



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CALIDAD SANITARIA DE JUGOS DE NOPAL, PERSISTENCIA DE *Salmonella typhimurium* Y RESPUESTA DE DEFENSA DE NOPAL VERDURA

PATRICIA LANDA SALGADO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2012

La presente tesis titulada Calidad sanitaria de jugos de nopal, persistencia de *Salmonella typhimurium* y respuesta de defensa de nopal verdura realizada por la alumna Patricia Landa Salgado bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

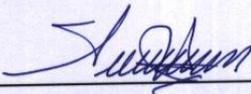
DOCTORA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

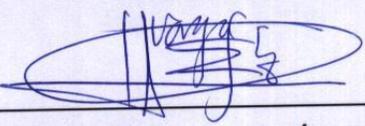
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

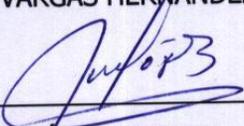
CONSEJERA


DRA. ANA MARÍA HERNÁNDEZ ANGUIANO

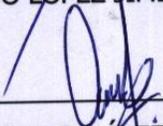
ASESOR


DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR


DR. ALFREDO LÓPEZ JIMENEZ

ASESOR


DR. CRISTOBAL CHAÍDEZ QUÍROZ

ASESOR


DR. JITU PATEL

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2012

CALIDAD SANITARIA DE JUGOS DE NOPAL, PERSISTENCIA DE *Salmonella typhimurium* Y RESPUESTA DE DEFENSA DE NOPAL VERDURA

Patricia Landa Salgado, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2012

RESUMEN

Durante las últimas dos décadas las infecciones por *Salmonella* se han registrado entre las enfermedades más frecuentes, afectando a personas de todas las edades y condiciones sociales y causando numerosas hospitalizaciones y muerte de personas por el consumo de frutas y hortalizas frescas. En frutas, en 2011 el Centro para el Control de Enfermedades y Prevención en EUA reportó un brote de infección por *S. Agona* asociado con el consumo de papaya fresca en el que 106 personas resultaron afectadas. Mientras que en hortalizas, *S. typhimurium* se ha aislado de diversas especies entre las que se encuentra el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) (Quiroz-Santiago, 2009; Hernández *et. al.* 2009).

Debido a que el nopal se consume en fresco para el control de algunas enfermedades como la diabetes y a que *Salmonella* ha mostrado capacidad para invadir e internalizarse en el tejido vegetal, los objetivos de este trabajo fueron: **1)** analizar la calidad sanitaria de jugos elaborados a base de nopal verdura fresco; **2)** determinar el potencial de internalización de *S. typhimurium* en plantas de nopal; y **3)** registrar la persistencia de *S. typhimurium* en suelo con planta de nopal en maceta así como en cladodios en planta y en cladodios precortados. Adicionalmente, **4)** determinar si plantas de nopal verdura responden hipersensitivamente a inoculaciones con *S. typhimurium*, ya que en observaciones preliminares se registraron cambios en la coloración del tejido de cladodios en planta infiltrados con la bacteria.

Se utilizaron plantas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* variedad Milpa Alta) de 9 meses, crecidas en macetas con suelo-vermicomposta, regadas con agua de pozo y mantenidas en invernadero a temperatura ambiente. Así como una cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium, resistente a Kanamicina (*S. typhimurium* St4-Km⁵⁰).

Un total de 162 muestras obtenidas mensualmente de expendios comerciales, durante julio de 2009 y junio de 2010, se procesaron de acuerdo a NOM-113-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994. De éstas el 84% registraron coliformes totales y *Escherichia coli*,

por lo que los jugos analizados se ubicaron en de la categoría de jugos con calidad microbiológica deficiente. Aunque se aislaron colonias sospechosas de *Salmonella*, éstas se confirmaron como *Proteus* sp., y *Citrobacter* sp.

S. typhimurium St4-Km⁵⁰ mostró incapacidad de internalización en plantas de nopal aunque persistió en suelo y cladodios por varios días. En suelo persistió por 14 días después de la inoculación (ddi). El decremento de la población bacteriana fue gradual pero constante hasta alcanzar niveles de 1 UFC/g a los 9 ddi. En cladodio madre en planta persistió por 14 ddi y el decremento de la población fue paulatino pero constante hasta alcanzar niveles de 1 UFC/g a los 9 ddi. En cladodio secundario en planta persistió por 9 ddi y la población decreció rápidamente durante las primeras 24 h hasta alcanzar niveles de 1 UFC/g a los 5 ddi. En cladodio secundario precortado persistió por 14 ddi pero registró un incremento paulatino en la población después de los 8 ddi.

En observaciones de tejido de cladodios madre y cladodios secundarios en planta se registraron lesiones circulares cafés en el sitio de infiltración de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰. También se identificaron síntomas de deshidratación de tejido pero solo en cladodios secundarios en planta y precortados. El inicio del desarrollo de las lesiones se registró a las 24 h después de la inoculación con la aparición de ligero oscurecimiento en el sitio de infiltración, tanto en cladodios madre como en cladodios secundarios, en planta y precortados. Sin embargo, entre los cladodios se registraron diferencias en el desarrollo de las lesiones, intensidad del oscurecimiento y aparición de deshidratación de tejido. Lo anterior indicó que *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ indujo una respuesta de defensa en nopal verdura, la cual se relacionó con la madurez del cladodio (cladodio madre versus cladodio secundario) así como con su condición fisiológica (cladodio en planta versus cladodio precortado). Como conclusión general se tiene que *S. typhimurium* tiene capacidad de persistir en nopal verdura y de inducir una respuesta de defensa en el tejido por lo que el monitoreo de la calidad del nopal verdura fresco y la implementación de Buenas Practicas Agrícolas y Buenas Practicas de Higiene son puntos importantes de control para reducir la contaminación de este cultivo.

Palabras clave: *Salmonella*, nopal, persistencia, respuesta de defensa nopal.

SANITARY QUALITY OF NOPAL JUICE, PERTSISTENCE OF *Salmonella typhimurium*, AND DEFENSE OF NOPAL

Patricia Landa Salgado, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2012

SUMMARY

In the last two decades, *Salmonella* infections have been among the most frequent affecting people of all ages and social conditions. These infections have caused numerous hospitalizations and even death of people who have eaten contaminated foodstuffs, the most common of which are fresh produce. In fruits, for example, in 2011 the Center for Disease Control (CDC) reported an outbreak of *Salmonella* Agona infection associated with papaya, in which 106 people were affected. With regard to fresh vegetables, *Salmonella typhimurium* has been isolated in several species, among which is nopal (*Opuntia ficus-indica* L. Mill). (Quiroz-Santiago *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009).

Since nopal is often eaten fresh as a control measure against certain diseases such as diabetes, and *Salmonella* has shown the ability to invade and internalize into plant tissue, the main objectives of this research were: 1) to analyze the sanitary quality of juices made from fresh nopal; 2) to determine the internalization potential of *S. typhimurium* in nopal plants; 3) to register the persistence of *S. typhimurium* in pot soil with nopal plants as well as in cladodes on the plant and pre-cut; and 4) to determine if nopal plants have a hypersensitive response to inoculations of *S. typhimurium*. The last objective is because in preliminary observations, changes were registered in tissue coloring of cladodes on the plant infiltrated with the bacterium.

For the study, 9-month old nopal (*Opuntia ficus-indica* var. Milpa Alta) plants were used. They were grown in pots containing soil-vermicompost, watered with well water and kept in a greenhouse at room temperature. Also used was a strain of *S. enterica* serovar Typhimurium, resistant to Kanamicin (*S. typhimurium* St4-Km50).

A total 162 samples were obtained monthly from commercial retailers during July 2009 and June 2010. The samples were processed according to the NOM-113-SSA1-1994 and the NOM-114-SSA1-1994. 84% of the samples registered total coliforms and

Escherichia coli, and thus the analyzed juices were placed in the category of juices with deficient microbiological quality. Although some colonies suspect of being *Salmonella* were isolated, they were confirmed as *Proteus* sp. and *Citrobacter* sp.

