



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CALIDAD SANITARIA Y SUPERVIVENCIA DE
***Salmonella typhimurium* EN CÁLICES DE JAMAICA**
(*Hibiscus sabdariffa* L.) EN POSTCOSECHA

VIVIANA ALDANA DÍAZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: **CALIDAD SANITARIA Y SUPERVIVENCIA DE *Salmonella typhimurium* EN CÁLICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN POSTCOSECHA**, realizada por la alumna: **Viviana Aldana Díaz** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

(Director de Tesis)



DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR



DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

ASESOR



DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

ASESOR



DR. GILBERTO RENDÓN SÁNCHEZ

ASESOR



DR. JAVIER CASTRO ROSAS

CALIDAD SANITARIA Y SUPERVIVENCIA DE *Salmonella typhimurium* EN CÁLICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN POSTCOSECHA

Viviana Aldana Díaz. Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Con el fin de evaluar la calidad sanitaria y determinar la supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices de jamaica en postcosecha se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero, un total de 90 muestras de cálices de jamaica deshidratados fueron analizadas con el objetivo de evaluar la calidad sanitaria de los cálices de las variedades 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' provenientes de centros de acopio y almacenes particulares, en Ayutla, Guerrero durante el periodo de enero de 2012 a febrero de 2013. Los cálices de jamaica se procesaron de acuerdo a los protocolos establecidos en las normas NOM-113-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994. Los resultados mostraron ausencia de *Salmonella* y *coliformes fecales* en todas las muestras de cálices de jamaica deshidratados de las variedades 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán'. En el segundo experimento, se evaluó la supervivencia de *Salmonella typhimurium*, en cálices frescos de jamaica de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán', con este propósito se inocularon los cálices con $7.01 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de una cepa marcada (rifampicina) de *Salmonella typhimurium*. Por otro lado, para la variedad 'Rosalíz' (cálices de plantas *in vivo*) la densidad de inculó fue de $6.3 \log \text{ UFC g}^{-1}$. En los cálices frescos y deshidratados de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' se evaluó la sobrevivencia de la bacteria al momento de la inoculación y después cada 24 h, por 5 días. Para la variedad 'Rosalíz', la inoculación de los cálices se hizo cuando las plantas estaban creciendo y una vez cosechados y deshidratados, el conteo de células se realizó a los 13 y 30 días después de la inoculación. Los resultados mostraron que *Salmonella typhimurium* no sobrevivió en los cálices deshidratados de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' en cambio la bacteria sobrevivió por 5 días en cálices frescos. Por otro lado, *Salmonella* sobrevivió durante 3 días en cálices frescos de la variedad 'Rosalíz' y hasta 27 días en cálices deshidratados.

Palabras clave: *coliformes fecales*, cálices frescos, cálices deshidratados.

**HEALTH QUALITY AND SURVIVAL OF *Salmonella typhimurium* IN CALYCES OF
JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) IN POSTHARVEST**

Viviana Aldana Díaz. Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

In order to evaluate sanitary quality and determine the survival of *Salmonella typhimurium* in hibiscus calyces postharvest conducted two experiments. In the first, a total of 90 samples dehydrated hibiscus calyces were analyzed with the objective of evaluate the sanitary quality of dehydrated hibiscus calyces of 'Criolla de Guerrero' and 'Sudán' varieties obtained in a collection center and warehouse in Ayutla, Guerrero during the period January 2012 to February 2013. Roselle calyces were processed according to protocols established in the NOM-113-SSA1-1994 and NOM-114-SSA1-1994 standards. The results showed absence of *Salmonella* and *fecal coliforms* in all samples of dehydrated hibiscus calyces of 'Criolla de Guerrero' and 'Sudán' varieties. In the second experiment, the survival of *Salmonella typhimurium* was evaluated in fresh hibiscus calyces of 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' and 'Sudán' varieties, for this purpose the calyces were inoculated with $7.01 \log \text{CFU g}^{-1}$ of a marked strain (rifampicin) of *Salmonella typhimurium*. Furthermore, for the 'Rosalíz' variety (calyces plant *in vivo*) inoculum density was $6.3 \log \text{CFU g}^{-1}$. In fresh and dehydrated calyces of 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' and 'Sudán' varieties the survival of bacteria at the time of the inoculation and after every 24 hours was evaluated for 5 days. For 'Rosalíz' variety, calyces inoculation was made when the plants were growing and once harvested and dehydrated, cell counting was performed at 13 and 30 days after inoculation. The results showed that *Salmonella typhimurium* not survive in calyces dehydrated of 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' and 'Sudán' varieties instead the bacteria survived for five days in fresh calyces. *Salmonella* survived for 3 days in fresh calyces 'Rosalíz' variety and up to 27 days in dehydrated calyces.

Key words: *fecal coliforms*, fresh calyces, dehydrated calyces.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este tiempo hay muchas personas que me han ayudado a realizar este trabajo y también a mejorar como persona. Por eso, muy sinceramente agradezco:

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de postgrado.

Al **Colegio de Postgraduados** por las facilidades otorgadas durante mi estancia en el programa de Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo.

Al **Dr. Javier Hernández Morales**, por depositar infinita confianza en mí y brindarme todas las herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto y mi crecimiento personal, por su apoyo y dirección fruto de sus incomparables cualidades como asesor y calidad humana, sin las cuales este trabajo no hubiese sido posible.

Al **Dr. Gabriel Leyva Ruelas**, por su especial tutoría y dirección, por su comprensión y permanente disponibilidad, por todas sus cualidades personales y científicas, y por el trato siempre respetuoso y amable, sin las cuales muy difícilmente habría realizado este trabajo.

Al **Dr. Sergio Aranda Ocampo**, por su apoyo, estímulo, sus sabios consejos brindados siempre con amabilidad, colaboración y facilidades para el desarrollo de esta tesis.

Al **Dr. Javier Castro Rosas** por su apoyo, comprensión y su valiosa ayuda en todo el proceso de titulación y realización de este trabajo.

Especialmente, al **Dr. Gilberto Rendón Sánchez** y **Dr. Mario Galeana de la Cruz** porque aparte de brindarme su guía y estímulo constante para la realización de este trabajo, me brindaron su amistad, la cual voy atesorar y conservar siempre.

A **Prudencio Aldana Reyes** y **María Asunción Díaz Lecona**, mis queridos padres, por todos los esfuerzos consentidos para mi existencia y como mis primeros y eternos maestros por la paciencia que han tenido al inculcarme el interés por la búsqueda del conocimiento y la superación personal.

A **mis hermanas y sobrinos** que con su amor y alegría han sembrado en mi las virtudes que se necesitan para vivir con anhelo y felicidad.

Y a **todos mis amigos y familiares** que directa o indirectamente han contribuido con su ecomio para que en las “paginas de mi vida” hubiese una consagrada a este trabajo.

DEDICATORIA

El esfuerzo depositado en este trabajo lo dedico a:

Con toda la humildad que de mi corazón puede emanar dedico esta tesis a **Dios**, que me ha dado la vida, salud, sabiduría y fortaleza para culminar cada meta que me he propuesto, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este periodo de estudio.

A mi amado esposo **Alfredo** que ha sido impulso durante toda mi carrera y el pilar principal para la culminación de la misma, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento.

A mis preciosos hijos **José Alfredo** y **Alejandro** para quien ningún sacrificio es suficiente, que con su luz han iluminado mi vida y hacen mi camino más claro.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Origen, Distribución y Ecología de la jamaica	4
Clasificación taxonómica de la jamaica	5
Características morfológicas	6
Cosecha de los cálices	6
Manejo postcosecha	9
Composición Química.....	10
Usos y Propiedades	11
Importancia Económica de la jamaica	12
Importancia comercial.....	13
Problemas de calidad.....	14
<i>Salmonella</i>	14
Morfología y Taxonomía	14
Hábitat y fuentes de contaminación	17
Patogenicidad de <i>Salmonella</i>	20
Población susceptible	21
Dosis infectante.....	21
Características de crecimiento y de supervivencia de <i>salmonella</i>	22
Temperatura	22
pH.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Experimento 1. Calidad sanitaria de cálices de jamaica deshidratados (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) en unidades de almacenamiento.....	25
Colecta de muestras.....	25
Detección de <i>Salmonella</i>	25
Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas.....	27
<i>Prueba de la ureasa</i>	27

<i>Caldo lisina-decarboxilasa</i>	27
<i>Fermentación de azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa)</i>	27
Cuantificación de coliformes	27
<i>Método del Número Más Probable (NMP)</i>	27
Experimento 2. Supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en cálices de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) en postcosecha.....	29
Preparación de los cálices de jamaica	29
Origen de la cepa bacteriana	31
Preparación del inóculo	31
Inoculación en los cálices frescos	32
Inoculación en los cálices deshidratados.....	33
Inoculación en los cálices de plantas <i>in situ</i>	33
Evaluación de la supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i>	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Experimento 1. Calidad sanitaria de cálices de jamaica deshidratados (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) en unidades de almacenamiento	36
Detección de <i>Salmonella</i> y presencia de bacterias coliformes en cálices de jamaica.....	36
Experimento 2. Supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en cálices de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) en postcosecha	38
Supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en los cálices deshidratados.....	38
Supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en los cálices frescos de jamaica.....	40
Supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en los cálices frescos y deshidratados en plantas de jamaica	42
CONCLUSIONES	45
LITERATURA CITADA	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química en macronutrientes para 100 g de cálices frescos, referida a varios autores.	10
Cuadro 2. Composición química en micronutrientes para 100 g de la porción comestible de la jamaica, referida a varios autores.	11
Cuadro 3. Producción y Rendimiento de la jamaica a nivel mundial.	12
Cuadro 4. Producción de la jamaica en México por Estados y valores de producción.	13
Cuadro 5. Brotes de salmonelosis asociados con el consumo de productos frescos en Estados Unidos.....	18
Cuadro 6. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en diferentes alimentos y ambientes.	19
Cuadro 7. Condiciones limitantes para el crecimiento de <i>Salmonella</i>	22
Cuadro 8. Supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en cálices frescos y deshidratados de jamaica.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cáliz de jamaica maduro para cosecharse.	7
Figura 2. Despique con dedal de cálices de jamaica en la misma parcela de cultivo.	8
Figura 3. Cosechadora rustica de cálices de jamaica, llamada por los productores 'Estaca'	9
Figura 4. Determinación de pH (potenciómetro Digital, modelo 120).	30
Figura 5. Determinación de humedad en cálices de la variedad 'Rosalíz'.	30
Figura 6. Determinación de humedad en cálices de las variedades 'Criolla de Guerrero', 'Alma Blanca' y 'Sudán'.	30
Figura 7. Preparación del inóculo de <i>Salmonella typhimurium</i>	31
Figura 8. Inoculación de cálices frescos de las tres variedades de jamaica con <i>Salmonella typhimurium</i> (7.01 log UFC mL ⁻¹).	32
Figura 9. Inoculación de cálices de plantas <i>in situ</i> de la variedad 'Rosalíz' con <i>Salmonella typhimurium</i>	34
Figura 10. Evaluación de la supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en cálices frescos y deshidratados de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero', 'Sudán' y 'Rosalíz'.	35
Figura 11. Crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> en medio de agar nutritivo con rifampicina, (5 µg mL ⁻¹).	38
Figura 12. Colonias de <i>Salmonella typhimurium</i> recuperadas de cálices frescos de jamaica de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán'.	41
Figura 13. Supervivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en cálices de jamaica en pre-cosecha y postcosecha de la variedad 'Rosalíz' cultivada en invernadero.	42

Figura 14. Colonias típicas de *Salmonella typhimurium* recuperadas de cálices frescos en plantas de jamaica de la variedad 'Rosalíz' 43

Figura 15. Contenido de humedad en los cálices de jamaica pre-cosecha y postcosecha de la variedad 'Rosalíz' cultivada en invernadero. 44

INTRODUCCIÓN

En décadas recientes, las frutas, las verduras frescas, los vegetales de hojas verdes y otros alimentos con bajo contenido de humedad tales como: nueces (Kokal y Thorpe; 1969), almendras (Hall *et al.*, 1967; Banwart, 1982), chocolate y chiles deshidratados (Francis *et al.*, 2012), se han reportado como reservorios de bacterias enteropatógenas (Warriner *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2010; Flynn, 2010; Podolak *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2012; Gruzdev *et al.*, 2012). *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, conocida como *Salmonella typhimurium* y coliformes fecales, son los patógenos reportados con mayor frecuencia (Kim *et al.*, 2011).

