

Comparación de la recuperación de células de *Salmonella* adheridas al tomate Roma con el uso de ultrasonido y vortex

G. Ocampo-Mariscal¹, R. García-Frutos¹, A.L. Rojas-Banda¹, L. Martínez-Chávez¹ y N.E. Martínez-González*¹

¹ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Departamentos de Farmacobiología e Ingenierías. Marcelino García Barragán 1451, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

*nanci.martinez@cucei.udg.mx

RESUMEN

El consumo de tomates se ha asociado con brotes de salmonelosis. Los microorganismos presentes en la superficie del fruto pueden estar fuertemente adheridos (CFA) lo que dificulta su remoción. El objetivo de este trabajo fue comparar la recuperación de CFA de *Salmonella* en muestras de tomate Roma expuestas a ultrasonido o vortex, con tres tiempos de exposición. Cada tomate inoculado con *Salmonella* resistente a la rifampicina fue enjuagado manualmente con 100 ml de agua peptonada amortiguada (BPW, por sus siglas en inglés) para remover las células débilmente adheridas. El tomate fue sumergido en 100 ml de BPW y se expuso a baño de ultrasonido (40 kHz) o vortex (6 000 rpm), por 1, 5 y 10 min. Las cuentas de CFA de *Salmonella* del epicarpio de tomates fueron ($p < 0.05$) diferentes en función del método y tiempo de agitación. El uso del vortex logró una mayor recuperación de CFA del patógeno en comparación el ultrasonido. Con 1 min de exposición se obtuvieron recuentos menores de CFA que con 5 y 10 min. Ambos métodos lograron recuperar CFA de *Salmonella* del epicarpio del tomate, es importante considerar el efecto del tiempo de agitación sobre la integridad del tomate cuando se elija un método.

Palabras clave: frutas, patógenos, muestreo, desprendimiento.

ABSTRACT

Consumption of tomatoes has been associated with outbreaks of salmonellosis. The microorganisms present on the surface of the fruit can be strongly attached (SA), which makes their removal difficult. The objective of this work was to compare the recovery of SA from *Salmonella* in Roma tomato samples exposed to ultrasound or vortex, with three exposure times. Each tomato inoculated with rifampicin-resistant *Salmonella* was manually rinsed with 100 mL of buffered peptone water (BPW) to remove loosely attached cells. The tomato was submerged in 100 ml of BPW and exposed at ultrasonic bath (40 kHz) or vortexing (6 000 rpm), for 1, 5, and 10 min. *Salmonella* SA counts from tomatoes epicarp were ($p < 0.05$) different depending on the shaking method and time. The use of the vortex achieved a greater recovery of the pathogen compared to ultrasound. Lower SA counts were obtained with exposure for 1 min than with 5 and 10 min. Both methods were successful in recovering *Salmonella* CFA from tomato epicarp, it is important to consider agitation time effect on tomato integrity when choosing a method.

Keywords: fruits, foodborne pathogens, sampling, detachment.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las frutas más consumidas a nivel mundial, con una derrama económica global anual cercana a 200 mil millones de dólares (Anónimo, 2020). El consumo de tomates crudos se ha relacionado con diversos brotes de salmonelosis en Estados Unidos (EU), Canadá y Europa (CDC, 2005; Kozak *et al.*, 2013; Whitworth, 2019). En 2004, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EU, reportó tres brotes de infecciones por serotipos de *Salmonella*, asociados al consumo de tomates Roma en EU y Canadá, con 561 casos reportados y 155 hospitalizaciones (CDC, 2005). En 2019, los tomates fueron señalados por primera vez en Suecia, como la fuente de un brote de *Salmonella typhimurium*, con un total de 82 casos (Whitworth, 2019).

La contaminación de los tomates con *Salmonella* puede ocurrir en diversos puntos de la cadena de producción antes y después de la cosecha, el procesamiento, la distribución y manipulación (Beuchat & Ryu, 1997; Rushing *et al.*, 1996). Se ha reportado el aislamiento de *Salmonella* de muestras de heces de animales silvestres, sedimentos, reservorios de agua superficial y tomates enteros recolectados en invernaderos (Bell *et al.*, 2015). Asimismo, *Salmonella* ha sido aislada de tomates recolectados en pequeños mercados locales y supermercados (Cárdenas *et al.*, 2013; Leal-Cervantes *et al.*, 2018).