S. typhimurium KSt4-Km⁵⁰ proved to be incapable of internalizing nopal plants, although it did persist in the soil and cladodes for several days. In soil, the bacterium persisted for 14 days after inoculation (ddi). The decrease in bacterial population was gradual but constant, until it reached levels of 1 UFC/g or less 9 ddi. In the mother cladode on the plant, the bacterium persisted for 14 ddi, and the decrease in population was moderate but constant until it reached levels of 1 UFC/g or less 9 ddi. In secondary cladodes on the plant, the bacterium persisted for 9 ddi and the population decreased quickly in the first 24 h until it reached levels of 1 UFC/g 5 ddi. In pre-cut secondary cladodes, the bacterium persisted for 14 ddi but registered a moderate increase in its population 8 ddi. In observations of tissue from mother cladodes and secondary cladodes on the plant, brown circular lesions were registered at the place of infiltration of *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰. Tissue dehydration symptoms were also identified, but only in secondary cladodes, pre-cut and on the plant. The beginning of the development of the lesions was registered 24 h after inoculation with the apparition of a slight darkening at the place of infiltration, both in mother cladodes and secondary cladodes, both on the plant and pre-cut. However, differences were registered among cladodes with regard to lesion development, intensity of the darkening, and appearance of tissue dehydration. This indicated that *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ induced a defense response in nopal, which was related to the maturity of the cladode (mother cladode vs. secondary cladode) as well as its physiological condition (cladode on the plant vs. pre-cut cladode).

The general conclusion, it's that *Salmonella* shows capacity to persist in nopal and to induce a defense response in the tissue, thus making monitoring of fresh nopal and the implementation of Good Agricultural Practices (GAP) and Good Hygiene Practices (GHP) very important control points to reduce contamination of this crop.

Key words: *Salmonella*, nopal, persistence, defense of nopal.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para la realización de mis estudios de postgrado.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano, por su apoyo, comprensión y su valiosa ayuda en todo el proceso de titulación.

A mis asesores Dr. Mateo Vargas Hernández, Dr. Alfredo López Jiménez, Dr. Cristobal Chaidez Quíroz y Dr. Jitu Patel por su ayuda y comentarios.

Al los doctores: Joel Corrales García, Gustavo Mora Aguilera y Carlos Eslava Campos, por sus comentarios. Los cuales me fueron de gran utilidad en algunos puntos del trabajo de esta tesis.

A la M.C. Greta Hanako Rosas Saito por su asesoría y ayuda con el procesamiento de muestras de tejido para microscopia electrónica de barrido.

Al Dr. Refugio Lomelí Flores por facilitar las instalaciones del invernadero para el establecimiento de este trabajo y al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por facilitar la vermicomposta usada en la fase de invernadero.

A las M.C: Alfricia de los Santos, Nora Meraz y Berenice Alonso, a las cuales además de su amistad, agradezco su ayuda con la fase de invernadero de este trabajo.

A todos mis amigos, que a lo largo de mi estancia han colaborado con su amistad y apoyo a hacerme crecer como persona.

DEDICATORIA

El esfuerzo depositado en este trabajo lo dedico a:

Mi madre: Evelia Salgado Sandoval, por su apoyo, su amor y sus oraciones.

*Mis queridos hermanos: Claudia, Felipe, Diana y Cesar por su compañía, amistad,
apoyo y por creer en mí.*

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

ii

SUMMARY

iv

Página

I. MARCO DE REFERENCIA

I.1 Nopal Verdura	2
I.1.1 Importancia Económica	2
I.1.2 Descripción Botánica y Clasificación Taxonómica	2
I.1.3 Composición Química	3
I.1.4 Calidad y Manejo Postcosecha	6
I.1.5 Propiedades Medicinales	6
I.2 <i>Salmonella</i>	7
I.2.1 Morfología y Clasificación Taxonómica	7
I.2.1 Hábitat y Fuentes de Contaminación	8
I.2.2 Persistencia e Internalización en Tejidos Vegetales	8
I.3 Literatura Citada	12

II. CALIDAD SANITARIA DE JUGOS ELABORADOS A BASE DE NOPAL VERDURA FRESCO

II.1 Introducción	20
II.2 Objetivos	21
II.2.1 Objetivo General	21
II.2.2 Objetivos Específicos	21
II.3 Hipótesis	22
II.4 Metodología	22
II.4.1 Detección y Aislamiento de Enteropatógenos	22
II.4.1.1 Detección de <i>Salmonella</i> en Medios Selectivos	
II.4.1.2 Detección de Coliformes Totales y <i>Escherichia coli</i>	
II.4.2 Identificación Bioquímica de Cepas Sospechosas de <i>Salmonella</i>	24
II.4.2.1 Prueba de Rojo de Metilo y Voges-Proskauer	
II.4.2.2 Prueba de Citrato en Agar Citrato de Simmons (ACS)	
II.4.2.3 Prueba de Indol, Movilidad y Ornitina en Medio MIO	

II.4.2.4 Prueba para Lisina y Producción de Ureasa	
II.4.2.5 Fermentación de Azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa) y Producción de H ₂ S	
II.5 Resultados y Discusión	26
II.5.1 Calidad Sanitaria de Jugos Elaborados a Base de Nopal Verdura	26
II.5.2 Detección, Aislamiento e Identificación de Enteropatógenos como Indicadores de Contaminación	26
II.6 Conclusiones	28
II.7 Literatura Citada	29
III. PERSISTENCIA E INTERNALIZACION DE <i>Salmonella typhimurium</i> EN SUELO Y CLADODIOS DE NOPAL VERDURA	
III.1 Introducción	34
III.2 Objetivos	36
III.2.1 Objetivo General	36
III.2.2 Objetivos Específicos	36
III.3 Hipótesis	36
III.4 Metodología	36
III.4.1 Establecimiento de Plantas en Invernadero	36
III.4.2 Cepa bacteriana y Preparación de Inoculo	37
III.4.3 Inoculación de Suelo y de Cladodios	38
III.4.3.1 Inoculación de suelo	
III.4.3.2 Inoculación de cladodios en planta	
III.4.3.3 Inoculación de cladodios precortados	
III.4.4 Persistencia de <i>S. typhimurium</i>	39
III.4.4.1 Persistencia en suelo	
III.4.4.2 Persistencia en tejido de nopal	
III.4.5 Internalización en Tejido de Nopal	40
III.4.6 Preparación de Muestras para Microscopia	41
III.4.7 Confirmación de Identidad de Cepas por PCR	42
III.4.8 Análisis estadístico	43
III.5 Resultados y Discusión	43
III.5.1 Persistencia de <i>S. typhimurium</i>	41
III.5.1.1 Persistencia en suelo	
III.5.1.2 Persistencia en cladodios de nopal	
III.5.1.2.1 Madre en planta	
III.5.1.2.2 Secundario en planta	
III.5.1.2.3 Secundario precortado	
III.5.1.3 Análisis estadístico	
III.5.2 Internalización de <i>S. typhimurium</i>	46
III.5.3 Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido	47
III.5.4 Confirmación de Cepas por PCR	48
III.5.5 Valores de pH de Cladodios y Condiciones Ambientales de	49

Invernadero y Laboratorio

III.6 Conclusiones	49
III.7 Literatura Citada	50

**IV. RESPUESTA DE DEFENSA EN CLADODIOS DE NOPAL VERDURA
INOCULADOS CON *Salmonella typhimurium***

IV.1 Introducción	56
IV.2 Objetivo	58
IV.3 Hipótesis	58
IV. Metodología	58
IV.4.1 Inoculación de Cladodios en Planta y de Cladodios Precortados.	58
IV.4.2 Registro de Respuesta de Cladodios	59
IV.5 Resultados y Discusión	59
IV.5.1 Respuesta de Cladodios a la Inoculación con <i>S. typhimurium</i>	59
IV.6 Conclusiones	63
IV.7 Literatura Citada	63