La contaminación por estas bacterias se asocia con prácticas sanitarias deficientes en la unidad de producción y con instalaciones de almacenamiento de mala calidad (Tyler y Triplett, 2008; Podolak *et al.*, 2010), condiciones similares a las que se presentan en México en los lugares donde se producen cálices de jamaica. Como muchos productos hortofrutícolas, este cultivo está expuesto a contaminarse por diversos microorganismos debido a las condiciones generadas durante su producción, cosecha, deshidratado y almacenamiento (Hulchison *et al.*, 2008). En el Estado de Guerrero la cosecha de cálices consisten en separar la flor de la planta en forma manual o mecánica. La cosecha manual se puede llevar a cabo por diferentes métodos: desprendiendo el cáliz uno por uno con una especie de dedal y utilizando una especie de horqueta (estaca) hecha de madera. Las actividades postcosecha incluyen las labores de secado la cual se lleva a cabo en banquetas, pisos, azoteas o en el suelo; limpieza, selección, empaque y almacenaje donde los cálices son llevados directamente a centros de acopio y almacenes, en los cuales no se toman medidas higiénicas ni Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) las cuales reducen al máximo las probabilidades de contaminación biológica (Brandl, 2006). Estos sistemas son

importantes en el caso de los productos cortados, los cuales debido a los proceso de corte requieren una alta manipulación, que los hace vulnerables a la contaminación microbiológica y aumentan en el consumidor los riesgos de padecer enfermedades transmitidas por los alimentos (Castro *et al.*, 2004).

Los cálices de jamaica se consumen en su mayoría como bebidas, en jugos, aguas frescas e infusiones las cuales han pasado por un proceso de cocción previo. Sin embargo, en algunas regiones los cálices son consumidos frescos como adorno en platillos y ensaladas (Galicia *et al.*, 2008). Hulchison *et al.* (2008), Santiago *et al.* (2009) y Fatica y Schneider (2011) señalan que el consumo de productos frescos o deshidratados que requieren un procesamiento mínimo puede constituir un riesgo potencial para la salud, incluso si se contamina con niveles bajos de *Salmonella*.

En años recientes la globalización del comercio de alimentos obliga tanto a los países importadores como exportadores a reforzar sus sistemas de control de alimentos basados en los perfiles de riesgo, que consideren principios de carácter científico y que abarquen todos los actores de la cadena (Agatangelo, 2007).

Hasta ahora es difícil determinar hasta qué punto estos microorganismos están presentes en los cálices de jamaica ya que no se han llevado a cabo estudios para evaluar la calidad sanitaria de los mismos. Así mismo, no hay reportes de investigaciones donde se haya evaluado la supervivencia de estas bacterias, en especial de *Salmonella* sp en los mismos.

Para abordar los problemas planteados, en esta investigación se llevaron a cabo dos experimentos con los objetivos siguientes:

OBJETIVOS

- a) Definir la calidad sanitaria de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) deshidratados de las variedades 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' provenientes de centros de acopio y almacenes particulares, en Ayutla, Guerrero.
- b) Determinar la supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices deshidratados de tres variedades de jamaica 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' provenientes de centros de acopio y almacenes particulares, en Ayutla, Guerrero.
- c) Evaluar la supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices frescos de tres variedades de jamaica 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' y cálices frescos en planta y deshidratados de la variedad 'Rosalíz'.

HIPÓTESIS

- Considerando el manejo poco higiénico de los cálices de jamaica en postcosecha y durante el almacenamiento que practican los productores en la región de Ayutla, Guerrero, es factible la presencia de *Salmonella* y otras bacterias indicadoras de contaminación como los coliformes en los cálices de jamaica deshidratados.
- *Salmonella typhimurium* puede sobrevivir en cálices frescos y deshidratados de las variedades de jamaica producidas en México 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero', 'Sudán'. y 'Rosalíz', desde la cosecha y durante el almacenam

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen, Distribución y Ecología de la jamaica

Hibiscus sabdariffa Linn. es originaria de África, ha sido cultivada en Sudán desde hace 6000 años y utilizada en su mayoría como té. Esta planta fue domesticada en Asia para usarse como fibra e introducida a India y América el Sur en el siglo 17. Existen reportes de este cultivo en, India, Sri Lanka, Thailandia, Malasia e Indonesia en los comienzos de siglo 20 (Morton, 1987). Actualmente se cultiva en regiones tropicales y subtropicales como el Caribe, América Central, India, África, Brasil, Australia, Hawaii, Florida y Filipinas (Mahadevan *et al.*, 2013). Se cree que en México fue introducida por los españoles en la época colonial (Galicía-Flores *et al.*, 2007).

El clima tropical cálido y húmedo es adecuado para el desarrollo de las plantas de jamaica, ya que son excepcionalmente susceptibles a las heladas y la niebla. El rango de temperaturas en el que prospera oscila entre 18 y 35°C, con un óptimo de 25°C. El crecimiento de la planta cesa a 14°C. En las regiones tropicales y subtropicales, una altitud de 3000 pies (900 m) sobre el nivel del mar es adecuada para el cultivo de esta planta. La precipitación anual entre 400 y 500 mm es necesaria para su crecimiento. Es una planta de fotoperiodo corto que es muy sensible a la luz. En los primeros 4 a 5 meses de su crecimiento, requiere de una fase de luz diaria de 13 horas. Los suelos bien drenados y ricos en humus y suelos fértiles con un pH de 4,5 a 8,0 son óptimos para su crecimiento. Tolera las inundaciones y fuertes vientos (Qi *et al.*, 2005).

Clasificación taxonómica de la jamaica

El nombre científico de la jamaica es *Hibiscus sabdariffa L.*, en 1753 Linneo, ubicó el género *Hibiscus* en la familia malvácea. Esta se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Mahadevan *et al.*, 2009).

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Super-división	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Suborden	Malvinas
Familia	Malvaceae
Género	<i>Hibiscus</i>
Especie	<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>

Es conocida con varios nombres comunes entre los cuales se tienen; en español: jamaica, flor de jamaica, rosa de jamaica, rosa de Guinea, saril, chiriguata; en portugués: azed de Guiné, cucurú azédo. En regiones de habla inglesa es llamada roselle, red sorrell, Jamaica sorrell, Indian sorrell; en francés se conoce como: roselle, oseille rouge, oseille de Guinée. En África del Norte y el Cercano Oriente recibe el nombre de karkadé o carcadé y en Senegal se llama bisap (Ansari *et al.*, 2013).

Características morfológicas

Hay más de 300 especies tropicales y sub-tropicales de jamaica (Mahadevan *et al.*, 2009).

Es una planta anual de 1.5 a 2 metros de altura promedio, lo que puede cambiar según la variedad, fertilidad del suelo y condiciones de manejo. Presenta una raíz pivotante que se deforma fácilmente en suelos pesados (Ansari *et al.*, 2013).

Las flores se presentan solitarias en las axilas de las hojas y tallos, miden aproximadamente de 6 a 12 centímetros de ancho, las hojas son simples, alternas, deciduas; ovadas o lanceoladas-oblongas, no divididas en tres a cinco lóbulos, ápice truncado con márgenes dentados o serrados de color verde con nervaduras rojas; envés con una glándula característica en su base, peciolo largo, delgado con terminación gruesa en la base de la hoja, siendo las hojas inferiores enteras y lanceoladas y las superiores palmeadas (Mahadevan *et al.*, 2009). Cáliz con cinco lóbulos profundos de forma irregular de 1.2 cm a 4.0 cm de largo, adquiriendo características carnosas después de la antesis y su nervadura central marcada, con una glándula en la base del lóbulo, pubescencia fina en el interior de los lóbulos; el apicáliz puede ser de un rojo brillante, verde o casi blanco dependiendo de la variedad (Rendón-Aguilar, 1992). Los frutos son capsulas en forma ovoide, obtusos, ligeramente pilosos, conteniendo numerosas semillas reniformes, pubescentes con hilo rojizo las cuales tardan en desarrollarse de 3 a 4 semanas, abriéndose en cinco partes cuando maduran (Carvajal *et al.*, 2006).

Cosecha de los cálices

A nivel de campo existen varios indicadores en la planta que avisan cuando cosechar los cálices, entre ellos se destaca; tamaño alcanzado, separación de las brácteas que dejan ver la cápsula, color rojo intenso (Figura 1), estado fisiológico de la planta (edad del cultivo,

maduran antes que la planta marchite o pierda más del 50 % de todas sus hojas). En áreas pequeñas, la cosecha se realiza en varias fases o corte, según desarrollo de los cálices. En áreas mayores puede extraerse totalmente la planta (Contreras *et al.*, 2009).



Figura 1. Cáliz de jamaica maduro para cosecharse.

Fuente: Javier Hernández Morales

Los cálices frescos con tonalidad roja se cosechan después de que la flor ha caído pero antes de que las cápsulas se sequen y abran. Prolongar la cosecha puede ocasionar que los cálices disminuyan su calidad por exposición al sol y daños por enfermedades.

Para el caso de material precoz, la cosecha se debe realizar a fines de noviembre a diciembre y para materiales tardíos de fines de diciembre a enero. El método de cosecha practicado en su mayoría por los campesinos, consiste en cortar con machete o coa toda la planta desde el tallo principal, se junta en montones y en ocasiones se transporta a las casas para cosechar el cáliz (Contreras *et al.*, 2009). Esta cosecha o “despicado” consisten en separar la flor de la planta en forma manual o mecánica. En el Estado de Guerrero, la cosecha manual se puede llevar a cabo por dos diferentes métodos:

1. Despique con dedal, este método nos proporciona una jamaica limpia de basura y semillas como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2. Despique con dedal de cálices de jamaica en la misma parcela de cultivo.
Fuente: Javier Hernández Morales**

2. Utilizando una especie de horqueta (estaca) hecha de madera por las cuales se hacen pasar las ramas con el fin de desprender la parte que se va a aprovechar; este método es rápido y ahorra mano de obra, pero deja en los cálices extraídos desechos de la cápsula o fruto (Figura 3). Sin embargo, cabe la probabilidad de que este sea un punto crítico de contaminación de los cálices por microorganismos patógenos debido a la poca higiene con la que los trabajadores manipulan el producto.



Figura 3. Cosechadora rustica de cálices de jamaica, llamada por los productores ‘Estaca’.

Fuente: Javier Hernández Morales

Manejo postcosecha

Las actividades postcosecha incluyen las labores de secado, limpieza, selección, empaque, almacenaje y comercialización de los cálices. En toda región productora de jamaica los productores llevan a cabo el secado de los cálices en banquetas, pisos, azoteas o en el suelo lo que hace que el producto sea menos apreciado por los consumidores, ya que en este proceso se contamina con la tierra o cualquier otra impureza. Tres días con intenso sol son suficientes para el secado, los cálices deben voltearse todos los días hasta perder el 90% de su peso y quedar con un 12% de humedad para su conservación. De esta manera se encuentra lista para su almacenamiento y/o comercialización.

Composición Química

Márquez, (2008) sostiene que la planta de jamaica puede ser considerada una buena fuente de nutrientes, debido al contenido de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales distribuidos en diferentes proporciones según la porción de la planta y el grado de maduración de los frutos. En el Cuadro 1, se recopilan datos obtenidos por varios autores con respecto a la composición en macronutrientes (agua, grasa, proteínas, carbohidratos y fibra presentes en cálices frescos, observándose poca variación entre estos valores de referencia. Mientras que en el Cuadro 2, se ilustra la composición en micronutrientes, según lo reportado por varios autores (Duke, 1983; Naturland, 2000; Babalola *et al.*, 2001; USDA, 2004).

Cuadro 1. Composición química en macronutrientes para 100 g de cálices frescos, referida a varios autores.

Componente (%)	Duke, 1983	Naturland, 2000	Babalola <i>et al.</i>, 2001	USDA, 2004
Agua	84.50	--	86.50	86.58
Proteína cruda	1.90	2.0	17.40 (*)	0.96
Grasa cruda	0.10	0.1	2.10 (*)	0.64
Fibra cruda	2.30	--	8.50 (*)	--
Cenizas	1.20	--	6.5 (*)	0.51
Carbohidratos disponibles	--	10.2	--	11.31
Carbohidratos totales	12.30	--	--	--

(*) Valores reportados en base seca.

Fuente: Márquez, 2008.

Cuadro 2. Composición química en micronutrientes para 100 g de la porción comestible de la jamaica, referida a varios autores.

Componente (%)	Duke, 1983	Naturland, 2000	Babaloa <i>et al.</i>, 2001	USDA, 2004
Calcio (mg)	160	150.0	1583 (*)	215.0
Magnesio (mg)	--	--	316 (*)	51.0
Potasio (mg)	--	--	2060 (*)	208.0
Sodio (mg)	--	--	5.5 (*)	6.0
Hierro (mg)	2.90	3.0	37.8 (*)	1.48
Zinc (mg)	--	--	6.5 (*)	--
Fósforo (mg)	57.0	--	--	37.0
VITAMINAS				
Vitamina A	300 µg β-caroteno	--	--	287.0
Vitamina B1 (mg)	--	0.05	--	0.011
Vitamina B2 (mg)	--	0.07	--	0.28
Vitamina B2 (mg)	--	0.06	--	0.31
Vitamina C (mg)	14.00	17.00	63.50	12.00

(*) Valores reportados en base seca.

Fuente: Márquez, 2008.