Cuando las células de *Salmonella* entran en contacto con la superficie del tomate, el patógeno puede iniciar el proceso de adhesión al epicarpio (Iturriaga *et al.*, 2007). Los patógenos bacterianos pueden estar presentes en la superficie de los tomates como células débilmente adheridas (CDA) unidas a la superficie por su atracción por fuerzas electrostáticas, o como células fuertemente adheridas (CFA) aquellas que han establecido una adhesión física e irreversible (Dickson & Koohmaraie, 1989). Las CDA pueden ser removidas fácilmente de la superficie de los alimentos mediante un proceso de agitación o enjuague suaves, mientras que las CFA permanecen unidas a la superficie después del lavado y requieren la aplicación de métodos que brinden una acción mecánica, como la agitación vigorosa, trituración o sonicación para desprenderlas (Asséré *et al.*, 2008; Dickson & Koohmaraie, 1989; Patel & Sharma, 2010). Las CFA de los microorganismos patógenos pueden colonizar la superficie de los frutos y formar biopelículas, lo cual brinda protección a las células bacterianas, dificulta su remoción y limita la eficacia de los tratamientos de descontaminación.

El objetivo de este trabajo fue comparar la recuperación de CFA de *Salmonella* en muestras de tomate Roma expuestas al ultrasonido o agitación en vortex, con tres tiempos de exposición. Si bien, diversas investigaciones han reportado el uso del ultrasonido y vortex para el desprendimiento de células adheridas a la superficie de alimentos, pocos estudios se han dirigido a comparar la capacidad de estos métodos para estimar las cuentas de CFA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Se utilizaron tomates Roma (*Solanum lycopersicum*) de textura firme, color rosado, sin daño aparente y con un peso aproximado de 100 g. Los frutos fueron comprados en un mercado local de Guadalajara y transportados dentro de bolsas de polietileno a temperatura ambiente (~25°C), al laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos de la Universidad de Guadalajara, en un lapso de 1 h. Se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 h previo a los experimentos.

Material biológico. Se emplearon seis cepas de *Salmonella* resistentes a la rifampicina (Rif+), *S. typhimurium* (aislada del epicarpio de tomate obtenido en puntos de venta), *S. typhimurium* (aislada de heces humanas), *S. poona* (aislada de epicarpio de aguacate obtenido en huerta), *S. bardo* (recuperada de composta utilizada en un huerto de aguacate) y dos cepas de *S. bareilly* (aisladas del epicarpio de aguacates adquiridos en mercados locales). Todas las cepas se preservaron en caldo soya tripticaseína (CST) con 20% de glicerol a -80°C. Previo a cada experimento, se prepararon cultivos de trabajo con la reactivación de cada aislamiento, se transfirieron a agar soya tripticaseína inclinado (AST) y se incubaron a 35°C por 24 h; estos cultivos se utilizaron para la preparación del inóculo.

Preparación del inóculo. Cada cepa de *Salmonella* de los cultivos inclinados de AST se cultivó individualmente en 10 ml de CST suplementado con extracto de levadura al 0.6 % (CSTEL) a 35 °C por 18 h. Después de la incubación, 0.1 ml de cada cultivo fueron transferidos individualmente a 10 ml de CSTEL y se incubaron a 35 °C durante 4 h. Posteriormente, 0.1 ml de este cultivo se inoculó en 35 ml de CSTEL e incubó a 35 °C por 18 h. Se realizaron dos lavados con 35 ml de solución salina estéril (SS, 0.85% NaCl) por centrifugación a 4,507 x g y 5°C por 10 min. Después del segundo lavado, el sedimento se resuspendió en 17.5 ml de SS. Las suspensiones de células lavadas (~17.5 ml/cepa) se combinaron en una bolsa Whirl-Pak® estéril, para conformar un inóculo de 6 cepas de *Salmonella* (105 ml) y se mezcló manualmente durante 30 s. La concentración de *Salmonella* en el inóculo se determinó mediante la preparación de diluciones decimales en diluyente de peptona al 0.1% y se extendieron sobre placas de agar soya tripticaseína suplementado con extracto de levadura al 0.6 % y 100 mg/l de rifampicina (ASTEL-Rif). Las placas se incubaron a 35°C y las colonias se enumeraron a las 24 h.

Comparación de la recuperación de células adheridas de *Salmonella*. Para la inoculación, cada tomate se sumergió en la bolsa que contenía la mezcla de células lavadas de las cepas y se agitó manualmente durante 1 min. Los tomates inoculados fueron colocados sobre un cilindro de acero inoxidable previamente desinfectado con etanol al 70%, para el secado a temperatura ambiente (~25°C) durante 1 h y permitir la adhesión bacteriana a la superficie. Los tomates fueron divididos en dos grupos para realizar la comparación de las cuentas de *Salmonella*, con el uso de ultrasonido a 40 kHz y vortex a 6 000 rpm, en función del tiempo de exposición. Las muestras de tomate fueron homogenizadas durante 1, 5 y 10 min para la determinación de células CFA. Se realizaron tres réplicas, cada una con cuatro repeticiones (n=12).