CONCLUSIONES GENERALES	67
GENERAL CONCLUSIONS	68

ANEXO

Reactivos y Medios de cultivo

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 2.1	Características de jugos analizados durante julio de 2009 a junio de 2010.	71
Cuadro 2.2	Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el verano de 2009.	72
Cuadro 2.3	Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y <i>E. coli</i> registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el verano de 2009.	73
Cuadro 2.4	Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el otoño de 2009.	74
Cuadro 2.5	Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y <i>E. coli</i> registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el otoño de 2009.	75
Cuadro 2.6	Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el invierno de 2009-2010.	76
Cuadro 2.7	Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y <i>E. coli</i> registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el invierno 2009-2010.	77
Cuadro 2.8	Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante la primavera 2010.	78
Cuadro 2.9	Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y <i>E. coli</i> registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante la primavera de 2010.	79
Cuadro 2.10	Resultados de pruebas bioquímicas de cepas aisladas de jugos a base de nopal.	80
Cuadro 2.11	Resultados de las pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> .	84

Cuadro 2.12	Caracteres bioquímicos diferenciales entre <i>Salmonella</i> subesp. <i>enterica</i> (I) <i>Proteus mirabilis</i> y <i>Citrobacter freundii</i> .	85
Cuadro 3.1	Persistencia de <i>S. typhimurium</i> St4-Km ⁵⁰ en suelo y cladodios.	86
Cuadro 3.2	Datos de pH de cladodios secundarios y cladodio madre de nopal registrados “in vivo”.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 2.1	Figura 2.1 Procedimiento para la recuperación y detección de células sospechosas de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> de muestras de jugo a base de nopal compradas en Texcoco, Estado de México. A) Pesado de muestra (10 g) de jugo para pre-enriquecimiento no selectivo de <i>Salmonella</i> . B) Mezclado de muestra de jugo con CST para pre-enriquecimiento no selectivo de <i>Salmonella</i> . C) Frascos con muestras pre-enriquecidas en Caldo Soya Trypticaseína (CST) incubadas por 24 h a 37°C. D) Tubos de ensaye con Caldo Base Tetrionato (CBT) como caldo de enriquecimiento selectivo incubadas por 18 h a 37°C.	89
Figura 2.2	Figura 2.2 Crecimiento de cepas bacterianas en agares selectivos para detección de cepas sospechosas de <i>Salmonella</i> incubadas a 37°C por 24 h: A y B Agar Entérico Hektoen (AEH). En A se observan colonias negras sospechosas de <i>Salmonella</i> ; y en B colonias de <i>S. typhimurium</i> St4-Km ⁵⁰ con centro negro y halo claro. C) Agar Verde Brillante (AVB), donde las colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> se encontraron blancas en el medio.	90
Figura 2.3	Figura 2.3 Recuperación y conteo de cepas de coliformes totales y <i>E. coli</i> en muestras de jugo a base de nopal. A) Se pesaron 25 g de muestra de cada jugo para tomar la muestra. B) La muestra se mezcló con 225 mL de Agua Buferada Peptonada (ABP) a 0.1%, en frascos previamente esterilizados. C) Siembra directa de la muestra de jugo en cajas Petri con Agar MacConkey (AM) para detectar coliformes totales. D) Crecimiento bacteriano en AM, después de la incubación por 24 h a 37°C	91

- Figura 2.4 Tubos con Caldo VP-MR (**A**) y con Agar Citrato de Simmons (ACS, **B**), para observar las reacciones bioquímicas de Vogues-Proskauer y producción de citrato. **A**) Tubos con VP-RM inoculados con cepa de St4-Km⁵⁰, donde al tubo 1 se le adicionó reactivo de Leifson (reacción negativa). **Nota:** La prueba positiva se caracteriza por un vire de color blanco a color ladrillo. El tubo 2, se observa el caldo con crecimiento bacteriano sin la adición del reactivo. **B**) Tubo 1, con crecimiento de *E. coli* que permanece de color verde (negativo); y tubo 2, con crecimiento de St4-Km⁵⁰ de color azul (positivo). 92
- Figura 2.5 Prueba de Agar Movilidad, Indol y Ornitina (MIO). **A**) Medio inoculado con diferentes géneros de bacterias y sin inocular (T-). Donde la presencia de Ornitina (O) se evaluó de acuerdo al cambio de color del medio. El color amarillo indica la ausencia de Ornitina y falta de este color indica una prueba positiva. La movilidad (M) se aprecia por una difusión del crecimiento bacteriano a partir del punto de inoculación, No visible (NV) indica que la difusión no se observa por el cambio en la coloración del medio. **B**) La producción de indol (reacción positiva, tubo 1) se aprecia por la formación de un anillo rojo sobre la superficie del medio después de agregar el reactivo de Erlich, en contraste a la reacción negativa (tubo 2). 93
- Figura 2.6 Prueba de descarboxilación o desaminación de la lisina. Tubo 1, medio sin inocular (T-), sin cambio de color. Tubo 2, medio inoculado con *Proteus*, con cambio de color de púrpura a amarillo con superficie roja por la desaminación de la lisina. Tubo 3, medio con superficie negra y fondo amarillo por la producción de ácido sulfhídrico y de gas, respectivamente. Tubo 4, medio inoculado con *E. coli* (control negativo) con cambio a amarillo en el fondo. Tubo 5, inoculado con *S. typhimurium* (St4- 94

Km⁵⁰) (control positivo) con cambio a color negro en todo el medio por la descarboxilación de la lisina y producción de ácido sulfhídrico.

- Figura 2.7 Prueba de Agar Hierro de Kligler (AHK), para determinar la fermentación de lactosa y glucosa. Tubo 1, medio sin inocular (T-). Tubo 2, medio inoculado con *E. coli* con cambio de color, de naranja a amarillo por la fermentación de la lactosa. Tubo 3, medio inoculado con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ con cambio de color, de naranja a negro, por la producción de H₂S. 95
- Figura 2.8 Prueba Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI) para evaluar la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa así como la producción de ácido sulfhídrico (H₂S). Tubo 1, medio sin inocular. Tubo 2, medio inoculado con *E. coli*, con cambio de color en la superficie, de naranja a amarillo, por la fermentación de la lactosa/sacarosa (reacción positiva;). Tubo 3, medio inoculado con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰, con cambio de color a negro por la producción de H₂S y gas en el fondo. 96
- Figura 2.9 Prueba de Agar Hierro de Kligler (AHK), para determinar la fermentación de lactosa y glucosa. Tubo 1, medio sin inocular (T-). Tubo 2, medio inoculado con *E. coli* con cambio de color, de naranja a amarillo por la fermentación de la lactosa. Tubo 3, medio inoculado con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ con cambio de color, de naranja a negro, por la producción de H₂S. 97
- Figura 2.10 Cuenta promedio de coliformes totales (A) y *E. coli* (B) registrada en muestras de jugo fresco sin pasteurizar preparado a base de nopal, durante julio de 2009 a junio de 2010, colectadas en dos expendios comerciales en Texcoco, Estado de México. Las líneas verticales dentro de cada barra representan el error estándar entre los valores. 98

- Figura 3.1 Establecimiento de plantas de nopal en invernadero. **A)** Preparación de mezcla de suelo franco-arenoso con vermicomposta en proporción 3.5-1.5 kg. **B)** Los cladodios se sembraron y distribuyeron en macetas de plástico con la mezcla suelo:vermicomposta establecidas en un invernadero con cubiertas plástica. 99
- Figura 3.2 Aplicación de inoculo de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) en suelo, cladodios madre y cladodios secundarios de nopal. **A)** Aplicación directa de inoculo en suelo con 250 mL de suspensión bacteriana de St4-Km⁵⁰. **B)** Planta de nopal de nueve meses de edad mantenida en condiciones de invernadero, los círculos blancos indican los puntos en los cladodios madre (cladodio primario) y secundario (cladodios de segundo orden), donde se aplicaron 100 µL del inoculo de St4-Km⁵⁰ por punción. **C)** Aplicación de inoculo en cladodios secundarios. **D)** Señalización de punto de inoculación para rápida identificación del sitio. 100
- Figura 3.3 **A)** Potenciómetro con electrodo de aguja (Hanna®) para monitoreo de pH en nopal verdura *in vivo*. **B)** Electrodo insertado en cladodio secundario para determinar el pH interno del tejido. 101
- Figura 3.4 Estimación de supervivencia de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) en muestras de suelo. **A)** Toma de muestra de maceta con planta de nopal. **B)** Bolsa Ziploc® con muestra de suelo para ser transportada al laboratorio para su procesamiento. **C)** Pesado de 25 g de muestra para su análisis. **D)** Muestra de suelo mezclado con 225 mL de ABP 0.1%. 102
- Figura 3.5 Prueba para estimar la supervivencia de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) en nopal verdura. **A)** Cladodios madre sobre papel aluminio para ser transportados al laboratorio. **B)** 103

Desinfección de cladodio con hipoclorito de sodio a 200 ppm por 3 min. **C)** Extracción de tejido para macerarse con ABP a 0.1%. **D)** Stomacher usado para macerar muestra de tejido por 1 min a 300 rpm.