Usos y Propiedades

La jamaica se cultiva para obtener cálices frescos que son deshidratados y que se utilizan principalmente para la preparación de bebidas frescas e infusiones, las cuales se ha reportado que tienen diversos efectos benéficos para la salud: bactericidas, antimicóticos, hipocolesterolémicos, diuréticos, antiinflamatorios, antihipertensivos, entre otros (Maganha *et al.*, 2010). El color rojo persistente en sus cálices que le da sabor y color a las bebidas preparadas e infusiones, se debe al contenido de antocianinas y el sabor ácido al contenido de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, málico y tartárico. También se conoce que contiene otros compuestos fitoquímicos tales como compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, caroteno y polisacáridos. Varias de estas moléculas son bioactivas en modelos biológicos y son las responsables de las propiedades funcionales asociados a los

extractos de esta planta, especialmente aquellas relacionadas con su acción antioxidante (Hirunpanich *et al.*, 2006). Los cálices presentan el nivel más alto de actividad antioxidante debido a la presencia de una mayor concentración de antioxidantes hidrosolubles, en relación a las semillas y hojas que muestran niveles intermedios y bajos, respectivamente (Hirunpanich *et al.*, 2005). El uso de extractos antioxidantes naturales, en este caso de jamaica, también podría ser una alternativa en la sustitución de antioxidantes sintéticos (tales como el butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol y butilhidroxiquinona por antioxidantes naturales (Wong *et al.*, 2006). Por otra parte, puede ser un valioso ingrediente en las industrias alimentaria como fuente importante de colorantes (Duangmal *et al.*, 2004) y fibra soluble (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007).

Importancia Económica de la jamaica

Los principales países productores de jamaica en el mundo son China, India, Sudán, Uganda, Indonesia, Malasia y México como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Producción y Rendimiento de la jamaica a nivel mundial.

País	Producción (t)	%	Rendimiento (ha) de cálices de jamaica deshidratados (Kg)
China	27, 200	27.76	2, 000
India	17, 550	17.91	1,500
Sudán	8, 920	9.10	910
Uganda	8, 230	8.40	730
Indonesia	6, 100	6.23	310
Malasia	5, 420	5.53	300
México	5, 030	5.14	291
Otros*	19, 525	19.93	N/A
Total	97, 975	100	

*Filipinas, Taiwan, Guinea, Angola, Estados Unidos, Nigeria, El Salvador y Guatemala
Fuente: FAO, 2013.

A nivel nacional, la superficie cultivada con jamaica es de aproximadamente 19 mil hectáreas, de las cuales se cosecharon alrededor de 5, 905.85 t de producto, con un valor de la producción de 151,030.44 miles de pesos, beneficiando a mas de 11 mil familias que

dependen de este cultivo (SIAP, 2014). En el Cuadro 4 se muestran los valores de producción de este cultivo a nivel nacional en el año 2013.

Cuadro 4. Producción de la jamaica en México por Estados y valores de producción.

Lugar	Estado	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento t/ha	Valor de la producción (miles de pesos)
1	Guerrero	13,494.50	13,494.50	3,839.38	0.29	56,830.32
2	Oaxaca	2,501.00	2,498.00	801.21	0.32	39,405.01
3	Michoacán	1,544.00	1,544.00	534.6	0.35	22,952.00
4	Nayarit	483.35	483.35	253.38	0.52	13,025.41
5	Puebla	439	439	472.05	1.08	26,163.00
6	Campeche	210	210	70.35	0.34	2,902.00
7	Colima	60	60	36	0.6	1,800.00
8	Jalisco	19.5	19.5	22.05	1.13	1,351.11
9	Veracruz	12	12	7.2	0.6	320.4
10	Edo. de México	2	2	1	0.5	38
11	Yucatán	1	1	0.5	0.5	11
	Total	18,766.35	18,684.35	6,037.72	0.32	164,798.25

Fuente: SIAP, 2014.

Importancia comercial

Los cálices de jamaica cuentan con un amplio mercado internacional, el principal destino al que se exporta es a Estados Unidos, Alemania, Francia, Japón y Canadá, quienes tienen un consumo per cápita de 2.5 Kg de jamaica al año (Fundación Produce Guerrero, 2004).

La demanda ha aumentado de manera constante durante las últimas décadas. En la actualidad, aproximadamente 15,000 toneladas entran en el comercio internacional cada año. Este cultivo tiene diferentes precios internacionales, dependiendo del lugar donde es cultivada, en general los precios van de \$1,200 dls a \$3,600 dls por tonelada métrica dependiendo de la calidad, tiempo de comercio y cantidad disponible. El mercado nacional se comporta de manera similar teniendo el precio máximo durante los últimos meses del año donde el precio por kilo llega a los \$59 pesos (SIAP, 2014).

Problemas de calidad

En las últimas décadas el cultivo de jamaica en México ha aumentado en importancia económica y comercial, surgiendo áreas para la producción orgánica y la exportación. Este cultivo es tolerante a la sequía, relativamente fácil de cultivar, requiere de mano de obra intensiva para su proceso, y puede manejarse como parte de un sistema de cultivos múltiples. Además de forraje y fibra, se utiliza para otros fines. Sin embargo como cualquier cultivo, se enfrenta a diversos problemas en la producción primaria, a daños por lluvias excesivas, sequías, plagas y enfermedades; aunado a lo anterior, los costos de producción son elevados, principalmente por la cantidad de mano de obra requerida para su cosecha. El manejo inadecuado pre y postcosecha, así como su almacenamiento, son puntos críticos en el control de calidad, debido a la contaminación del producto y pérdida de inocuidad (Contreras *et al.*, 2009).

Salmonella

Morfología y Taxonomía

Salmonella es un género bacteriano, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Brenner *et al.*, 2000). Son gérmenes de forma bacilar, no formadoras de esporas, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos, aunque *S. pullorum*, *S. gallinarum* y algunas mutantes de otras serovariedades son inmóviles. Gramnegativos, de 0.7-1.5 x 2.0-5 μm (Terragno *et al.*, 2003). aerobios-anaerobios facultativos, fermentan la glucosa con producción de gas. No fermentan la lactosa. Reducen nitratos a nitritos. Suelen ser catalasa positivas y oxidasa negativos. Forman colonias típicas sobre medios de cultivo sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas (Pascual y Calderón, 2000).

La mayoría de las cepas, salvo *S. typhi*, son aerógenas, utilizan citrato como única fuente de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno. La reacción de rojo de metilo es positiva, la prueba de Voges- Proskauer es negativa y la prueba del indol es negativa. La fenilalanina no es desaminada, la urea no es hidrolizada, la gelatina no es licuada rápidamente en los medios nutritivos y no son producidas ni DNAasa ni lipasa (Fatica y Schneider, 2011). En el *Bergey's Manual* (Brenner *et al.*, 2000) el género se subdivide en cinco subgéneros, basados en la hibridación DNA/DNA, en las características bioquímicas y en el sitio habitual donde se aíslan. El subgénero I contiene las *Salmonellas* patógenas típicas que se aíslan en el contenido intestinal de los animales de sangre caliente. Los subgéneros II y III, que incluyen los organismos anteriormente denominados *Arizona*, se aíslan frecuentemente en los animales de sangre fría. Los subgéneros IV y V se encuentran principalmente en el ambiente y rara vez se identifica como patógenos para los seres humanos. Posteriormente se propuso que *Salmonella* se designase a una especie única, *Salmonella entérica*, subdividida en siete subespecies (Brenner *et al.*, 2000) que se diferencian entre si mediante la hibridación DNA/DNA o por las propiedades bioquímicas. Estas siete subespecies son: subesp. *entérica* (I), subesp. *salamae* (II), subesp. *arizonae* (*arizonae* IIIa monofásica), subesp. *diarizonae* (*arizonae* III difásica) subesp. *houtenae* (IV), subesp. *bongori* (V), subesp. *indica* (IV). Las cuatro primeras subespecies se corresponden con la clasificación Kaufmann. Cada especie se divide en serovariedades basadas en los antígenos O y H. Han sido identificadas aproximadamente 2.200 serovariedades de *Salmonella* spp., aunque de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White son posibles 20.000 combinaciones (Figuroa, 2005). En este esquema las serovariedades se definen por medio de una serie de números y letras que representan 64 antígenos O (somáticos), Vi (capsulares) y H (flagelares) diferentes. Las

determinaciones genéticas de los factores antigénicos suelen ser estables y, por esta razón, resultan útiles en las investigaciones epidemiológicas. Sin embargo, existen algunas serovariedades plásmido-dependientes, y por tanto se les atribuye un menor valor epidemiológico por su menor estabilidad antigénica. Las serovariedades se pueden subdividir por las características bioquímicas (biovariedades o biotipos), por la resistencia a bacteriófagos (fagovariedades o lisotipos), a los antibióticos o metales pesados, y por la producción de bacteriocinas o por la producción de estas. En algunos casos dichas características pueden depender del DNA extracromosómico, pero suelen ser estables durante el tiempo que dura un brote transmitido por alimentos (Doyle *et al.*, 2000).

De acuerdo a Terragno *et al.*, (2003) la clasificación taxonómica de *S. entérica* subesp. enterica serotipo *typhimurium* es la siguiente.

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Especie: *entérica*

Subespecie: *entérica*

Serotipo: *typhimurium*.

En la literatura científica las formas aceptables de escribir el género y la especie para el ejemplo anterior son: *S. entérica* subesp. *entérica* Typhimurium, *S. Typhimurium* y *Salmonella typhimurium*.

Hábitat y fuentes de contaminación

La mayoría de los representantes del género *Salmonella* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, su hábitat natural es el tracto intestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos, bien como comensales (Terragno *et al.*, 2003). En el ambiente las bacterias pertenecientes a este género están presentes en los afluentes de los ríos, y heces secas de los animales, en el lodo residual de arroyos y aguas costeras, con el consiguiente riesgo de diseminación. En grupos de animales destinados al consumo humano, pueden permanecer viables durante varios meses y pueden ser diseminadas por aerosoles y el polvo, originando una contaminación ambiental acumulativa (D'Aoust, 1991). Recientemente varios serotipos de *Salmonella* se han asociado como epifitos y endófitos de algunas plantas y se han reportado contaminando numerosos productos hortofrutícolas (Sivapalasingam *et al.*, 2004; Warriner *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2010; Flyn, 2010; Podolak *et al.*, 2010; Gruzdev *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2012) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Brotes de salmonelosis asociados con el consumo de productos frescos en Estados Unidos.

Año	<i>Salmonella</i> <i>entérica</i> serovar	Vegetal	Referencia
1990	Javiana	Tomate	Sivapalasingam <i>et al.</i> , 2004
1991	Poona	Cantaloupe	CCP, 1991
1993	Montevideo	Tomate	CCP, 1993
1995	Stanley	Brotes de Alfalfa	Mahon <i>et al.</i> , 1997
1996	Montevideo	Brotes de Alfalfa	Taormina <i>et al.</i> , 1999
1995-1996	Newport	Brotes de Alfalfa	Van Beneden <i>et al.</i> , 1999
1998	Havana	Brotes de Alfalfa	Taormina <i>et al.</i> , 1999
1999	Baildon	Tomate	Cummings <i>et al.</i> , 2001
1999	Newport	Mango	Sivapalasingam <i>et al.</i> , 2003
2000-2001	Enteriditis	Mango	Mohle-Boetani <i>et al.</i> , 2009
2001	Saintpaul	Mango	Beatty <i>et al.</i> , 2004
2001	Poona	Tomate	CCP, 2002
2002	Newport	Tomate	Greene <i>et al.</i> , 2008
2004	Braenderup	Tomate	Gupta <i>et al.</i> , 2007
2005	Newport	Tomate	Greene <i>et al.</i> , 2008
2010	Typhimurium	Tomate	CCP, 2012
2010	Saintpaul	Chile serrano y jalapeño	Barton <i>et al.</i> , 2011

Fuente: (Fatica y Schneider, 2011)

En el cuadro 6 se indican algunos ejemplos de reportes de diferentes serotipos de *Salmonella* en diferentes cultivos, así como la fuente de contaminación.

Cuadro 6. Prevalencia de *Salmonella* en diferentes alimentos y ambientes.