Análisis microbiológico. Cada tomate inoculado se depositó en una bolsa Whirl-Pak® con 100 ml de agua peptonada amortiguada (BPW, por sus siglas en inglés) y se agitó manualmente rotando la bolsa a 90° durante 30 s. El líquido de enjuague fue desechado y el tomate se transfirió a otra bolsa Whirl-Pak® que contenía 100 ml de BPW para sumergir en un baño de ultrasonido a 300 W y 40 kHz, por 1, 5 y 10 min. En cada tiempo, se tomó una alícuota de 2 ml sin interrumpir la exposición al ultrasonido hasta el tiempo final de 10 min. Se contaron las células CFA a partir del líquido de enjuague por extensión en superficie sobre placas de ASTEL-Rif a 35°C por 24 h. Se seleccionaron colonias típicas de *Salmonella* para confirmar mediante reacciones en agar triple azúcar hierro y lisina hierro. Todas las cuentas fueron reportadas como UFC/tomate. También se realizó el recuento de CFA con el uso de vortex a 6 000 rpm por 1, 5 y 10 min, bajo las condiciones descritas previamente para el uso del ultrasonido.

Análisis de datos. Las cuentas de CFA se obtuvieron inicialmente en UFC/ml y se multiplicaron por 100 ml, correspondientes al volumen total en que se enjuagó cada tomate. Finalmente, los recuentos expresados en UFC/tomate se transformaron a log UFC/tomate, para su análisis estadístico. Se realizó

un análisis de varianza multifactorial para determinar el efecto del método (ultrasonido o vortex) y el tiempo de exposición (1, 5 y 10 min) para la recuperación de CFA de *Salmonella*. Cuando fue necesario, la separación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de rangos múltiples de HSD de Tukey para determinar las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los factores. El análisis de datos se realizó con el software Statgraphics Centurion XV ver.17.01.06.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las CFA de los microorganismos patógenos establecen una adhesión física irreversible en las superficies de productos frescos y promueven la formación de biopelículas. Por ello, para recuperar las CFA de *Salmonella* de la superficie de los tomates, se requiere la acción de una fuerza mecánica que logre irrumpir la unión física entre las células bacterianas y el epicarpio del fruto y permita su recuperación para estimar su concentración.

La recuperación de CFA de *Salmonella* a partir del epicarpio de tomate fue significativamente diferente ($p < 0.05$) en función del método de homogenización y del tiempo de agitación. El uso del vortex condujo a mayores recuentos promedio del patógeno en comparación al uso del ultrasonido (Figura 1a). Asimismo, los resultados evidenciaron que emplear 1 min de exposición permitió obtener recuentos considerablemente menores ($p < 0.05$) que 5 y 10 min (Figura 1b). Las diferencias en la recuperación de las cuentas de *Salmonella* fueron más acentuadas entre 1 y 10 min, con ambos métodos de homogenización.

Los recuentos promedio con el uso del ultrasonido durante 1, 5 y 10 min fueron 4.4, 4.9 y 5.0 log UFC/tomate, respectivamente (Tabla I). No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en los recuentos de CFA de *Salmonella* cuando los tomates se expusieron al ultrasonido por 1 o 5 min. Sin embargo, el uso del ultrasonido por 10 min permitió una recuperación significativamente mayor ($p < 0.05$) de *Salmonella* en comparación con 1 min. Un efecto similar fue reportado por Sanglay *et al.* (2004), en el que la exposición al ultrasonido a 40 kHz por 1 y 2 min no mostró diferencia significativa en la recuperación de *Salmonella* de la superficie de fresa, manzana y melón cantaloupe.

Por otra parte, con la homogenización en vortex se obtuvieron recuentos promedio de 4.8, 5.1 y 5.3 log UFC/tomate, para 1, 5 y 10 min de exposición, respectivamente (Tabla I). A su vez, a pesar de que se observa un ligero incremento en la recuperación de *Salmonella* a mayor tiempo de exposición al vortex, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en las cuentas de *Salmonella* para los tres tiempos de exposición. Por lo que, utilizar un mayor tiempo de exposición al vortex no aumenta considerablemente la recuperación de *Salmonella* de la superficie del tomate.