- Figura 3.6 Procesamiento de muestras de tejido de nopal para microscopía electrónica de barrido (MEB). **A)** Segmentos de 3 mm de tejido inoculado con *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰). **B)** Tejido de nopal inoculado, fijado en glutaraldehído a 2.5%. **C)** Vial con tejido de nopal para deshidratación con etanol **D)** Equipo Samdri-780A® para secado de tejido a punto crítico de CO₂ por 40 min. 104
- Figura 3.7 Procesamiento de muestras de tejido de nopal para microscopía electrónica de barrido (MEB). **A)** Ionizadora usada para recubrir muestras con aleación Au-Pd. **B)** Muestras de tejido de nopal después de la aplicación de la aleación Au-Pd. **C)** Equipo de microscopía electrónica de barrido integrado a equipo de computo. **D)** Platina de microscopio electrónico con porta-muestras. 105
- Figura 3.8 Condiciones de Temperatura (■, T, °C) y Humedad Relativa (◆, HR, %) registradas en invernadero (A), y en laboratorio (B), durante el desarrollo de cladodios inoculados con *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰). Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HT (datalogger HOBO®). Cada valor representa el valor promedio de seis lecturas registradas por día. 106
- Figura 3.9 Colonias de *Bacillus* sp., aisladas de cladodios secundarios de nopal (*Opuntia ficus-indica*). **A)** Crecimiento de colonias de *Bacillus* sp. en Agar Soya Trypticaseína. Obsérvense las colonias con bordes irregulares, secas, rugosas y con 107

sobrecrecimientos. **B)** Células de *Bacillus* observadas al microscopio electrónico de barrido a X 7,000.

- Figura 3.10 Células de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) al microscopio electrónico de barrido: Células observadas: en medio AST de 48 h de crecimiento (**A**); en tejido de nopal inmediatamente después de la aplicación del inóculo (**B**); y en tejido de cladodio secundario a las 24 h y 48 h después de la aplicación del inóculo, (**C**) y (**D**), respectivamente. 108
- Figura 3.11 Diferentes tipos de cristales de oxalato de calcio en tejido de cladodios secundarios sin inocular e inoculados con *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰). 109
- Figura 3.12 Productos de amplificación por PCR en gel de agarosa a 0.8% con los iniciadores Sal-3 y Sal-4 de cepas presuntivas de *Salmonella* recuperadas de suelo, cladodios secundarios y cladodios madre. Línea 1: *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰; Línea 2: cepa 1 de cladodio secundario de laboratorio (1-CSL), Línea 3: cepa 2-CSL; Línea 4: cepa 3-CSL; Línea 5: cepa 1 cladodio madre (1-CM); Línea 6: cepa 2-CM; Línea 7: cepa 3-CM; Línea 8: cepa 4-CM; Línea 9: cepa 5-CM; Línea 10: cepa 1 de suelo (1-S); Línea 11: cepa 2-S; Línea 12: cepa 3-S; Línea 13: cepa 4-S; Línea 14: agua (TN); Línea 15: cepa 1 cladodio secundario de invernadero (1-CSI); Línea 16 marcador molecular Φ X174/Hae III (MM). 110
- Figura 4.1 Cladodios secundarios inoculados con: **A)** Agua Buferada Peptonada a 0.1% (ABP), y **B)** con *Salmonella typhimurium*. Donde las líneas rojas (-) indican el área donde se aplicó el ABP y las cruces (+) donde se aplicó *S. typhimurium*. En **B** se aprecian lesiones circulares amarillas como resultado de la 111

reacción del tejido a la inoculación con la bacteria.

- Figura 4.2 Respuesta en cladodios de nopal inoculados por infiltración con 8 Log UFC de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ (A, B y C) y con agua buferada peptonada a 0.1% (D). Nótese las lesiones con oscurecimiento desarrolladas en el tejido interno después de la inoculación en: A, cladodio madre; B, cladodio secundario en planta; y C, cladodio secundario precortado. Tejido de cladodio Nótese en B y C la deshidratación del tejido de la lesión a las 96 y 144 h, respectivamente. 112
- Figura 4.3 Respuesta en cladodio secundario precortado de nopal verdura a las 168 h después de la infiltración con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ (8 Log UFC/mL) y mantenido en condiciones de laboratorio. Nótese el oscurecimiento y desprendimiento del tejido infiltrado. 113

ANEXO REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Reactivos y Medios de Cultivo	Página
1. Medio MR-VP	115
1.1 Preparación de solución indicadora para el rojo de metilo	
1.2 Preparación de solución de sulfato de cobre y amonio de Leifson	
2. Medio MIO	116
2.1 Prueba de Movilidad	
2.2 Descarboxilación de Ornitina	
2.3 Prueba de Indol	
3. Agar Citrato de Simmons (ACS)	116
4. Agar de Hierro y Lisina (LIA)	117
5. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)	117
6. Agar de Hierro de Kliger (AHK)	118
7. Agar Verde Brillante (AVB)	119
8. Agar Soya Trypticaseína (AST)	119
9. Agar McConkey (AM)	119
10. Agar Entérico Hektoen (AEH)	120
11. Caldo Soya Trypticaseína (CST)	119
12. Caldo Vassiliadis-Rappaport (CRV)	120
13. Caldo Base Tetrionato (CBT)	120
13.1 Solución yodada	
14. Caldo Urea (CU)	121
15. Agua Buferada Peptonada a 0.1% (ABP)	120
16. Preparación de la Solución Stock de Kanamicina (50 µg/mL)	120
17. Preservación de Cepas de <i>Salmonella</i> en Glicerol	120
18. Reactivación de Gepas Mantenidoas en Glicerol a -20° C	121

19. Reactivación de Cepas St4-Km ⁵⁰	122
20. Resuspensión de Oligonucleotidos (Primers: Sal-3 y Sal-4)	122
21. PCR Master Mix	123
22. Bromuro de Etidio	124
23. Preparación del Marcador	125
24. Preparación de Soluciones de Cloro	125
25. Preparación de Amortiguador de Fosfatos de Sorensen (Microscopia)	125
26. Preparación de Glutaraldehído a 2.5%	126
27. Preparación de Soluciones de Alcohol	126

I. MARCO DE REFERENCIA

I.1 NOPAL VERDURA

I.1.1 Importancia económica

El nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) se encuentra entre las principales especies hortofrutícolas producidas en México llegando a ocupar el 11vo lugar a nivel nacional en 2001 (Infoaserca, 2001). Esta especie, así como las de *Opuntia robusta* y *Nopalea cochenillifera*, se comercializa principalmente en fresco (Infoaserca, 2001) y se consume generalmente por sus propiedades alimenticias y medicinales, con un consumo *per capita* de 8 Kg/año (SAGARPA, 2010; Feugang *et al.*, 2006; Flores-Valdez, 1999; Stintzing y Carle, 2005; Saénz *et al.*, 2006).