Ambiente	Bacteria	Días	Referencia
Tejido vegetal			
Perejil	<i>Salmonella</i> spp.	231	Islam <i>et al.</i> , 2004
Tomate		9	Guo <i>et al.</i> , 2002
Rábano-plántulas	<i>S. typhimurium</i>	9	Jablasone <i>et al.</i> , 2005
Lechuga-plántulas		9	Jablasone <i>et al.</i> , 2005
Lechuga	<i>S. enterica</i>	3	Brandl y Amundson, 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>		21	Cooley <i>et al.</i> , 2003
Tomate		9	Kroupitski <i>et al.</i> , 2009
Tomate	<i>S. Montevideo</i>	49	Guo <i>et al.</i> , 2001
Agua			
Agua potable	<i>Salmonella</i> spp.	152	Guan y Holley, 2003
Agua de río	<i>S. typhimurium</i>	45	Santo Domingo, <i>et al.</i> , 2000
Suelo			
Suelo	<i>S. typhimurium</i>	60	Natving <i>et al.</i> , 2002
Suelo seco a 39°C		7	Zibilske y
Suelo húmedo		63	Warriner <i>et al.</i> , 2003
Estiércol			
Estiércol de vaca	<i>S. typhimurium</i>	48	Himathongkham <i>et al.</i> , 1999
Estiércol líquido de Vaca		60	Himathongkham <i>et al.</i> , 1999
Estiércol	<i>S. Newport</i>	184	You <i>et al.</i> , 2006
Estiércol con suelo sin Esterilizar		332	You <i>et al.</i> , 2006
Estiércol con suelo Esterilizado		405	You <i>et al.</i> , 2006
Estiércol de pollo		8	Himathongkham <i>et al.</i> , 1999
Composta			
Composta industrial	<i>S. typhimurium</i>	59	Podolak <i>et al.</i> , 2010

Patogenicidad de *Salmonella*

Las Salmonelosis humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoídicos con presencia de bacterias en la sangre, y por otro lado las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas. Algunas serovariedades (por ejemplo, *S. typhi*, *S. paratyphi* A., *S. paratyphi* C y *S. sendai*) están adaptadas al hombre como hospedante y generalmente causan síndrome septicémico-tifoideo en los seres humanos. Las demás serovariedades, sin embargo, causan gastroenteritis en el hombre. La fiebre tifoidea es muy común en algunos países en desarrollo, mientras que es rara en los países desarrollados en los que la gastroenteritis causada por *Salmonella* se encuentra entre las causas principales de morbilidad por consumo de alimentos. Las serovariedades implicadas varían de acuerdo con la zona geográfica, pero frecuentemente incluyen a *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. agona*, *S. newport*, *S. infantis*, *S. panama*, *S. saint paul* y *S. welteveden*. En la actualidad *S. enteritidis* ha llegado a ser la serovariedad predominantemente responsable de la enfermedad, seguida de *Salmonella typhimurium* (Fatica y Schneider, 2011).

La enterotoxina causante de diarrea figura de modo predominante como un factor de virulencia de *Salmonella* debido a su capacidad para producir síntomas clínicos manifiestos en los casos humanos de salmonelosis. Es una proteína termolábil con un peso molecular de 90 a 110 kDa (D'Aoust, 1991). En contraposición a varios patógenos bacterianos como *Yersinia*, *Shigella*, y cepas enteroinvasoras de *Escherichia coli*, que se multiplican dentro del citoplasma de las células hospedadoras, las salmonellas están encerradas en vacuolas

endocitóticas donde empieza la replicación bacteriana en un plazo de horas después de la interiorización (D'Aoust, 2000).

Población susceptible

Son muy sensibles los bebés y los niños de corta edad, las personas ancianas, las personas desnutridas y las personas con resistencia reducida debido a otras infecciones o a enfermedades crónicas. El sistema inmunológico desarrollado incompletamente en los recién nacidos y los niños, las respuestas inmunológicas débiles y/o retardadas en las personas ancianas y debilitadas, y la producción de ácido en el estómago, generalmente escasa en los niños y en las personas de edad, facilitan la colonización intestinal y la diseminación sistémica de las salmonellas en ese segmento de la población. Las muertes como consecuencia de salmonelosis se dan principalmente en las personas ancianas (Barton *et al.*, 2011).

Dosis infectante

Investigaciones detalladas de brotes transmitidos por alimentos han indicado que la ingestión de sólo unas cuantas células de *Salmonella* puede resultar infecciosa. Datos científicos indican que de 1 a 10 células pueden constituir una dosis infectiva humana (Kapperud *et al.*, 1990).

En la salmonelosis, los factores determinantes no están limitados a la heterogeneidad inmunológica en las poblaciones humanas ni a la virulencia de las cepas infectantes, sino que también influyen la composición química de los vehículos alimentarios implicados. El denominador común de los alimentos relacionados con dosis bajas fue el elevado contenido en grasa. La inclusión de salmonellas en el interior de las micelas de lípidos hidrófobos posiblemente puede proporcionar protección contra la actividad bactericida de la acidez gástrica (D'Aoust, 2000).

Características de crecimiento y de supervivencia de *salmonella*

El género *Salmonella* está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio (Fatica y Schneider, 2011).

En el Cuadro 7 están presentadas las condiciones límites de temperatura, pH y a_w para el crecimiento de *Salmonella*.

Cuadro 7. Condiciones limitantes para el crecimiento de *Salmonella*.

Condiciones	Mínima	Óptima	Máxima
Temperatura ° C	5.2	35-43	46.2
pH	3.8	7-7.5	9.5
a_w	0.94	0.99	>0.99

Temperatura

A pesar de un primer informe de crecimiento de salmonellas en natillas y en pollo en salsa rey inoculados a 45 °C (Angelotti *et al.*, 1991), la evidencia más reciente indica que la exposición prolongada de cepas mesófilas a condiciones de estrés térmico se traduce en mutantes de *Salmonella typhimurium* capaces de crecer a 54 °C (Podolak *et al.*, 2020). Aunque todavía no ha sido esclarecido el mecanismo de este fenómeno, los hallazgos preliminares indican que dos mutaciones independientes permiten a *Salmonella typhimurium* crecer activamente a 48 °C y a 54 °C (D'Aoust, 2000).

La viabilidad de las salmonellas en los alimentos secos almacenados a temperatura ≥ 25 °C disminuye con el aumento de la temperatura de almacenaje y con el aumento del contenido de humedad (D'Aoust, 1991). Si bien la termorresistencia de *Salmonella* spp. incrementa a medida que disminuye la a_w del medio de calentamiento, estudios detallados han demostrado que los solutos utilizados para modificar la a_w del medio de calentamiento desempeña un papel determinante en el nivel de resistencia adquirida (D'Aoust, 1991). El calentamiento. La mayoría de los serotipos no crecen a temperaturas $<7^{\circ}\text{C}$ de *Salmonella*

typhimurium en medio ajustado a a_w 0,90 con sacarosa y glicerol confirió niveles diferentes de termoresistencia (Uzzau *et al.*, 2000).

pH

La capacidad de adaptación fisiológica de *Salmonella* spp. se demuestra por su capacidad de multiplicarse a valores de pH que varían desde 3,8 hasta 9,5. Los efectos bacteriostáticos o antibacterianos de los medios ácidos dependen del acidulante (D'Aoust, 1991). De los ácidos orgánicos formados por los cultivos iniciadores en la carne, en los alimentos lácteos y en otros alimentos fermentados, y de los diversos ácidos orgánicos que se utilizan en la acidificación de productos, los ácidos propiónico y acético son más bactericidas que los ácidos láctico y cítrico asociados a los alimentos corrientes (D'Aoust, 2000). La primera investigación sobre la propensión para el crecimiento de Salmonellas en medios ácidos demostró que las cepas de tipo silvestre acondicionadas previamente en placas de gradiente de pH podían crecer en medios líquidos y sólidos a valores de pH considerablemente más bajos que las cepas originarias (Fatica y Schneider, 2011). La presencia de Salmonellas acidotolerantes en estos alimentos aumenta más el nivel del peligro de salud pública porque este rasgo fisiológico adquirido podría reducir al mínimo la actividad antimicrobiana de la acidez gástrica (pH 2,5) y favorecer la supervivencia de las salmonellas en el citoplasma ácido de los fagocitos mononucleares y polinucleares del hospedador humano (D'Aoust, 1991).

La exposición breve de *Salmonella typhimurium* a medios ligeramente ácidos de pH 5,5 a 6,0 (prechoque) seguida de la exposición de las células adaptadas al pH de valor $\leq 4,5$ (choque ácido) desencadena una compleja respuesta de acidotolerancia que potencia la supervivencia del microorganismos en medios sumamente ácidos (pH 3,0 a 4,0) (D'Aoust, 2000).

Coliformes fecales

Las *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas o grupo coli-aerogenes constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por los criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37 °C (Yousef y Carlstrom, 2003).

Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo coliformes forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*.

Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: suelo, plantas, etc. Aunque su especificidad como indicadores no es buena, se suelen usar como índice de contaminación fecal por: su frecuencia en heces, su fácil detección en el laboratorio y sus características semejantes, en algún aspecto, a las de algunos miembros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.

Dentro de este grupo, son los *coliformes fecales* los que tienen significado sanitario y, por consiguiente, los que más interesan en el análisis microbiológico de alimentos. Sus principales características son: aptitud para desarrollarse entre 43.5 a 45.5 °C, capacidad para crecer en presencia de sales biliares y facultad para producir indol en agua peptonada. En general, niveles altos de coliformes indican manipulación deficiente de los productos (Pascual y Calderón, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Calidad sanitaria de cálices de jamaica deshidratados (*Hibiscus sabdariffa* L.) en unidades de almacenamiento

Colecta de muestras

Se colectaron cálices deshidratados de las variedades 'Criolla de Guerrero' (45 muestras) y 'Sudán' (45 muestras) de centros de acopio y almacenes particulares del municipio de Ayutla, Guerrero. Un total de 90 muestras de cálices deshidratados se analizaron desde enero de 2012 a febrero de 2013.

Previo al análisis microbiológico, se determinó el pH de cada una de las muestras con un potenciómetro (Digital Modelo 120). Cada lectura se llevó a cabo 60 min después de la ebullición de los cálices en agua destilada. Para estimar la presencia de coliformes totales y *Salmonella*, se tomaron como referencia las normas NOM-113-SSA-1994 y NOM-114-SSA1-1994, respectivamente.

Detección de *Salmonella*

Preenriquecimiento

Cada muestra (200 g) se transportó en una bolsa de polietileno etiquetada (LabPlas[®]). El tiempo entre el muestreo y el análisis fue de 24 h. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo por triplicado. Una porción de 25 g de cálices se pesó (asépticamente y en envase estéril) y se colocó en una licuadora estéril con 225 mL de agua peptona tamponada a 0.1%, con pH 7.0 (AP). Se homogenizaron durante 1 minuto (se utilizó NaOH para ajustar el pH de la solución a 7.0).

Enriquecimiento selectivo

El homogenizado se incubó a 37 ± 2 °C, durante 24 h. Después de la incubación, se transfirió 1 mL de esta mezcla a dos tubos que contenían 10 mL de caldo base de tetracionato

(CBT) y dos tubos con caldo selenito cistina (CSC). Todas las muestras se mezclaron con cuidado y se incubaron a 37 ± 2 °C, durante 24 h.

Aislamiento en medios sólidos

A partir de los cultivos obtenidos en los distintos medios líquidos selectivos, se sembró por triplicado sobre agar-verde brillante-rojo fenol (BGA), agar-xilosa–lisina-desoxicolato (XLD), agar Hektoen (HE), agar sulfito bismuto (SB) y agar *Salmonella* y *Shigella* (SS); todas las placas sembradas se incubaron a 37 ± 2 °C, durante 24-48 h.

Las colonias típicas de *Salmonella* crecidas sobre agar BGA fueron de color rosado, transparentes, rodeadas de un halo rojo, al no fermentar la lactosa. Las bacterias fermentadoras de lactosa formaron colonias amarillo-verdosas al virar el rojo fenol del medio por producción de ácido.

Las colonias típicas de *Salmonella* crecidas sobre agar XLD se presentaron rojas con centros negros debido a un cambio de pH por fermentación de la xilosa y decarboxilación de la lisina. Los centros negros se debieron a la producción de SH₂. A veces no se formaron centros negros o, por el contrario, las colonias fueron negras casi por completo.

Las colonias crecidas sobre agar HE fueron verde azuladas, con centro negro o sin él. En este medio, las sales biliares inhibieron el crecimiento de la flora competitiva. La combinación del tiosulfato sódico con el citrato de hierro hizo que se manifestara un color negro en las colonias productoras de SH₂.

Las colonias típicas de *Salmonella* crecidas sobre agar SB mostraron un centro negro rodeado de un borde claro; bordeadas también de un precipitado negro con brillo metálico, por la reducción de iones de bismuto que se transforman en bismuto metálico. A veces, las colonias fueron marrones, grises o verdes. Por último las colonias típicas de esta bacteria crecidas en agar SS son fueron color rosa claro.

Posteriormente, se aislaron colonias con características típicas de *Salmonella* de cada uno de los medios de aislamiento selectivo utilizados a las cuales se les realizó tinción de Gram para observar características microscópicas de *Salmonella*.

Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas

Se sembraron las colonias sospechosas sobre agar nutritivo, contenido en placas de Petri. Se incubaron a 37 ± 2 °C durante 18-24 h. Se comprobó la pureza del cultivo mediante tinciones de Gram.

Prueba de la ureasa

A partir del cultivo reciente sobre agar nutritivo, se tomó masa bacteriana de una colonia con asa recta y se sembró abundantemente en tubos que contenían caldo urea. Se incubaron los tubos sembrados en baño María a 37 °C durante dos horas.