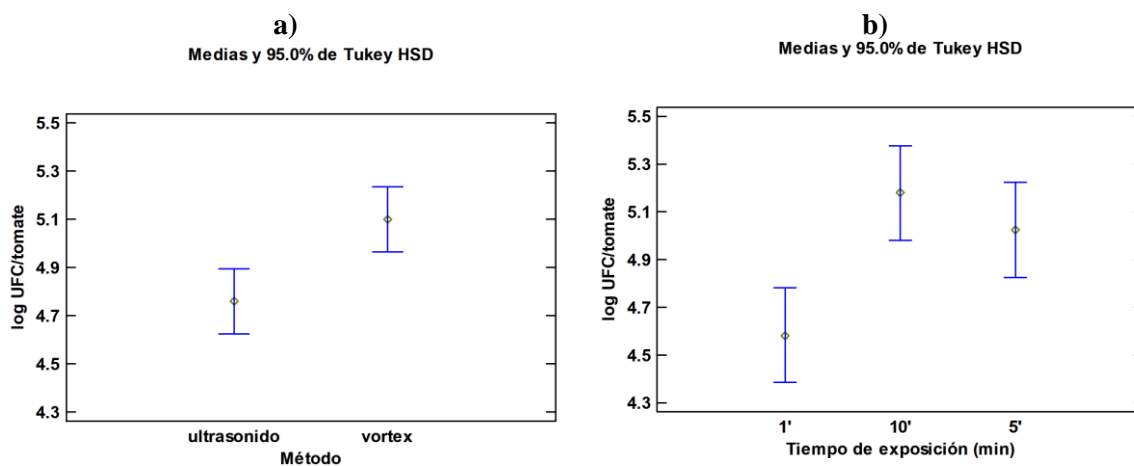


Figura 1. Poblaciones promedio de CFA de *Salmonella* recuperadas a partir del epicarpio de tomates Roma enteros, en función del método de muestreo (a) y minutos de exposición (b).

Los datos de la Tabla I también muestran que homogenizar los tomates con vortex durante 1 min permitió obtener recuentos significativamente mayores ($p < 0.05$) que la exposición al ultrasonido durante el mismo tiempo. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos métodos de homogenización para la recuperación de *Salmonella* del tomate cuando se utilizaron 5 y 10 min de exposición.

Tabla I. Recuperación de células de *Salmonella* fuertemente adheridas a la superficie de tomate Roma (*Solanum lycopersicum*) mediante la exposición al ultrasonido o vortex, durante 1, 5 y 10 min.

Método de recuperación	Media log UFC/tomate \pm DS ($n=12$)		
	Tiempo de exposición (min)		
	1	5	10
Ultrasonido 40 kHz	4.4 \pm 0.6 Ax ^a	4.9 \pm 0.6 ABx	5.0 \pm 0.5 Bx
Vortex 6 000 rpm	4.8 \pm 0.4 Ay	5.1 \pm 0.6 Ax	5.3 \pm 0.7 Ax

^a Para cada método de recuperación, los valores dentro de las filas con letras diferentes (A, B) son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Dentro de las columnas, los valores para cada tiempo de exposición con letras diferentes (x, y) son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El estudio del comportamiento de células adheridas *Salmonella* sobre la superficie de alimentos requiere contar con métodos capaces de recuperarlas. Son escasas las investigaciones enfocadas en la validación de métodos de homogenización para cuantificar la población de CFA en frutas y hortalizas frescas (Sanglay *et al.*, 2004). En nuestro estudio, la exposición de las muestras de tomate al vortex permitió obtener recuentos mayores de CFA del patógeno en un menor tiempo de homogenización, comparado con el uso del ultrasonido. Lo anterior puede ser resultado del desprendimiento de las células con sonicación se da por efecto de cavitación, lo cual es el colapso de millones de microburbujas que liberan una gran cantidad de energía sobre la superficie aplicada y su

efecto para desprender las células está en función de los eventos de colapso por unidad de tiempo (Leong *et al.*, 2011). Mientras que con la agitación en vortex, las células adheridas son removidas por arrastre, como efecto de la agitación vigorosa, mecanismo que suele ser más enérgico.

También, es de interés considerar que, debido a las características morfológicas del tomate, la exposición del fruto a tiempos prolongados de homogenización para recuperar CFA puede comprometer la integridad de su epicarpio, lo que ocasiona la liberación de sustancias y la aparición de lesiones en la superficie del fruto por las cuales se podrían internalizar algunas células bacterianas y, por ende, subestimar la concentración del patógeno en la muestra. Por lo anterior, resulta más recomendable emplear un método que logre una mayor recuperación de células adheridas a la superficie del tomate con un menor tiempo de exposición al tratamiento.