En México los principales estados productores de nopal verdura son Distrito Federal (294, 486 tons), Morelos (275, 212) y Estado de México (58, 827 tons), con una producción anual de 723, 815 ton (SIAP, 2011). Esta producción abastece las necesidades nacionales y los excedentes se exportan a E.U.A, Japón, y algunos países europeos (Flores-Valdez *et al.*, 1995).

I.1.2 Descripción Botánica y Clasificación Taxonómica del Nopal

Los nopales son plantas arbustivas y erectas que pueden alcanzar de 3.5 a 5 m de altura. La planta consta de raíz, una parte vegetativa (tallo o cladodio), la fruta y la flor (Granados y Castañeda, 2003), a continuación se presenta una síntesis de la descripción de la parte vegetativa de acuerdo a Saénz, *et al.* (2006) por ser la parte de estudio en este trabajo.

Los tallos o cladodios, comúnmente llamados pencas, son suculentos, articulados y con actividad fotosintética. Presentan forma de raqueta ovoide o elongada alcanzando entre 60 y 70 cm de longitud en alrededor de 90 días. Se encuentran protegidos por una cutícula gruesa, la cual reduce la pérdida de agua. En ambas caras del cladodio se presentan yemas conocidas como aréolas, que tienen la capacidad de desarrollar nuevos cladodios, flores y raíces. Estas estructuras presentan en su cavidad espinas, que generalmente son pequeñas o grandes. Las pequeñas se agrupan en gran número

en estructuras referidas botánicamente como gloquidios; y, las grandes, son consideradas como hojas modificadas.

De acuerdo a Bravo (1978), la clasificación taxonómica del nopal es la siguiente.

Reino vegetal

Subreino Embryophita

División Angiospermae

Clase Dicotiledónea,

Subclase Dialipetalas

Orden Opuntiales

Familia Cactaceae

Subfamilia Opuntioideae

Tribu Opuntiae

Género *Opuntia*

I.1.3 Composición Química

La composición química de las cactáceas varía entre las distintas especies y también dentro de la misma especie. Algunos factores adicionales que afectan la composición de los cladodios son: la edad, el clima así como la salinidad, humedad y textura del suelo donde se cultivo la planta (Feugang *et al.*, 2006; Granados y Castañeda, 2003; Saéñz, *et al.*, 2006).

El nopal verdura es rico en agua (91%), pectinas y mucílagos. Tiene un pH entre 5.0 y 6.6, acidez titulable de 0.03 a 0.12% y sólidos de 12 a 17%. En contenido de minerales, aminoácidos, vitaminas y antioxidantes destacan el Ca y K; el ácido glutámico y la serina; los carotenoides y el ácido ascórbico, respectivamente con valores que se indican en los Cuadro 1.1 (Contenido de minerales en cladodios desespinaados), Cuadro 1.2 (Contenido de vitaminas y antioxidantes de cladodios de *Opuntia*) y Cuadro 1.3 (Contenido de aminoácidos en cladodios de *Opuntia*), (Feugang *et al.*, 2006; Saéñz *et al.*, 2006).

Cuadro 1.1 Contenido de minerales en cladodios desespínados de *Opuntia*.

Mineral	g/100 g de peso seco
Calcio (Ca)	5.64
Magnesio (Mg)	0.19
Potasio (K)	2.35
Fósforo (P)	0.15
Sodio (Na)	0.4
Fierro (Fe)	0.14 µg (trazas)

Cuadro 1.2 Contenido de vitaminas y antioxidantes de cladodios de *Opuntia*.

Componente	mg/ 100 g peso fresco
Ácido ascórbico	7-22
Niacina	0.46
Riboflavina	0.60
Tiamina	0.14
Carotenoides totales	11.3 -55.3 µg

Cuadro 1.3 Contenido de aminoácidos en cladodios de *Opuntia*.

Aminoácido	g/100g de peso fresco
Alanina	0.6
Arginina	2.4
Asparagina	1.5
Ácido aspártico	2.1
Ácido glutámico	2.6
Glutamina	17.3
Glicina	0.5
Histidina	2.0
Isoleucina	1.9
Leucina	1.3
Lisina	2.5
Metionina	1.4
Fenilalanina	1.7
Serina	3.2
Treonina	2.0
Tirosina	0.7
Triptofano	0.5
Valina	3.7

I.1.4 Calidad y Manejo Postcosecha

De acuerdo a la Norma de Calidad del *Codex Alimentarius* (CODEX STAN 185-1993), los cladodios de nopal deben presentar las características de la especie (forma, color), estar enteros, firmes, sanos, limpios y libres de espinas y de daños. Lo anterior esta en concordancia con el pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México Calidad Suprema (PC-050-2006). En ambos documentos se especifica que el producto debe ser inocuo y haber sido producido y manejado bajo las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH). Sin embargo, la producción y el manejo tradicional de este cultivo no contemplan la aplicación de BPA ni BPH, por lo que es altamente probable que se comprometa la calidad sanitaria de los cladodios o “nopalitos”, término con el que también se les conoce, con residuos químicos (CESVMOR, 2011) y agentes microbiológicos (Hernández *et al.*, 2009).

El nopal se cosecha durante la mañana, cuando la humedad relativa es alta, de forma manual con un cuchillo u otro tipo de implementos (Infoaserca, 2001). El nopal verdura se colecta en canastos o cajas y se protege del sol para evitar su calentamiento y alargar la vida de anaquel (Infoaserca, 2001).

La vida de anaquel de los cladodios se ve afectada por diferentes factores, entre los que se encuentran la forma en que fueron cosechados, el tipo de envase en el que se almacena así como la humedad relativa y la temperatura de almacenamiento (Cantwell *et al.*, 1992). Respecto a este último factor, durante el almacenamiento, a 20°C, la pérdida de peso y las pudriciones son los problemas que limitan la vida de anaquel del producto (Ramayo *et al.*, 1978; Rodríguez-Felix y Villegas-Ochoa, 1997); mientras que, a temperaturas menores a 12°C (almacenamiento refrigerado), es el daño por frío (Cantwell *et al.*, 1992).

I.1.5 Propiedades Medicinales

En México el nopal se usa desde épocas pre-hispánicas con fines no solo alimenticios sino también medicinales (Granados y Castañeda, 2003). Actualmente ocupa el primer lugar entre las plantas utilizadas para el tratamiento de personas con diabetes (Saucedo-Tamayo *et al.*, 2006). Diversos estudios señalan que el nopal

verdura posee además algunas otras propiedades medicinales entre las cuales se incluyen: actividad diurética (Gelati, *et al.*, 2002b), hipoglucémica (Gelati *et al.*, 2001), antiúlceroza (Gelati *et al.*, 2002a; Gelati *et al.*, 2007), cicatrizante (Gelati *et al.*, 2003), antiinflamatoria, antiviral (Feugang *et al.*, 2006), y coadyuvante en la disminución de colesterol y la digestión entre otros. Por lo anterior, es común que las personas consuman este producto en fresco para conservar sus propiedades alimenticias y medicinales (Taddei-Bringas *et al.*, 1999).

I.2 SALMONELLA

I.2.1 Morfología y Clasificación Taxonómica

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, de 0.7-1.5 x 2.0-5 μm , generalmente móviles por sus flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*) anaerobios facultativos, no esporulados (Terragno *et al.*, 2003). El género *Salmonella* está constituido por dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. La especie *S. enterica* consta de las subespecies: *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *arizonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae* y *S. enterica* subesp. *indica*. Las especies de *S. entérica* y *S. bongori* comprenden más de 2600 serotipos, definidos en función de la asociación de factores antigénicos somáticos O, flagelares H y de envoltura (Vi) (Terragno *et al.*, 2003).

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: *enterica*

Subespecie: *enterica*

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 *S. typhimurium*.

1.2.2 Hábitat y Fuentes de Contaminación

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, su hábitat natural es el tracto intestinal de mamíferos (domésticos y silvestres), reptiles, aves e insectos. Se les puede encontrar como comensales o patógenos causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y en los animales. Pueden persistir en suelo, agua, y estiércol sin compostear de animales (Terragno *et al.*, 2003).