Caldo lisina-decarboxilasa

De cada una de las cepas crecidas en agar nutritivo, se tomó masa bacteriana de una colonia con un asa recta y se sembró, por picadura en el fondo y por diseminación en la superficie inclinada del medio agar lisina hierro (LIA). Se incubaron los tubos a 37 °C durante 48 h.

Fermentación de azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa)

Se sembró cada colonia en agar hierro triple azúcar (TSI), con asa de cultivo, primero en la superficie inclinada por diseminación y, luego en el fondo por picadura. Se incubó a 37 °C por 24 h.

Cuantificación de coliformes

Método del Número Más Probable (NMP)

A partir del homogenizado (1:10) que se utilizó para la detección de *Salmonella*, se prepararon las siguientes diluciones: 1:100, 1:1000 y 1:10 000 y para la prueba presuntiva se inocularon (1 mL) 9 tubos con caldo lauril sulfato triptosa (CLST) con MUG. Los

cultivos se incubaron a 37 °C por 48 h. Después de este tiempo se determinó visualmente la presencia de gas en los tubos Durham.

Investigación y recuento en medio sólido

Al mismo tiempo que se realizó la cuantificación de bacterias coliformes mediante la técnica del NMP, a manera de confirmación se llevó a cabo la cuantificación de estas mismas bacterias en medio de agar rojo violeta bilis (ARVB, marca Bioxon ®).

Experimento 2. Supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en postcosecha
Preparación de los cálices de jamaica

Los cálices, frescos y deshidratados, fueron de cuatro genotipos de jamaica que crecen en México: 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero', 'Sudán' (cosecha enero de 2013) y 'Rosalíz'. Los cálices de este último genotipo se obtuvieron de plantas *in vivo* sembradas en el invernadero del Colegio de Postgraduados, Montecillo, estado de México, en el mismo año.

Los cálices frescos se lavaron individualmente con agua destilada estéril y el exceso de humedad se eliminó con tela estéril (Hansaplast[®]), dentro de una campana de flujo laminar (Thermo Scientific[®]). Se utilizaron muestras de 0.4 g y la desinfección se realizó 1 h antes de la inoculación. El porcentaje de humedad se determinó de acuerdo con lo establecido en el método 10.004 de la AOAC (1980) (Figuras 5 y 6). El pH se midió con un potenciómetro (Digital, Modelo 120) como se muestra en las Figuras 4 y 5. La prueba se realizó por duplicado, tomando dos lecturas en cada repetición. Cada lectura se llevó a cabo 60 min después de la ebullición de los cálices en agua destilada.



Figura 4. Determinación de pH (potenciómetro Digital, modelo 120).



Figura 5. Determinación de humedad en cálices de la variedad 'Rosalíz'.



Figura 6. Determinación de humedad en cálices de las variedades 'Criolla de Guerrero', 'Alma Blanca' y 'Sudán'.

Origen de la cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), resistente a la rifampicina (Sanofi Aventis[®]). La cepa se mantuvo en tubos de ensayo inclinados, con agar nutritivo (Bioxon[®]) y 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de rifampicina a 3-4 ° C, con re-inoculaciones mensuales en caldo de soya tripticasa (CST) (Bioxon[®]).

Preparación del inóculo

Salmonella typhimurium se sembró por estrías en placa en agar nutritivo con 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de rifampicina de medio, se incubó 24 h, a 37 ± 2 °C, y se transfirió, en condiciones asépticas, a 50 mL de CST. El caldo inoculado se incubó 4 h, a 37 ± 2 °C, previa realización de la curva de crecimiento para *Salmonella typhimurium*. La suspensión de células se centrifugó 15 min a $2500 \times g$ y se lavó dos veces con solución fosfatada buffer (pH 7) (Strawn y Danyluk, 2010). La pastilla bacteriana quedó suspendida en 10 mL de solución. Se determinó sembrando por superficie en placas diluciones seriales de 10^{-1} – 10^{-6} del inóculo en agar nutritivo con rifampicina. La concentración definida para inocular a los cálices de jamaica frescos y deshidratados fue de 7.01 log UFC mL^{-1} , mientras que para inocular a las plantas *in vivo* fue de 6.3 log UFC mL^{-1} (Figura 7).

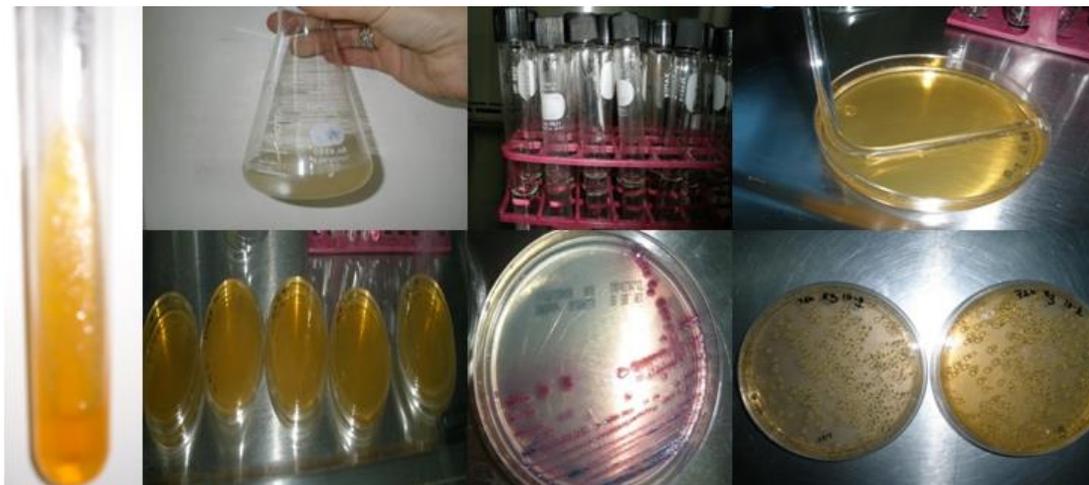


Figura 7. Preparación del inóculo de *Salmonella typhimurium*.

Inoculación en los cálices frescos

A cada cáliz fresco de las variedades 'Alma Blanca', 'Sudán' y 'Criolla de Guerrero' (0.4 g), sobre su superficie, se le colocaron 10 μL de inóculo ($7.01 \log \text{UFC mL}^{-1}$). Las muestras se mantuvieron en una cámara de flujo laminar, por 20 min, a temperatura ambiente, tiempo suficiente para que se secase el inóculo. Posteriormente, se colocaron dentro de bolsas de polietileno estériles (LabPlas[®]) y se mantuvieron en una incubadora, a una temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 8).



Figura 8. Inoculación de cálices frescos de las tres variedades de jamaica con *Salmonella typhimurium* ($7.01 \log \text{UFC mL}^{-1}$).

Inoculación en los cálices deshidratados

Cada cáliz deshidratado de las variedades 'Alma Blanca', 'Sudán' y 'Criolla de Guerrero' se inoculó con 10 μL ($7.01 \log \text{UFC mL}^{-1}$) de *Salmonella typhimurium* resistente a la rifampicina. Las muestras se mantuvieron en reposo, a temperatura ambiente, en una cámara de flujo laminar, por 15 min, tiempo suficiente para que reposara el inóculo. Después, las muestras se colocaron dentro de bolsas de polietileno estériles (LabPlas[®]) y se almacenaron en una incubadora, a una temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Inoculación en los cálices de plantas *in situ*

Cada cáliz fresco (peso=0.4 g) de la variedad 'Rosalíz' que estaban creciendo en invernadero, se inoculó superficialmente (*in vivo*) con 10 μL ($6.3 \log \text{UFC mL}^{-1}$) de una suspensión de células de *Salmonella typhimurium*, utilizando una micropipeta (Biohit[®]). Para simular el manejo usado por los productores de jamaica en la región de Guerrero, México, los cálices inoculados permanecieron en las plantas por 3 días a $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Se cosecharon asépticamente y se depositaron en bolsas de polietileno (LabPlas[®]) para su transporte al laboratorio donde se deshidrataron en una estufa de convección forzada (Shel Lab[®]), a $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 días. Posteriormente las muestras se dejaron a temperatura ambiente ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 23 días (Figura 9).



Figura 9. Inoculación de cálices de plantas *in situ* de la variedad 'Rosalíz' con *Salmonella typhimurium*. Evaluación de la supervivencia de *Salmonella typhimurium*

En cálices frescos y deshidratados de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán', se realizaron conteos de *Salmonella typhimurium* en el momento de la inoculación y, posteriormente, una vez por día, en los primeros cinco días, a 23 ± 2 °C (la temperatura promedio de las condiciones de almacenamiento en los puntos de venta en la Ciudad de México). Cada evaluación constó de tres repeticiones.

Cada cáliz fresco y deshidratado se lavó utilizando una solución buffer de fosfatos estéril (pH 7), utilizando una bolsa estéril de polietileno (LabPlas[®]), lo anterior se hizo asépticamente durante 2 min, en una cámara de flujo laminar. Después, se prepararon diluciones decimales, desde 10^{-1} a 10^{-5} (agua peptonada 0.01 %), y se sembró por extensión de superficie, aplicando 0.1 mL en placas que contenían agar nutritivo adicionado con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rifampicina. Todas las cajas sembradas se incubaron a 37 °C, durante 48 h. El

mismo procedimiento se llevó a cabo para los cálices frescos de plantas inoculadas *in situ*, cuyos conteos de células se hicieron en el momento de la inoculación y, después, al día siguiente y en los días 2, 3, 13 y 30 (se tomó como supuesto que este es el tiempo promedio en el cual la jamaica se encuentra en el mercado antes de su consumo) (Figura 10).



Figura 10. Evaluación de la supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices frescos y deshidratados de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero', 'Sudán' y 'Rosalíz'.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Calidad sanitaria de cálices de jamaica deshidratados (*Hibiscus sabdariffa* L.) en unidades de almacenamiento

Detección de *Salmonella* y presencia de bacterias coliformes en cálices de jamaica

Se encontraron cepas sospechosas de *Salmonella* en 20 % (18) de las 90 muestras de cálices analizadas. De estas cepas, 11% se encontraron en cálices deshidratados de la variedad 'Criolla de Guerrero' y 9% en la variedad 'Sudán'. De las cepas sospechosas, 17 dieron un resultado positivo a la tinción de Gram. Sin embargo, al realizar la identificación mediante el uso de pruebas bioquímicas, todas resultaron negativas para *Salmonella*. Adicionalmente, en ninguna de las muestras de los cálices de jamaica deshidratados de las variedades 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán', se detectó la presencia de bacterias coliformes. La ausencia de *Salmonella* y coliformes en los cálices de jamaica deshidratados de las variedades 'Criolla de Guerrero' y 'Sudan' probablemente podría atribuirse a la cantidad de compuestos fenólicos, como el etanol, los ácidos orgánicos, las proantocianidinas, los flavonoles, las flavonas, las isoflavonas y las antocianinas que están presentes en los cálices (Beuchat, 1998; Chao y Yin, 2009; Wong *et al.*, 2010; Dios *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2013), los cuales han demostrado tener propiedades antimicrobianas (Beuchat, 2002; Wong *et al.*, 2010) que inhiben el crecimiento de bacterias enteropatógenas (Heaton y Jones, 2008; Cai *et al.*, 2010). Cabe recalcar que al rehidratar los cálices con agua peptonada en la etapa de pre-enriquecimiento selectivo, se dañaron las células de los cálices y posiblemente liberaron los compuestos inhibidores de bacterias mencionados con anterioridad.

Un factor importante a tomar en cuenta para explicar el nulo crecimiento de *Salmonella* y coliformes en los cálices deshidratados, es debido a la cantidad de humedad presentes en estos (<16%). De acuerdo a Rendón (2014), los alimentos con un bajo contenido de

humedad como los cálices de jamaica deshidratados, presentan un bajo riesgo de transmisión de enfermedades. En los alimentos con bajo contenido de humedad la actividad del agua (humedad disponible) es demasiado baja para sustentar el crecimiento microbiano (FAO, 2008). En estudios realizados recientemente, dicho autor al evaluar la calidad sanitaria de cálices de jamaica frescos de la variedad Ayutla (Criolla de Guerrero) no encontraron indicios de la presencia de *E. coli* y *Salmonella*, estos resultados se atribuyeron a la baja cantidad de humedad y los niveles de pH ácidos. Francis *et al.* (2012), publicaron que el número de *Salmonella* en diversos alimentos deshidratados disminuye a medida que disminuye el a_w de los alimentos. Valores bajos de a_w tienen un efecto protector contra *Salmonella*.

En el Estado de Guerrero los cálices de jamaica se deshidratan al exponerlos al sol, alcanzando temperaturas mayores de 36°C. Berbesi *et al.* (2006), Kondo *et al.* (2006) y Knudsen *et al.* (2011), señalan que el crecimiento de las bacterias enteropatógenas es influenciado por la temperatura y exposición a rayos UV. Distintos estudios de inactivación térmica han revelado que *E. coli* es más sensible al calor que las cepas típicas de *Salmonella* spp. por esta razón, la exposición al sol que es suficiente para destruir *Salmonella* también pudo provocar la muerte de las bacterias coliformes (Agatangelo, 2007).

