	-	+	-	+	-	+	+	+	+	0	0	0	0	0	66.7
Hidrogenfriado	-	+	0	-	-	+	-	+	-	0	0	0	0	0	50.0

0 = No Aplica, + = Positivo, - = Negativo

1N-2N = Empacadoras de Nayarit, 1S-12S = Empacadoras de Sinaloa

Cuadro 2. Resultados de Coliformes totales y *E. coli* en empacadoras

MUESTRAS	BROTH con MUG 8364 (P/A Coliformes totales y <i>E. coli</i>)														Frecuencia (%)
	1N	2N	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S	11S	12S	
Fuente	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	92.8
Lavado	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	57.1
Hidrotérmico	-	+	+	+	-	+	+	+	+	0	0	0	0	0	77.7
Hidrogenfriado	-	+	0	-	-	+	-	+	-	0	0	0	0	0	50.0

0 = No Aplica, + = Positivo, - = Negativo

1N-2N = Empacadoras de Nayarit, 1S-12S = Empacadoras de Sinaloa

Cuadro 3. Resultados de *Salmonella* en empacadoras

MUESTRAS	KIT DE CAMPO PATHOSCREEN™ MEDIUM (<i>Salmonella</i>)														Frecuencia (%)
	1N	2N	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S	11S	12S	
Fuente	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	21.4
Lavado	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	42.8
Hidrotérmico	-	+	-	+	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	22.2
Hidrogenfriado	-	+	0	-	-	+	-	-	-	0	0	0	0	0	25.0

0 = No Aplica, + = Positivo, - = Negativo

1N-2N = Empacadoras de Nayarit, 1S-12S = Empacadoras de Sinaloa

La parte más crítica se detectó en superficies de contacto ya que la presencia de bacterias aerófilas se observó en todas las empacadoras.

Cuadro 4. Resultados de Bacterias aerobias totales y Coliformes totales en empacadoras

MUESTRAS	PRUEBA DE PALETAS (Bact. aerobias totales, coliformes totales)														Frecuencia (%)
	1N	2N	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S	11S	12S	
Caja campo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Caja empaque	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Bandas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Banco	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Fruto	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	85.7

0 = No Aplica, + = Positivo, - = Negativo, Nivel de contaminación 10^2 - 10^7
 1N-2N = Empacadoras de Nayarit, 1S-12S = Empacadoras de Sinaloa

VI. CONCLUSIONES

Los métodos rápidos de muestreos microbiológicos son una alternativa excelente para establecer controles para el monitoreo frecuente de la higiene durante el empacado de mango para exportación.

VII. RECOMENDACIONES

Aunque se requiere de mínima experiencia para realizar estas pruebas, se deben tomar los cuidados correspondientes antes mencionados para la toma y manejo de la muestra. Estos métodos son rápidos y adecuados para evaluaciones en sitio; sin embargo, únicamente indican la presencia o ausencia de microorganismos, no el número de éstos. Para saber el grado de contaminación en unidades formadoras de colonias se requiere realizar las pruebas microbiológicas con métodos cuantitativos.

Los resultados encontrados en agua de proceso, sugieren que para mantener las condiciones sanitarias del agua, ésta debe ser cambiada cuantas veces sea necesario, tomando como referencia la turbidez de la misma. Adicionalmente las superficies que

estén en contacto con el agua, tales como tinas de lavado, tinas de hidrotérmico y tinas de hidrogenfriado deben ser limpiadas y sanitizadas tan a menudo como sea necesario, para asegurar la inocuidad del producto. También es importante mantener los niveles activos de los desinfectantes (cloro, iones de cobre, ozono, yodo, cuaternarios de amonio, entre otros) utilizados en el agua de los tratamientos aplicados al mango para exportación.

AGRADECIMIENTOS

Al IICA-PROCINORTE por haber co-financiado la parte experimental y la publicación de esta guía, así como a la Asociación de Empacadores de Mango para Exportación (EMEX, A.C.) por las facilidades otorgadas para realizar este estudio. Se agradece también la participación de los C. Breisa Carolina Segovia Frías y Héctor Ignacio Guevara Loaiza por el apoyo en la toma de muestras..