Recientemente varios serotipos de *Salmonella* se han asociado como epifitos y endofitos de algunas plantas y se han reportado contaminando numerosos productos hortofrutícolas frescos (Brandl, 2006; Doyle y Erickson, 2008; Guan y Holley, 2003; Holden *et al.*, 2009; Tyler y Triplett, 2008). Esto último por la aplicación de estiércol sin compostear, uso de agua contaminada, presencia de animales domésticos y silvestres así como por la falta de higiene de los trabajadores durante el manejo pre y postcosecha (Beuchat, 2002; Brandl, 2006; Doyle y Erickson, 2008).

1.2.3 Persistencia e Internalización en Tejidos Vegetales

El termino persistencia se define como la capacidad de durar o mantenerse por largo tiempo (RAE, 2012). Las especies de *Salmonella* tienen la capacidad de persistir fuera de su hábitat natural y adaptarse a condiciones adversas del ambiente. Para esto emplean diversos mecanismos que les permiten permanecer viables por un periodo prolongado de tiempo. En el Cuadro 1.4 se indica los periodos de tiempo reportados en los que *Salmonella* puede persistir en agua, suelo y plantas. En las plantas puede

persistir tanto en la rizosfera como en la filósfera, llegando incluso a internalizarse en algunos tejidos si se presentan condiciones favorables (Brandl, 2006; Bartz, 2006). La palabra internalización se refiere a la condición de poder embeberse en los tejidos de una planta. Un microorganismo que se encuentra embebido en el tejido vegetal se dice que esta “internalizado”. En esta condición los microorganismos se encuentran protegidos del “estrés” del medio ambiente y del efecto de biocidas u otros productos utilizados en la desinfección de frutas y verduras frescas con fines preventivos (Bartz, 2006). En el cuadro 1.5 se indican algunos ejemplos de reportes de diferentes serotipos de *Salmonella* en diferentes cultivos, así como la fuente de contaminación.

Cuadro 1.4 Persistencia de *Salmonella* en diferentes 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 Weaver, 1978
Suelo húmedo		63	
Estiércol			
Estiércol de vaca	<i>S. typhimurium</i>	48	Himathongkham <i>et al.</i> , 1999a
Estiércol líquido de vaca		60	Himathongkham <i>et al.</i> , 1999a
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> , 1999b
Composta			
Composta industrial	<i>S. typhimurium</i>	59	Droffner y Brinton 1995

Cuadro 1.5 Internalización de *Salmonella* en diferentes cultivos.

Bacteria	Cultivo	Fuente de contaminación	Referencia
<i>Salmonella</i> spp.	Tomate	Agua (Hidroponia)	Guo <i>et al.</i> , 2002
	Naranja	Agua de lavado	Eblen <i>et al.</i> , 2004
	Perejil	Agua de lavado	Duffy <i>et al.</i> , 2005
	Pecana	Agua	Beuchat y Mann, 2010
<i>S. montevideo</i>	Frijol mungo	Contaminación de plántula	Warriner <i>et al.</i> , 2003
<i>S. typhimurium</i>	Tomate	Agua de lavado	Ibarra-Sánchez <i>et al.</i> , 2004
	Lechuga y rábano	Contaminación de semilla	Jablasone <i>et al.</i> , 2005
	Lechuga	Suelo	Franz <i>et al.</i> , 2007
	Lechuga Mango (pulpa)	Agua (Hidroponía) Agua de lavado	Franz <i>et al.</i> , 2007 Soto <i>et al.</i> , 2007
<i>S. enteritidis</i>	Mango	Agua de lavado	Penteado <i>et al.</i> , 2004
	Almendra	Agua	Danyluk <i>et al.</i> , 2008
<i>S. newport</i>	Lechuga romana	Suelo	Bernstein <i>et al.</i> , 2007
	Tomate	Agua de riego	Hintz <i>et al.</i> , 2010

Cuadro tomado y adaptado de Deering *et al.*, 2012.

El proceso de internalización puede ser activo o pasivo. En el proceso activo, los microorganismos penetran mediante presión mecánica o actividad enzimática al interior del tejido. Mientras que en el pasivo los microorganismos como *Salmonella* penetran directamente a través de aberturas naturales, tales como lenticelas, estomas, hidátodos o heridas causadas por daño mecánico, cuando ingresa agua, aerosoles o partículas contaminadas al tejido (Bartz, 2006). Esto es de especial interés para el caso de *Salmonella* debido a que una vez en el interior puede colonizar los tejidos vegetales. Se ha demostrado que existe un reconocimiento a nivel genético entre la bacteria y el tejido de algunas plantas infectadas (Barak *et al.*, 2005).

Recientemente Hernández *et al.* (2009) reportaron la presencia de *Salmonella typhimurium* en cladodios de nopal verdura, así como en suelo y agua de uso agrícola en una zona productora de este cultivo en Morelos, México. Por lo anterior la implementación de medidas preventivas como las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manejo (BPM) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH) son importantes para la obtención de cladodios de nopal inocuos y para la prevención de enfermedades gastrointestinales por patógenos como *Salmonella* (Doyle y Erickson, 2008), para los cuales los lavados y aplicación de desinfectantes pudieran no ser efectivos en caso de encontrarse superficial o internamente (Bartz, 2006).

I.3 LITERATURA CITADA

- Barak J. B., Gorski L., Naraghi-Arani P., and Charkowski A. O. 2005. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10): 5685-5691.
- Bartz J. A. 2006. Internalization and infiltration. *In: Microbiology of fruits and vegetables.* Sapers G. M., Gorny J. R., Yousef A. E. (eds). CRC. pp: 75-94.
- Bernstein N., Sela S., and Neder-Lavon S. 2007. Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrigation Science* 26: 1-8.
- Beuchat L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* 4: 413-423.
- Beuchat L. R., and Mann D. A. 2010. Factors affecting infiltration and survival of *Salmonella* on in-shell pecans nutmeats. *Journal of Food Protection* 73 (7): 1257-1268.
- 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., and Amudson R. 2008. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8): 2298-2306.

- Bravo H. H. 1978. Las cactáceas de México. UNAM. 2da. Impresión.
- Cantwell M., Rodríguez-Felix A., and Robles-Contreras F. 1992. Postharvest physiology of pickly pear cactus stems. *Scientia Horticulturae* 50:1-9.
- CESVMOR, 2011. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Morelos. 1er. Simposium Estatal de Nopal Verdura en Morelos.
- CODEX STAN 185-1993. Norma del CODEX para el nopal.
- Cooley M. B., Miller W. G., and Mandrell R. E. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4915-4926.
- Danyluk M. D. Brandl M. T., and Harris L. J. 2008. Migration of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 through almonds hulls and shells. *Journal of Food Protection* 71 (2): 397-401.
- Deering A. J. Mauer L. J., and Pruitt R. E. 2012. Internalization of *E. coli* and *Salmonella* spp., in plants: a review. *Food Research International* 45: 567-575.
- Doyle M. P., and Erickson M. C. 2008. Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce an overview. *Journal of Applied Microbiology* 105 (2): 317-330.
- Droffner M. L., and Brinton W. F. 1995. Survival of *E. coli* and *Salmonella* populations in aerobic thermophilic composts as measured with DNA gene probes. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin (International Journal of Hygiene and Environmental Medicine)* 197: 387-397.
- Duffy E. A., Cisneros-Zevallos L., Castillo A., Pallai S. D., Ricke S. C., and Acuff, G. R. 2005. Survival of *Salmonella* transformed to express green fluorescent protein on Italian parsley as affected by processing and storage. *Journal of Food Protection* 68 (4): 687-695.
- Eblen S. B., Walderhaug M. O., Edelson-Mammel S., Chirtel S. J., De Jesus A., Merker R. I., and Miller A. J. 2004. Potential for internalization, grow, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in oranges. *Journal of Food Protection* 67: 1578-1584.