CONCLUSIÓN

Ambos métodos fueron capaces de desprender células adheridas de *Salmonella* en el epicarpio del tomate fresco. Aun cuando el uso del vortex mostró un efecto estadísticamente significativo en la recuperación de la bacteria, en comparación con la sonicación bajo los mismos tiempos de exposición, las diferencias en las cuentas promedio oscilaron entre 0.2 y 0.4 log UFC/fruto. Además, en la elección del mejor método para desprender células adheridas es importante considerar el efecto que el tiempo de exposición tendrá sobre la integridad del fruto.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. (2020). Global Tomato Industry Report 2020: Trends & opportunities by country, consumption, production, price developments, imports and exports (2007-2025). Research and Markets. Report 4701312. Disponible en: [https://www.researchandmarkets.com/reports/4701312/world-tomato-market-analysis-forecast-size?utm_source=dynamic&utm_medium=GNOM&utm_code=4jzvxm&utm_campaign=1352798+-+Global+Tomato+Industry+Report+2020%3a+Trends+%26+Opportunities+by+Country%2c+Consumption%2c+Production%2c+Price+Developments%2c+Imports+and+Exports+\(2007-2025\)&utm_exec=joca220gnomd](https://www.researchandmarkets.com/reports/4701312/world-tomato-market-analysis-forecast-size?utm_source=dynamic&utm_medium=GNOM&utm_code=4jzvxm&utm_campaign=1352798+-+Global+Tomato+Industry+Report+2020%3a+Trends+%26+Opportunities+by+Country%2c+Consumption%2c+Production%2c+Price+Developments%2c+Imports+and+Exports+(2007-2025)&utm_exec=joca220gnomd). Acceso 28 agosto 2020.
- Asséré, A., N. Oulahal, and B. Carpentier. (2008). Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. *J. Appl. Microbiol.* 104:1692-1702. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03711.x>
- Bell, R. L., J. Zheng, E. Burrows, S. Allard, C. Y. Wang, C. E. Keys, D. C. Melka, E. Strain, Y. Luo, M. W. Allard, S. Rideout, and E. W. Brown. (2015). Ecological prevalence, genetic diversity, and epidemiological aspects of *Salmonella* isolated from tomato agricultural regions of the Virginia Eastern Shore. *Front. Microbiol.* 6(415). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00415>
- Beuchat, L. R., and J. H. Ryu. (1997). Produce handling and processing practices. *Emerg. Infect. Dis.* 3:459-465. <https://doi.org/10.3201/eid0304.970407>
- Cárdenas, C., K. Molina, N. Heredia, and S. García. (2013). Evaluation of microbial contamination of tomatoes and peppers at retail markets in Monterrey, Mexico. *J. Food Prot.* 76:1475-1479. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-561>

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). Outbreaks of *Salmonella* infections associated with eating Roma tomatoes--United States and Canada, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 54(13):325-8. PMID: 15815562. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15815562/>
- Dickson, J. S., and M. Koochmaraie. (1989). Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:832-836. <https://doi.org/10.1128/aem.55.4.832-836.1989>
- Iturriaga, M., M. Tamplin, and E. F. Escartín. (2007). Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. *J. Food Prot.* 70:30-34. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.1.30>
- Kozak, G. K., D. MacDonald, L. Landry, and J. M. Farber. (2013). Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. *J. Food Prot.* 76:173-183. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-126>
- Leal-Cervantes, M. G., S. M. Arvizu-Medrano, R. Martínez-Peniche, N. E. Martínez-González, and M. Hernández-Iturriaga. (2018). Microbiological quality and incidence of *Salmonella* on cherry tomatoes at retail in Querétaro, México. *J. Food Prot.* 81:614-618. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-17-377>
- Leong, T., Ashokkumar, M., and Kentish, S. (2011). The fundamentals of power ultrasound-a review. *Acous. Aust.* 39:54-63. <http://hdl.handle.net/11343/123494>
- Patel, J., and Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* 139:41-47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.005>
- Rushing, J. W., F. J. Angulo, and L. R. Beuchat. (1996). Implementation of a HACCP program in a commercial fresh-market tomato packinghouse: a model for the industry. *Dairy Food Environ. Sanit.* 16:549-553. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.3.434d>
- Sanglay, G. C., Eifert, J. D., and Sumner, S. S. (2004). Recovery of *Salmonella* spp. from raw produce surfaces using ultrasonication. *Food. Path. Dis.* 4:295-299. <https://doi.org/10.1089/fpd.2004.1.295>
- Whitworth, J. (2019). *Salmonella* outbreak was first linked to tomatoes in Sweden. Food Safety News. Disponible en: <https://www.foodsafetynews.com/2019/11/salmonella-outbreak-was-first-linked-to-tomatoes-in-sweden/> Acceso 02 mayo 2022.