VIII. LITERATURA CONSULTADA

- Almonte, J. 2000. Estrategia sobre inocuidad y calidad alimentaria. Taller interno de capacitación y establecimiento de líneas prioritarias sobre Inocuidad Alimentaria. SAGAR-INIFAP. México, D. F. Abril del 2000. 31 p.
- Ashbolt, N.J., W.O.K. Grabow and M. Snozzi. 2001. Indicators of microbial water quality. In Fewtrell, L. and Bartram, J. (ed.), Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Risk assessment and management for water-related infectious disease. IWA Publishing, London.

- Avena, B.J.R. 1997. Tratamiento hidrotérmico. En: Báez-Sañudo (Comp.) Manejo Postcosecha del Mango. Empacadoras de Mango para Exportación, A.C. ISBN 970-91939-0-0. Pp. 30-33.
- Báez-Sañudo, R. E. Bringas-Taddei, y J. Ojeda-Contreras. 1995. Uso de agua caliente, vapor y aire caliente forzado como tratamientos cuarentenarios en frutas y hortalizas. *Horticultura Mexicana* 3(1):41-53.
- Codex Alimentarius 2005. Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Manual de procedimiento. Decimoquinta Edición. Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Roma, Italia. 181 p.
- Crane, J.H., S. Salazar-García, T.S. Lin, A.C. de Queiroz Pinto, Z.H. Shü. 2009. Crop Production: Management. pp. 432-483. In: Litz, R.E. (ed.). *The Mango*, 2nd. Edition, Botany, Production and Uses. CABI, Oxfordshire, UK.
- EMEX, A. C. 2008. <http://www.mangoemex.org>. Noviembre de 2008.
- HACH, 2008a. Methods P/A Broth (8319) y P/A Broth w/MUG (8364). DOC316.53.01191. 6 p.
- HACH, 2008b. Analytical procedure PathoScreen™ Field Kit. Method 10032. 10 p.
- HACH, 2008c. Paddle Testers. Method 26108-88. 8 p.
- Higuera-Ciapara, L. y L.O. Noriega-Orozco. 2000. Mandatory aspects of the seafood HACCP system for the USA, Mexico and Europe. *Food Control* 11:225-229.
- Koburger J. and E. Martha. 1984. Yeasts and Molds. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2nd ed. Marvin S. (ed.) APHA. USA. 197-199.

- Osuna García, J.A., A. Morales Loredo y G. Álvarez Ojeda. 2007. Manual de Buenas Prácticas de Manejo y Procedimientos de Operación Estándar de Sanitización en Empaques de mango para exportación adecuado a las condiciones de Nayarit. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Publicación Técnica No. 1, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 126 p.
- Osuna García, J.A., Y. Nolasco González y R. Sánchez Lucio. 2009. Monitoreo de la calidad microbiológica de agua y superficies de contacto en empaques de mangos para exportación. II Onceavo Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. 5-7 Noviembre Puerto Vallarta Jalisco México.
- Pierson M. and L. Smoot L. 2001. Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. Doyle M., L. Beuchat & T. Montville (eds.) ASM Press. USA. 71-87.
- SIAP-SAGARPA. 2008. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. Información de cultivos 1980-2008. <http://www.siap.gob.mx>. Noviembre 2009.
- Soto M., G. Chavez, M. Baez M., C. Martinez and C. Chaidez. 2007. Internalization of *Salmonella typhimurium* into mango pulp and prevention of fruit pulp contamination by chlorine and copper ions. International Journal of Environmental Health Research 17(6):453-459.
- Vásquez-Arroyo J. y A. Cabral-Martell. 2001. La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. Food, Nutrition and Agriculture 28:4-15.

REVISIÓN TÉCNICA

Dr. Mario Miranda Salcedo

C. E. Valle de Apatzingán

Dr. Fernando Bahena Juárez

C. E. Uruapan

Dr. Mario Orozco Santos

C. E. Tecomán

COORDINADORES DE LA INFORMACIÓN

Dr. Gerardo Salazar Gutiérrez

M. C. Luis E. Fregoso Tirado

SUPERVISIÓN

Dr. Keir Francisco Byerly Murphy