- Feugang J. M., Konarski P., Zou D., Stintzing, F. C., and Zou, C. 2006. Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience* 11: 2574-2589.
- Flores Valdez C. A. 1999. Producción, industrialización y comercialización de nopalitas. Pp. 97-105. In: Barbera, G., Inglese, P., y Pimienta-Barrios, E. eds. *Agroecología, cultivo y usos de nopal*. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal. 132. Roma.
- Flores Valdez C. A., de Luna Esquivel J. M., y Ramírez Moreno P.P. 1995. Mercado Mundial del Nopalito. ASERCA. 176 p.
- Franz E., Visser A. A., Van Diepeningen A. D., Klerks M. M., Termorshuizen A. J., and Bruggen A. H. 2007. Quantification of contamination and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Food Microbiology 24 (1): 106-112.
- Gelati E. M., Mondello M. R., Monforte M. T., Galluzzo M., Miceli N., and Tripodo M. M. 2003. Effect of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladodes in the wound-healing process. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 1-16.
- Gelati E. M., Monforte M. T., Tripodo M. M., d'Aquino A., and Mondello M. R. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (1): 1-9.
- Gelati E. M., Monforte M. T., Miceli N., Mondello M. R., Taviano M. R., Galluzzo M., and Tripodo M. M. 2007. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Mucilages show cytoprotective effect on gastric mucosa in rat. *Phytotherapy Research* 21 (4): 344-346.
- Gelati E. M., Pergolizzi S., Miceli N., Monforte M. T., and Tripodo M. M. 2002a. Study on the increment of the production of gastric mucus in rats treated with *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladodes. *Journal of Ethnopharmacology* 83 (3): 229-233.
- Gelati E. M., Tripodo M. M., Trovato A., Miceli N., and Monforte M. T. 2002b. Biological effect of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill (Cactaceae) waste matter Note I: diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 79 (1): 17-21.
- Granados-Sánchez D., y Castañeda-Pérez A. D. 2003. El nopal, historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Editorial Trillas. Pp 227, 4ta. Reimpresión.

- Guan T. Y., and Holley R. A. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness: a review. *Journal of Environmental Quality* 32: 383-392
- Guo X., Chen J., Brackett R. E., and Beuchat L. R. 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(10): 4760-4761.
- Guo X., van Iersel M. W., Chen J., Brackett R. E., and Beuchat L. R. 2002. Evidence of Association of *Salmonellae* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (7): 3639-3643.
- Hernández A. A. M., Landa S. P., Mora A. G., Eslava C. C. A., Call J. E., Porto-Fett A. C. S., and Luchansky J. B. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. Abstracts of the Annual Meeting of the International Association for Food Protection (P1-37):74-75.
- Himathongkham S., Bahari S., Riemann H., and Cliver D. 1999a. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and manure slurry. *FEMS Microbiology Letters* 178: 251-257.
- Himathongkham S., Nuanualsuwan S., and Riemann H. 1999b. Survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* chicken manure at different levels of water activity. *FEMS Microbiology Letters* 172: 159-163.
- Hintz L.D., Boyer R. R., Ponder M. A., Williams R. C., and Rideout S. L., 2010. Recovery of *Salmonella enterica* Newport introduced through irrigation water from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit, roots, stems, and leaves. *Hortscience* 45 (4): 675-678.
- Holden N., Pritchard L., and Toth I. 2009. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbial Review* 33: 689-703.
- Ibarra-Sánchez L. S., Alvarado-Casillas S., Rodríguez-García M. O., Martínez-González E., and Castillo A. 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomato and their control by select chemicals. *Journal of Food Protection* 67: 1353-1358.

- Infoaserca 2001. Nopal, leyenda, comercio y futuro en México. Claridades Agropecuarias. 44 p.
- Islam M., Morgan J., Doyle M.P., Phatak S.C., Millner P., and Jiang X. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure compost or irrigation water. Applied Environmental Microbiology 70: 2497-2502.
- Jablasone J., Warriner K., and 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.
- Kroupitski Y., Pinto R., Brandl M.T., Belausov E., and Sela, S. 2009. Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. Journal of Applied Microbiology 106: 1876–1885.
- Natving E. E. Ingham S. C., Ingham B. H., Cooperband L. R., and Roper T. R. 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 (6): 2737-2744.
- PC-050-2006. Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México Calidad Suprema en nopal. 16 p.
- Penteado A. L., Eblen B.S., and Miller A. J. 2004. Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect disinfestation procedures. Journal of Food Protection 67:181-184.
- RAE. 2012. Real Academia Española. <http://www.rae.es/rae.html>. Fecha de consulta 18 de enero de 2012.
- Ramayo R. L., Saucedo V. C., y Lakshminarayana. 1978. Prolongación de la vida de almacenamiento del nopal hortaliza (*Opuntia inermis* Coulter) por refrigeración. Chapingo, Nueva Época 10: 30-32.
- Rodríguez-Felix A., and Villegas-Ochoa M. 1997. Quality of cactus stems (*Opuntia ficus-indica*) during low temperature storage. Cactus Development 2:142-151.
- Saénz C., Berger H., Corrales-García J., Galletti L., García del Cortázar V., Higuera I., Mondragón C., Rodríguez-Felix A., Sepúlveda E., and Varnero M. A. 2006.

- Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. 169 p.
- SAGARPA. 2010. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
- Santo Domingo J. W., Harmon S., and Bennet J. Survival of *Salmonella* species in river water. 2000. Current Microbiology 40: 409-417.
- Saucedo-Tamayo M. del S., Bañuelos-Flores N., Cabrera-Pacheco R. M., y Ballesteros-Vásquez N. 2006. La práctica de la medicina alternativa una realidad en el paciente diabético en Hermosillo, Son., México. Revista Salud Pública y Nutrición 7 (4): 1-12.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2010. http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp. Fecha de consulta: 15 de Noviembre de 2011.
- Stintzing F. C., and Carle R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. Molecular Nutrition and Food Research 49:175-194.
- Soto M., Chavez G., Baez M., Martínez C., and Chaidez C. 2007. Internalization of *Salmonella typhimurium* into mango pulp and prevention of fruit contamination by chlorine and copper ions. International Journal of Environmental Health Research 17 (6): 453-459
- Taddei-Bringas G. A., Santillana-Macedo M. A., Romero-Cancio J. A., y Romero-Tellez, M. B. 1999. Aceptación y uso de la herbolaria en medicina familiar. Salud Pública de México 41 (3): 216-220.
- Terragno R., Caffer M. A. I., Bruno S. y Binsztein N. 2003. Parte I: Aislamiento Identificación y Serotipificación de *Salmonella*. Manual de Procedimientos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Departamento de Bacteriología. Buenos Aires, Argentina. pp.56.
- Tyler H. L., and Triplett E. W. 2008. Plants as habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology 46:53–73.

- Warriner K., Spaniolas S., Dickinson M., Wright C., and Waites W. 2003. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal Applied Microbiology* 95:719–727.
- You T., Rankin S. C., Aceto H. W., Benson C. E. Toth J. D., and Dou Z. 2006. Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9): 5777-5783.
- Zibilske L. M., and Weaver R. W. 1978. Effect of environmental factors on survival of *Salmonella* Typhimurium in soil. *Journal of Environmental Quality* 7:593-597.

**II. CALIDAD SANITARIA DE JUGOS FRESCOS
ELABORADOS A BASE DE NOPAL VERDURA
FRESCO**

II.1 INTRODUCCIÓN

El número de casos de enfermedades gastrointestinales asociados al consumo de productos hortofrutícolas frescos (Doyle y Erickson, 2008) y jugos sin pasteurizar (Parish, 1997) ha registrado importantes incrementos en los últimos años (Scallan *et al.*, 2011). En la mayoría de los casos las enfermedades gastrointestinales son provocadas por diferentes especies de patógenos de humanos tales como *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophyla*, así como por algunos virus y protozoarios entéricos (Warriner *et al.*, 2009), las cuales se encuentran presentes en la superficie de los productos al momento de su consumo (Burnett y Beuchat, 2001).