El pH ácido de los cálices es un factor fundamental que limita el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos (Brandi *et al.*, 2006). Abu- Traboush (1994) señaló que los extractos de cálices de jamaica tienen un efecto antimicrobiano sobre bacterias, debido principalmente a que presentan valores bajos de pH, además de otros compuestos inhibidores presentes. De igual manera, Alarcón *et al.* (2012) demostraron que, en condiciones ácidas, la capacidad de colonizar y subsistir de *Salmonella* sp. es muy baja o

casi nula. Así mismo, Gruzdev *et al.* (2011) no encontraron supervivencia de cepas de *Salmonella* sp. sometidas a varios grados de deshidratación, con valores de pH 3.0. Los valores de pH, para los cálices deshidratados de las variedades antes mencionadas, variaron de 2.41 a 2.73, valores de acidez que son inferiores al publicado por Gruzdev *et al.* (2011).

Experimento 2. Supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en postcosecha
Supervivencia de *Salmonella typhimurium* en los cálices deshidratados

La bacteria no sobrevivió en los cálices deshidratados de las variedades ‘Alma Blanca’, ‘Criolla de Guerrero’ y ‘Sudán’. Inmediatamente después de la inoculación de los cálices ($7.01 \log \text{UFC g}^{-1}$) no se detectaron colonias de *Salmonella typhimurium* en agar nutritivo con rifampicina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). La verificación de la presencia de dicha bacteria en los cálices, se realizó en el momento de la inoculación, sembrando en medio de agar nutritivo con rifampicina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) como se muestra en la Figura 11. La incapacidad de esta cepa para sobrevivir en extractos de cálices de jamaica ya se ha demostrado (Chao y Yin, 2009; Wong *et al.*, 2010; Dios *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2013), debido a que en los cálices se acumula una gran cantidad de compuestos fenólicos, como el etanol, los ácidos orgánicos, las proantocianidinas, los flavonoles, las flavonas, las isoflavonas y las antocianinas que inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas.

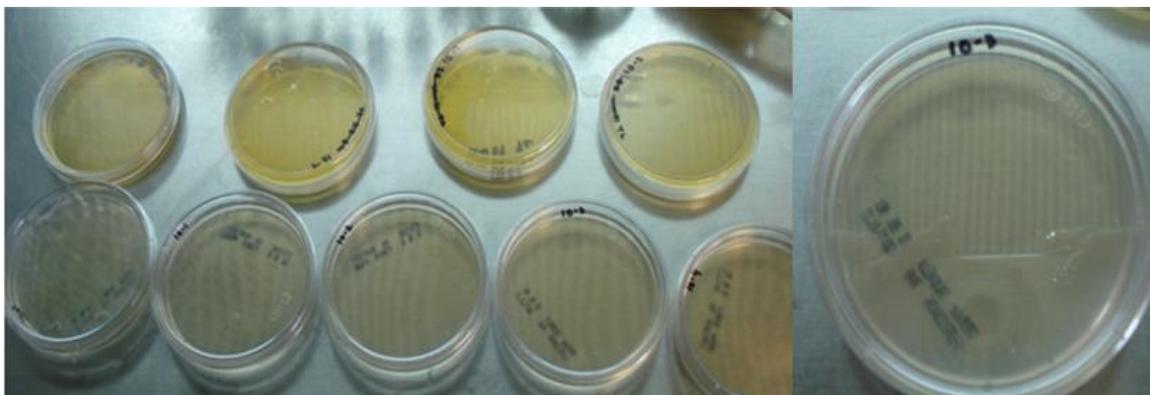


Figura 11. Crecimiento de *Salmonella typhimurium* en medio de agar nutritivo con rifampicina, ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Estos mismos factores influyen en la viabilidad de *Salmonella typhimurium* cuando se inocula en los cálices de jamaica de las variedades antes mencionadas. Además, cuando un tejido deshidratado se rehidrata, se destruyen sus células y se libera una gran cantidad de los compuestos presentes en los tejidos. Tomando en cuenta este principio, los cálices deshidratados, en el momento de entrar en contacto con el buffer de extracción (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ con pH 7), posiblemente liberaron los compuestos inhibidores de bacterias presentes en los cálices, lo cual disminuyó el crecimiento de *Salmonella typhimurium*.

Los cálices deshidratados de la variedad 'Criolla de Guerrero' presentaron el menor valor de pH (2.41) y el valor más alto correspondió a los cálices de la variedad 'Sudán' (pH, 2.73) y la variedad 'Alma Blanca', con un pH de 2.54. Los valores de pH registrados (2.41 y 2.73) fueron similares a los reportados por Salinas *et al.* (2012), los cuales fueron de 2.42 – 2.24, y por Morales *et al.* (2013), quienes determinaron un pH de 2.87, en las variedades 'Criolla' y 'Sudán'. El pH ácido de los cálices es otro factor que limita el crecimiento y la supervivencia de *Salmonella*. Abu- Traboush (1994) señaló que los extractos de cálices de *H. sabdariffa* tienen un efecto antimicrobiano sobre bacterias, debido principalmente a que presentan valores bajos de pH. De igual manera, Alarcón *et al.* (2012) demostraron que, en condiciones ácidas, la capacidad de colonizar y subsistir de *Salmonella* sp. es muy baja o casi nula. Así mismo, Gruzdev *et al.* (2011) no encontraron supervivencia de cepas de *Salmonella* sp. sometidas a varios grados de deshidratación, con valores de pH 3.0. Los valores de pH que se incluyen en el Cuadro 8, para los cálices deshidratados de las variedades antes mencionadas, variaron de 2.41 a 2.73, valores de acidez que son inferiores al publicado por Gruzdev *et al.* (2011).

En esta investigación, la nula supervivencia de *Salmonella* en los cálices, después de la inoculación, pudo ser un efecto inhibitorio resultado de la liberación de compuestos químicos y el bajo pH de los cálices. Estudios recientes señalan la capacidad de *Salmonella* para adaptarse a entornos ácidos (tolerancia ácida); esta respuesta fenotípica se refiere a la resistencia a un aumento o a condiciones extremas de pH, después de la adaptación a los ambientes ácidos subletales (Koutsoumanis y Sofos, 2004). En general, los cambios fisiológicos implicados en la protección de las células incluyen síntesis de nuevas proteínas y cambios en la composición de ácidos grasos en su membrana celular (Koutsoumanis y Sofos, 2004). Esta tolerancia a la acidez se incrementa cuando la bacteria se somete a variación en la humedad y temperatura, cambio de medio de crecimiento y presencia de compuestos antimicrobianos (Mattick *et al.*, 2001; Gleeson y O’Beirne, 2005; Gruzdev *et al.*, 2011; Francis *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2012).

Cuadro 8. Supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices frescos y deshidratados de jamaica.

Variedad	Cáliz	†Log UFC mL ⁻¹ tiempo de incubación a 37 °C (h)						pH	HR%
		0	24	48	72	96	120		
‘Alma Blanca’	F¶	7.01	7.3	7.27	7.2	6.9	6.4	2.09	≥80.01
‘Criolla Guerrero’	F	7.01	7.1	6.8	6.6	6.3	5.9	1.86	≥89.52
‘Sudán’	F	7.01	6.9	7	7.1	6.7	6.1	1.79	≥84.7
‘Alma Blanca’	D⌘	7.01	0	0	0	0	0	2.54	≥13.8
‘Criolla Guerrero’	D	7.01	0	0	0	0	0	2.41	≥14.5
‘Sudán’	D	7.01	0	0	0	0	0	2.73	≥15.8
Control negativo	F y D	NC	NC	NC	NC	NC	NC¶		

† Los valores son el resultado promedio de tres repeticiones

¶ F, cálices frescos; D, cálices deshidratados; NC, sin crecimiento de bacterias.

Supervivencia de *Salmonella typhimurium* en los cálices frescos de jamaica

Después de inocular *Salmonella typhimurium* (7.01 log UFC g⁻¹) en cálices frescos de las variedades ‘Alma Blanca’, ‘Criolla de Guerrero’ y ‘Sudán’, se observó un incremento del número de células en todos los cálices frescos de las tres variedades. En cálices de la

variedad 'Alma Blanca' el crecimiento fue mayor, de 7.01 log UFC g⁻¹ a 7.3 log UFC g⁻¹, a las 24 h; después de este tiempo, la población descendió hasta 6.4 log UFC g⁻¹, a las 120 h (Cuadro 8). El crecimiento de *Salmonella* en los cálices frescos de la var. 'Criolla de Guerrero' fue de 0.09 log UFC g⁻¹ a las 24 h, luego se registró un descenso en el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, hasta 5.9 log UFC g⁻¹, después de 120 h de incubación. Respecto a los cálices frescos de la var. 'Sudán', la población de *Salmonella* disminuyó ligeramente en las primeras 24 h (0.11 log UFC g⁻¹), y se presentó un crecimiento moderado a las 48 h y 72 h (0.20 log UFC g⁻¹), para finalmente disminuir a un valor de 6.1 log UFC g⁻¹, 120 h después de la inoculación (Figura 12).

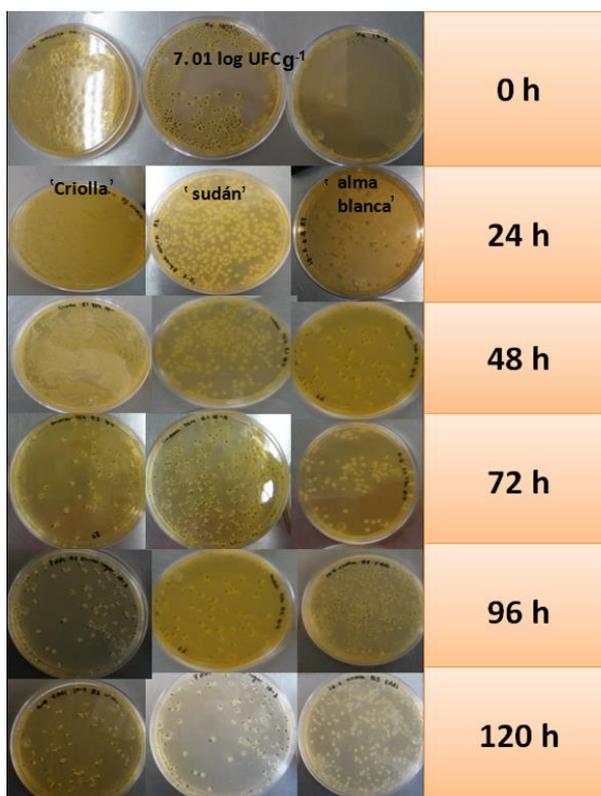


Figura 12. Colonias de *Salmonella typhimurium* recuperadas de cálices frescos de jamaica de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán'.

Supervivencia de *Salmonella typhimurium* en los cálices frescos y deshidratados en plantas de jamaica

En el momento de la inoculación, los cálices frescos de la variedad 'Rosalíz' contenían una humedad de 65.26%, la cual disminuyó gradualmente hasta llegar a 14.2%, a los 30 días. Se observó una correlación en la disminución del contenido de humedad de los cálices y la disminución de la población de *Salmonella typhimurium*, en el periodo antes mencionado, pasando de 6.3 log UFC g⁻¹ a 0.0 log UFC g⁻¹ (Figura 13).

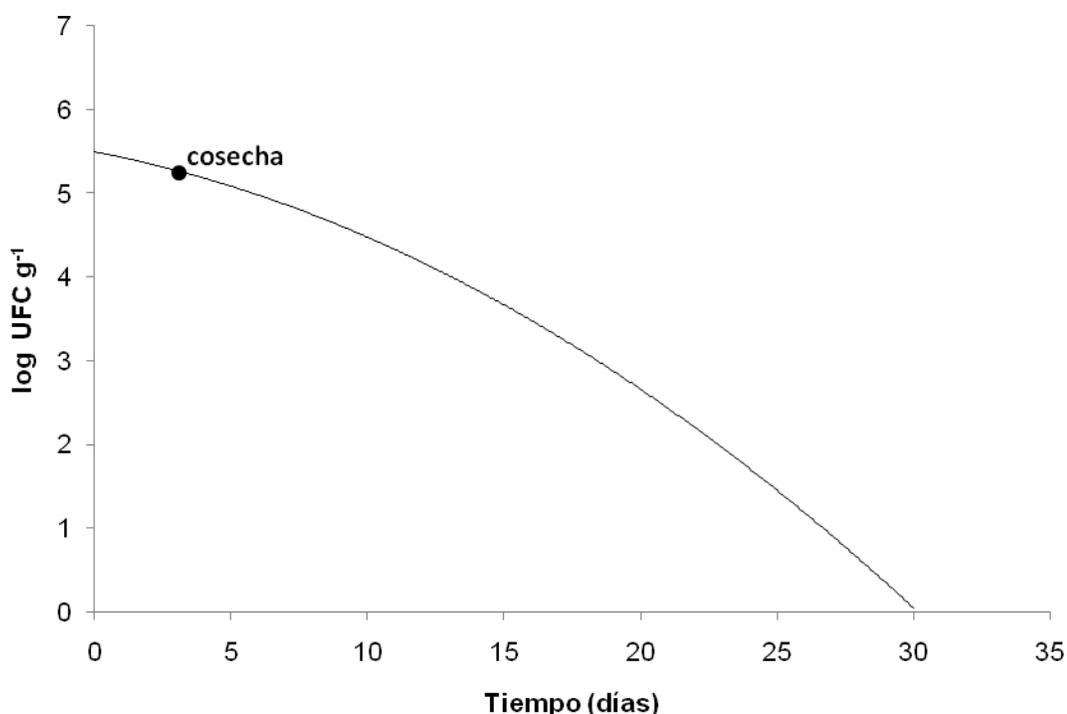


Figura 13. Supervivencia de *Salmonella typhimurium* en cálices de jamaica en pre-cosecha y postcosecha de la variedad 'Rosalíz' cultivada en invernadero.

Salmonella typhimurium sobrevivió por 3 días en cálices frescos de jamaica de la var. 'Rosalíz' inoculados (6.3 log UFC g⁻¹) en plantas *in situ* en invernadero (Figura 14). En este tiempo, el número de células disminuyó ligeramente en 1.5 log UFC g⁻¹ (Figura 15).

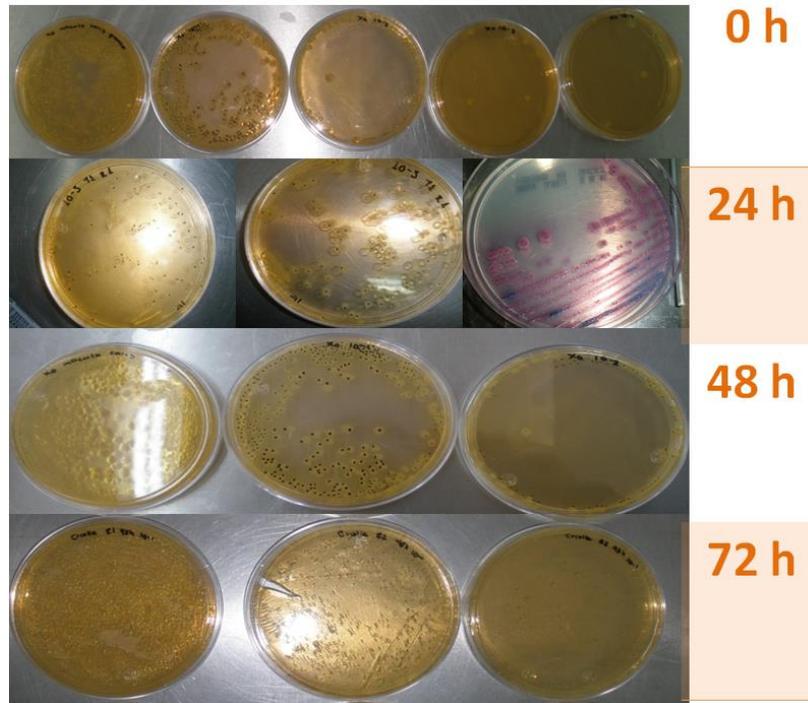


Figura 14. Colonias típicas de *Salmonella typhimurium* recuperadas de cálices frescos en plantas de jamaica de la variedad 'Rosalíz'.

Los cálices frescos de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero', 'Sudán' y 'Rosalíz' presentaron altos valores de humedad, 80.01, 89.52, 84.7 y 65.25%, respectivamente; estos datos coinciden con los publicado por Ortiz (2008), quien menciona que los cálices frescos de jamaica pueden contener gran cantidad de agua (89.92%), factor que es importante para que ocurran reacciones químicas y microbiológicas. En adición a esto, Gleeson y O'Beirn (2005) aseguran que el crecimiento de bacterias enteropatógenas se incrementa conforme existen altos contenidos de humedad en los productos frescos.

Como se mencionó antes, el proceso de deshidratación de los cálices de la variedad 'Rosalíz' fue lento, desde la cosecha hasta 27 días después (Figura 15). Al respecto, Gruzdev *et al.* (2012) señalan que cuando la tasa de deshidratación de un fruto o vegetal fresco es lenta, aumenta la supervivencia de bacterias, debido a que se sintetizan nuevos metabolitos en la célula que permiten una mejor adaptación al estrés durante la deshidratación. Lo anterior podría explicar la supervivencia de *Salmonella typhimurium* en

los cálices frescos de jamaica, durante los 30 días posteriores a la inoculación. Así mismo, Müller *et al.* (2012) encontraron que *Salmonella typhimurium* sobrevivió durante 112 días cuando existían porcentajes de humedad mayores de 80% y después de procesos de deshidratado.

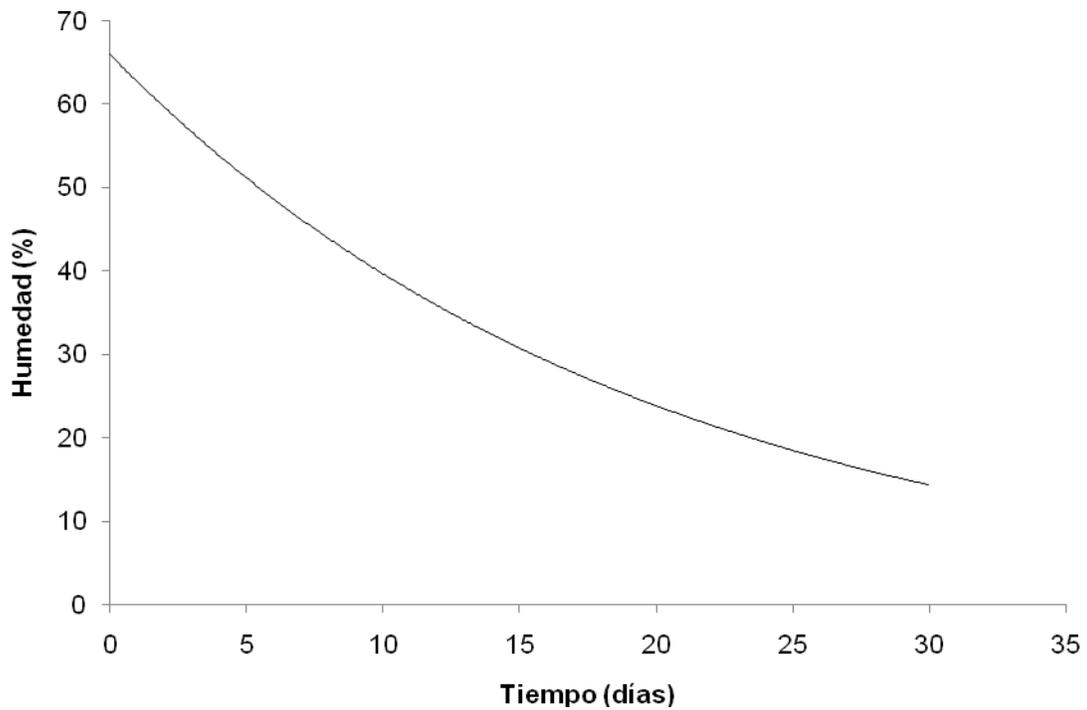


Figura 15. Contenido de humedad en los cálices de jamaica pre-cosecha y postcosecha de la variedad 'Rosalíz' cultivada en invernadero.

CONCLUSIONES

- No se detectó la presencia de *Salmonella* y bacterias *coliformes* en las 90 muestras analizadas de cálices de jamaica deshidratados de las variedades 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' provenientes de centros de acopio y almacenes particulares, en Ayutla, Guerrero.
- *Salmonella typhimurium* no sobrevivió en los cálices deshidratados de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' procedentes de almacenes y centros de acopio de Ayutla, Guerrero.
- *Salmonella typhimurium* sobrevivió por 5 días después de la inoculación en los cálices frescos de las variedades 'Alma Blanca', 'Criolla de Guerrero' y 'Sudán' y por 3 días en cálices frescos de jamaica de la variedad 'Rosalíz' inoculados en plantas *in situ* en invernadero (precosecha) y hasta 27 días después de la cosecha.
- El pH de los cálices de jamaica y el contenido de humedad son los factores determinantes para la supervivencia de *Salmonella typhimurium*. En los cálices deshidratados, el bajo pH limitó la supervivencia de *Salmonella typhimurium* y en los cálices frescos el efecto limitante de la acidez en la supervivencia de la bacteria fue menor.

LITERATURA CITADA

- Abu-Tarboush, H. M. 1994. Antibacterial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and its relation to pH. Egyptian Journal of Food Science 22: 317-322.
- Agatangelo, J.D. S. E. 2007. Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España 207 p.
- Alarcón C., N., R. Ariza F., A. Barrios A., D. Noriega C.H. y J. P. Legaria S. 2012. Exploración y caracterización morfológica de poblaciones de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) del estado de Guerrero, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3: 601-609.
- Angelotti, R., M. J. Foter y K. H. Lewis. 1991. Time-temperature effects on *Salmonella* and Staphylococci in foods. American Journal of Public Health 51: 76 – 88.
- Ansari, M., T. Eslaminejad, Z. Sarhadynejad y T. Eslaminejad. 2013. An Overview of the Roselle Plant with Particular Reference to Its Cultivation, Diseases and Usages. European Journal of Medicinal Plants 3: 135-145.
- Babalola, S., A. Babalola y O. C. Aworh. 2001. Compositional Attributes of the Calyces of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Journal of Food Technology in Africa 6: 133-134.
- Banwart, J. G. 1982. Microbiología Básica de los Alimentos. Ediciones Bellaterra, S. A., Barcelona, España 132 p.
- Barton, B. C., R. Mody, J. Jungk, L. Gaul, J. Redd y S. Chen. 2011. Outbreak of *Salmonella Saintpaul* infections associated with raw produce. New England Journal of Medicine 364: 918-27.
- Beatty, M. E., T. N. LaPorte, Q. Phan, S. V. Van Duyne y C. Braden. 2004. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Saintpaul infections linked to mango consumption: a recurrent theme. Clinical Infection Disease 38: 1337-8.
- Berbesi, M. E., R. V. Díaz, L. V. Guevara y M. S. Tapia. 2006. Calidad higiénica y patógenos asociados con melones mínimamente procesados expendidos en supermercados. I Simposio Ibero-Americano de vegetales frescos cortados. San Pedro Brazil 54 p.
- Berger, C. N., S. V. Sodha, R. K. Shawn, P. M. Griffin, D. Pink, P. Hand y G. Frankel. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environmental Microbiology 12: 2385-2397.
- Beuchat, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review, Food Safety Unit, World Health Organization, WHO/FSF/98.2. 42 p.

- Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and infection* 4: 413-423.
- Brandi, G., Amaglani G., Schiavano G. F. De Santi M. y M. Sisti. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 69: 2274-2279.
- Brandl, M. T. 2006. Fitness of human enteric pathogens of plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology* 44: 367-392.
- Brandl, M y R. Amudson. 2008. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella entérica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2298-2306.
- Brenner, F. W., R. G. Villar, F. G. Angulo, R. Tauxe y B. Swamiathan. 2000. Guest Commentary. *Salmonella* Nomenclature. *Journal Clinical Microbiology* 14: 2465-2467.
- Cai, W., X. Gu y J. Tang. 2010. Extraction Purification, and Characterization of the Flavonoids from *Opuntia Milpa Alta* Skin. *Czech. Journal Food Science* 2: 88-116.
- Carvajal, O., S. Waliszewski y R. M. Infazón. 2006. Los usos y maravillas de la jamaica. *La Ciencia y el hombre revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana* 19: 20-25.
- Castro Del, C. D., C. Chávez Q., W. Rubio C. y J. B. Váldez T. 2004. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Revista Cubana de Salud Pública* 30 (1). En línea 12-11-2014. [http://scielosld.cu/scielo.php?pid=s086434662004000100009&acript=sci_arttext\\$tlng=en](http://scielosld.cu/scielo.php?pid=s086434662004000100009&acript=sci_arttext$tlng=en)
- CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). 1991. Multistate outbreak of *Salmonella poona* infections- United States and Canada, 1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991 40: 549-52.
- CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). 1993. Multi-state outbreak of *Salmonella* serotype Montevideo infections. *EPI-AID* 93-7.
- CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). 2002. Multistate outbreaks of *Salmonella* serotype *Poona* infections associated with eating cantaloupe from Mexico-United States and Canada, 2000–2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51: 1044-7.
- CDCP (Centers for Disease Control and Prevention) 2012. Annual year review. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html>.
- Chao, C. Y. and M. C. Yin. 2009. Antibacterial effects of roselle calix extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathogen Disease* 6: 201-206.

- Cooley, M. B., W. G. Miller y R. E. Mandrell. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4915-4926.
- Contreras, G. J. Á., R. J. M. Soto y C. A. Huchin. 2009. Tecnología para el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*L.) en Quintana Roo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Chetumal, Quintana Roo, México. Folleto Técnico No. 3. 48 p.
- Cummings, K., E. Barrett, J. Mohle-Boetani, J. Brooks, J. Farrar y T. Hunt. 2001. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. *Emerging Infectious Disease* 7: 1046-8.
- D'Aoust, J. Y. 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 12: 17-40.
- D'Aoust, J. Y., Doyle, M. P., Beuchat, L.R., y T. J. Montville. 2000. Especies de *Salmonella*. *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras*. Editorial Acribia, SA. Zaragoza. España 163 p.
- Dios L., A., E. Montalvo G., I. Andrade G. y J. F. Gómez L. 2011. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17: 77-87.
- Doyle, M. P., T. Zhao, J. Meng y S. Zhao. 2000. *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras*. Editorial Acribia, SA. Zaragoza. España 199 p.
- Duangmal, K., B. Saicheua y S. Sueeprasan. 2004. Roselle anthocyanins as a natural food colorant and improvement of its colour stability. In *Color and Paints, Interim Meeting of the International Color Association, Proceedings* 25: 155-158.
- Duke, J. 1983. *Handbook of Energy Crops*. unpublished. *Hibiscus sabdariffa* L. Documento en línea. Disponible en: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hibiscus_sabdariffa.html#Chemistry. Consulta: Octubre, 2014.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report. *Microbiological Risk Assessment Series* No. 14, Rome.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2013. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report. *Microbiological Risk Assessment Series* No. 11, Rome.
- Fatica, M. K. y K. R. Schneider. 2011. Survival in the plant environment and implications in food safety. *Foodborne Infections* 6: 573-579.
- Figuroa, V. 2005. Mecanismos moleculares de *Salmonella* sp. Review Article. *Revista latinoamericana de Microbiología* 7: 25-42.

- Flynn, D. 2010. Black pepper positive for *Salmonella*. In Food safety news. <http://www.foodsafetynews.com/2010/01/black-pepper-positive-for-outbreakstrain/>. (Consulta: junio, 2012).
- Francis, G. A., A. Galone., G. J. Nychas., J. N. Sofos., G. Gonelly., M. L. Amodio y G. Spano. 2012. Factors Affecting Quality and Safety of Fresh-Cut Produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 595-610.
- Galicia-Flores, L.A., Salinas-Moreno Y., Espinoza-García B.M., Sanchez-Feria, C. 2007. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Chapingo edo. de México 74 p.
- Galicia F., L. A., Y. Salinas M., B. M. Espinoza G. y C. Sánchez F. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 121-129.
- Gleeson, E. and D. O'Beirne. 2005. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control* 16: 677-685.
- Greene, S. K., E. R. Daly, E. A. Talbot, L. J. Demma, S. Holzbaver y N. J. Patel. 2008. Recurrent multistate outbreak of *Salmonella newport* associated with tomatoes from contaminated fields. *Epidemiological Infection* 136: 157-165.
- Gruzdev, N., R. Pinto y S. Shlomo. 2011. Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1667-1773.
- Gruzdev, N., R. Pinto y S. Shlomo. 2012. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. *Food Microbiology* 32: 415-422.
- Guan, T. Y. y R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness: a review. *Journal of Environmental Quality* 32: 383-392.
- Guo, X., J. Chen, R. E. Brackett y L. R. Beuchat. 2001. Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4760-4761.
- Guo, X., M. W. Man Iersel, J. Chen, R. E. Brackett y L. R. Beuchat. 2002. Evidence of Association of *Salmonellae* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3639-3643.
- Gupta, S. K., K. Nalluswami, C. Snider, M. Perch, M. Balasegaram y D. Burmeister. 2007. Outbreak of *Salmonella Braenderup* infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, 2004: a useful method for subtyping exposures in field investigations. *Epidemiology Infection* 135: 1165-73.

- Hall, H. E., D. F. Brown y R. H. Bordner. 1967. Examination of Market Foods for Coliforms Organisms. *Applied Microbiology* 15: 1062-1069.
- Heaton, J. C. y K. Jones. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology* 104: 613-626.
- Himathongkham, S., S. Bahari, H. Riemann y D. Cliver. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and manure slurry. *FEMS Microbiology Letters* 178: 251-257.
- Hirotoni, H., J. Naranjo, P. G. Motoyoqui y C. P. Gerb. 2002. Demonstration of indicator of microorganisms on surface of vegetables on the market in the United States and Mexico. *Food Microbiology and Safety* 67: 1847-1850.
- Hirunpanich, V., A. Utaipat, N. P. Morales, N. Bunyaphatsara, H. Sato, A. Herunsalee y C. Suthisisang. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of ethnopharmacology* 103: 252-260.
- Hirunpanich, V., A. Utaipat, N. P. Morales, N. Bunyaphatsara, H. Sato, A. Herunsalee, y C. Suthisisang. 2005. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) *in vitro* using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biological y pharmaceutical bulletin* 28: 481-484.
- Hulchison, M. L., S. M. Avery, and J. M. Monaghan. 2008. The airborne distribution of zoonotic agents from livestock waste spreading and microbiological risk to fresh produce from contaminated irrigation sources. *Journal Applied of Microbiology* 105: 848-857.
- Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner y X. Jiang. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure compost or irrigation water. *Applied of Environmental Microbiology* 70: 2497-2502.
- Jablasone J., K. Warriner y Griffiths. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. 2005. *International Journal of Food Microbiology* 99: 7-18.
- Kapperud, G., S. Gustavsen, I. Hellesnes, A. H. Hansen, J. Lassen, J. Hirn, M. Jahkola, M. A. Montenegro y R. Helmuth. 1990. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 2597-2601.
- Kim, S. Y., D. H. Kang, J. K. Kim, Y. G. Ha, J. Y. Hwang, T. Kim, and S. H. Lee. 2011. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal Food Science* 76: 41-46.

- Knudsen, D. M., S. A. Yamamoto y J. L. Harris. 2011. Survival of *Salmonella spp* and *Escherichia coli* O: 157:H7 on fresh and frozen strawberries. *Journal Food Protection* 64: 1483-1488.
- Kokal, D. y D. W. Thorpe. 1969. Occurrence of *Escherichia coli* in Almonds of Nonpareil Variety. *Food Technology* 23: 227-232.
- Kondo, M., M. Murata y K. Isshiki. 2006. Efficiency of sodium hypochlorite fumaric acid and mild head in killing native microflora and *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT104 and *Staphylococcus aureus* attached to fresh-cut lettuce. *Journal of Food Protection* 69: 323-329.
- Koutsoumanis, K. P. and J. N. Sofos. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* 38: 321-326.
- Maganha, E. G., R. D. C. Halmenschlager, R. M. Rosa, J. A. P. Henriques, A. L. L. D. P. Ramos y J. Saffi. 2010. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry* 118: 1–10.
- Mahaderan, N., Shivali y P. Kamboj. 2009. *Hibiscus sabdariffa* Linn. *Natural Product Radiance* 8: 77-83.
- Mahon, B. E., A. Ponka, W. N. Hall, K. Komatsu, S. E. Dietrich y A. Siitonen. 1997. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Journal Infection Disease* 175: 876-82.
- Márquez, O. S. 2008. Composición en Macronutrientes, Minerales y Metales Pesados en Cálices de Jamaica cultivada en el Estado Monagas. *Revista Voces: Tecnología y pensamiento* 3 (1-2): 61-75.
- Mattick, K. L., F. Jorgensen, P. Wang, J. Pound, M. H. Vandeven, L. R. Ward, J. D. Legan, H. M. Lappin-Scott, and T. J. Humphrey. 2001. Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of *Salmonella* serovars at low water activity. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4128-4136.
- Mohle, B. J. C., J. Farrar, P. Bradley, J. D. Barak, M. Miller y R. Mandrell. 2009. *Salmonella* infections associated with mung bean sprouts: epidemiological and environmental investigations. *Epidemiology Infection* 137: 357-66.
- Morales C., M., J. Hernández, M., G. Leyva, R., Y. Salinas M., L. Soto R., and J. Castro R. 2013. Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research* 7: 2319-2322.
- Morton, J. F. 1987. Roselle. *Hibiscus sabdariffa* L. In *Fruits of Warm Climates* 25: 281–286.
- Müller, K., S. Aabo, T. Birk, H. Mordhorst, B. Bjarnadottir and Y. Agero. 2012. Survival and growth of epidemically successful and unsuccessful *Salmonella enterica* clones after freezing and dehydration. *Journal Food Protection* 3: 456-464.

- Naturland. 2000. Producción Ecológica de Hibisco. Documento en Línea. Disponible en: <http://www.bioplaguicidas.org/pppbgagtz/Documentos/biblioteca/Naturland/hibisco.pdf> Consulta: Marzo, 2014.
- Natving, E. E., S. C. Ingham, B. H. Ingham, L. R. Cooperband y T. R. Roper. 2002. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2737-2744.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación.
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Diario Oficial de la Federación.
- Ortiz S., M. 2008. Composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en cálices de jamaica cultivada en el estado monagas. *Revista Voces: Tecnología y Pensamiento* 3: 61-75.
- Pascual, M. R. y V. Calderón. 2000. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas (2ª Ed.). Díaz de Santos, S. A. Madrid. España 45 p.
- Podolak, R., E. Enache, W. Stone, D. G. Black y P. H. Elliott. 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low- moisture foods. *Journal of Food Protection* 73: 1919-1936.
- Qi, Y., K. L. Chin, F. Malekian, M. Berhame y Gager J. 2005. Biological characteristics, nutritional and medicinal value of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Circular- Urban Forestry Natural Resources and Environment* 55: 1-2.
- Rendón, E. B. 2014. Calidad Sanitaria y Microorganismos Antagónicos a *Corynespora cassicola* (Berk y Curt) Wei en Cálices Frescos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México 75 p.
- Salinas M., Y., A. R. E. Zuñiga H., L. B. Jiménez D., V. Serrano A. y C. Sánchez F. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18: 395-407.
- Santiago Q., C., O. R. Rodas S., C. R. Vázquez Q., F. Fernández., E. I. Quiñones R., and C. Vázquez S. 2009. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from México. *Journal Food Protection* 72: 1279-1282.
- Santo Domingo, J. W., S. Harmon y J. Bennet. 2000. Survival of *Salmonella* species in river water. *Current Microbiology* 40: 409-417.

- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. http://www.siap.gob.mx/agricola_siap/icultivo/index.jsp. Fecha de consulta: 6 de Enero de 2015.
- Sivapalasingam, S., E. Barrett, A. Kimura, S. Van Duyne, W. De Witt y M. Ying. 2003. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype *newport* infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfestations technology. *Clinical Infection Disease* 37: 1585-90.
- Sivapalasingam, S., C. Friedman, L. Cohen y R. Tauxe. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal Food Protection* 67: 2342-53.
- Strawn, L. K. and M. D. Danyluk. 2010. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International Journal of Food Microbiology* 138: 78-84.
- Taormina, P. J, L. Beuchat y L. Slutsher. 1999. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerging Infectious Disease* 5: 626-34.
- Tyler, H. L. and E. W. Triplett. 2008. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 46: 53-73.
- Terragno, R., M. A. I. Caffer, S. Bruno y N. Binsztein. 2003. Parte I: Aislamiento Identificación y Serotipificación de *Salmonella*. Manual de Procedimientos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Departamento de Bacteriología. Buenos Aires, Argentina 56 p.
- USDA. 2004. Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Hibiscus sabdariffa* L. Base de datos en línea del Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=HISA2&display=31>. Consulta: Mayo, 2014.
- Uzzau, S., O. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori y S. Bernard. 2000. Host Adapted Serotypes of *S. entérica*. *Epidemiology Infection* 125: 229-255.
- Van Beneden, C. A., W. E. Keene, R. A. Strang, D. H. Werver, A. S. King y B. Mahon. 1999. Multinational outbreaks of *Salmonella enterica* serotype *newport* infections due to contaminated alfalfa sprouts. *JAMA*. 281: 158-62.
- Warriner, K., S. Spaniolas, M. Dickinson, C. Wright y W. Waites. 2003. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal Applied Microbiology* 95: 719-727.

- Warriner, K., A. Hubber, A. Namvar, W. Fan, and K. Dunfield. 2009. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Advances in Food and Nutrition Research* 57: 155-208.
- Wong, S. K., Y. Y. Lim and E. W. C. Chan. 2010. Evaluation of antioxidant, anti-tyrosinase and antibacterial activities of selected *Hibiscus* species. *Ethnobot Leafl* 14: 781-796.
- You, T., S. C. Rankin, H. W. Aceto, C. E. Benson, J. D. Toth y Z. Dou. 2006. Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5777-5783.
- Yousef, A. E. y C. Carlstrom. 2003. *Food Microbiology A Laboratory Manual*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey 80 p.