La contaminación de las frutas y hortalizas por patógenos de humanos puede ocurrir en cualquier parte de la cadena productiva: producción, cosecha, postcosecha, almacenamiento, procesamiento, distribución y/o preparación (Gorny, 2006). Específicamente existen reportes de contaminación de productos hortofrutícolas con patógenos tales como *Salmonella* (García-Gómez *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2009; Quíroz-Santiago *et al.*, 2009) y coliformes fecales (Hirotnani *et al.*, 2002) cuya presencia ha sido recurrente en bebidas sin pasteurizar preparadas con productos hortofrutícolas frescos como aguas frescas (Félix-Fuentes *et al.*, 2005) y jugos frescos (Castillo *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2006; Mudgil *et al.*, 2004; Parish, 1997). Cabe señalar que se ha reportado la presencia de *Salmonella* en cladodios de nopal verdura fresco (Hernández *et al.*, 2009) lo cual podría tener implicaciones directas en la salud de las personas que consumen de manera regular este producto en especial para aquellas personas con sistema inmune deficiente.

El nopal es uno de los principales productos hortofrutícolas de consumo humano en México (López-Herranz *et al.*, 2008) debido, en parte, a que se le atribuyen numerosas propiedades medicinales para disminuir la glucosa y el colesterol en la sangre y por su actividad antiulcerosa, diurética y antiúrica (Feugang *et al.*, 2006; Taddei-Bringas, *et al.*, 1999). Los enfermos de diabetes mellitus tipo 2 lo consumen en forma natural licuado con agua o bien mezclado con otros productos como piña (*Ananas comosus*), naranja

(*Citrus aurantium*) ó toronja (*Citrus maxima*) (Basurto-Santos *et al.*, 2006; Saucedo-Tamayo *et. al.*, 2006).

En México existen diversos expendios comerciales que ofrecen jugos frescos elaborados a base de nopal listos para consumirse. En estos casos los jugos se preparan con cladodios frescos sometidos únicamente a lavado con agua corriente. Como la preparación es en forma casera, el jugo así obtenido no se somete a ningún proceso de pasteurización por lo que el consumo de estos jugos comerciales pudieran representar un riesgo potencial a la salud del consumidor. Actualmente ningún proceso de lavado y desinfección es 100% efectivo para remover a los patógenos que pudieran venir adheridos a la superficie de los productos hortofrutícolas frescos (Sapers, 2001).

Por lo indicado anteriormente, en este estudio se plantearon los objetivos siguientes.

II.2 OBJETIVOS

II.2.1 Objetivo General

Analizar la calidad sanitaria de jugos elaborados a base de nopal-verdura fresco en expendios comerciales de Texcoco, Edo de México.

II.2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la calidad sanitaria de jugos elaborados con nopal-verdura fresco en dos expendios comerciales de Texcoco, Estado de México, con la detección en medios selectivos de *Salmonella*, coliformes totales y *E. coli*, como indicadores de contaminación.
2. Identificar y caracterizar cepas sospechosas de *Salmonella* en muestras de jugos de nopal con pruebas bioquímicas.

II.3 HIPÓTESIS

1. Los jugos elaborados a base de nopal verdura fresco en expendios comerciales de Texcoco, Estado de México son de buena calidad microbiológica.

II.4 METODOLOGÍA

Se analizaron 162 muestras de 20 tipos de jugos frescos (Cuadro 2.1), preparados a base de nopal, y colectadas mensualmente durante el periodo de julio de 2009 a junio de 2010, en dos expendios comerciales de la zona centro de Texcoco, Estado de México. Uno de los expendios se caracterizó por estar ubicado en un edificio con servicio de agua potable (expendio A) y el otro, por estar ubicado en un local sobre la vía pública sin servicio de agua potable (expendio B).

Las muestras se colectaron en vasos de unicel con 500 y 1000 mL de jugo preparado al momento de tomar la muestra en ambos expendios, y se transportaron en frío al laboratorio para ser procesadas en las primeras 2 h después de su adquisición. Para estimar la carga microbiológica solo de los cladodios de nopal usados para la elaboración de los jugos en cada expendio, en cada colecta se tomó como referencia un jugo elaborado solo con agua y nopal, para que ningún otro ingrediente influyera en la cuenta final de los microorganismos.

Previo al análisis microbiológico, se determinó el pH de cada una de las muestras con un potenciómetro (pH/°C meter with GCP portable; Hanna instruments modelo 213 HI 98230, Rumania). Para estimar la presencia de coliformes totales y *E. coli* así como la de *Salmonella* se tomaron como referencia las normas NOM-113-SSA-1994 y NOM-114-SSA1-1994, respectivamente.

II.4.1 Detección y Aislamiento de Enteropatógenos

II.4.1.1 Detección de *Salmonella* con medios selectivos

El aislamiento de cepas sospechosas de *Salmonella* se llevó a cabo en medio de pre-enriquecimientos no selectivo y medio de enriquecimiento selectivo como se describe a continuación.

Para el pre-enriquecimiento no selectivo se pesaron 10 g de cada muestra y se mezclaron con 90 mL de Caldo Soya Tripticaseína (CST) en vasos para muestras estériles de 100 mL (SARSTEDT®) (Figura 2.1-A, B). Los vasos se incubaron a 37°C por 24 h (Figura 2.1-C). Posteriormente, de cada vaso se tomaron dos mL por separado de la suspensión, uno se transfirió a un tubo con 9 mL de Caldo Base Tetrionato (CBT) (Figura 2.1-D) y otro a un tubo con 9 mL de Caldo Vassilis-Rappaport (CVR). Después de incubarse a 37°C por 18 h, de cada tubo se tomaron dos muestras por separado con un asa estéril; una de las muestras se sembró en una caja Petri con Agar Entérico Hektoen (AEH) (Figura 2.2-A) y la otra en Agar Verde Brillante (AVB) (Figura 2.2-B). Las cajas se incubaron a 37°C por 24 h para detectar desarrollo de colonias con características morfológicas similares a las de *Salmonella*. Solamente aquellas colonias que se registraron verdes o azul verdes, con o sin centro negro y halo transparente en AHE fueron preservadas en glicerol a -20°C para su confirmación y caracterización con pruebas bioquímicas (Apartado 16 del Anexo).

II.4.1.2 Detección de coliformes totales y E. coli

Se pesaron 25 g de cada muestra de jugo y se mezclaron con 225 mL de Agua Buferada Peptonada (ABP) a 0.1% y se mezcló manualmente por 15 s, (Figura 2.3-A, B). De la suspensión obtenida se tomó un mililitro el cual se depositó en un tubo de ensayo con 9 mL de ABP a 0.1% para hacer diluciones seriales hasta 10^{-6} (diez a la menos seis). Cien μ L de cada dilución se depositaron en una caja Petri con Agar MacConkey (AM) y se distribuyeron uniformemente con una varilla de vidrio por 30 s sobre un plato giratorio (Figura 2.3-C). Después de un periodo de incubación a 37°C por 24 h se hizo el conteo de colonias correspondientes a coliformes considerando a todas las colonias lactosa positivas como coliformes (Figura 2.3-D). Para determinar la presencia de *E. coli*, se tomó como referencia el crecimiento morfológico característico de *E. coli* 042 en AM.

II.4.2 Identificación y Caracterización Bioquímica de Cepas Sospechosas de *Salmonella*

Todas las cepas (91 cepas) sospechosas de *Salmonella*, aisladas de jugos a base de nopal y preservadas en glicerol a -20°C, se reactivaron en CST y crecieron en AEH (Apartado 17 del Anexo) para someterse a un proceso de confirmación bioquímica de identidad. Para esto se tomaron como referencia las siguientes pruebas: producción de indol, rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer y producción de citrato (pruebas IMViC, por sus siglas en inglés, Winn *et al.*, 2008). Estas pruebas se complementaron con las de: movilidad, producción de sulfuro de hidrogeno (SO₂), desaminación y descarboxilación de la lisina, producción de azúcares y fermentación de azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa), en medios diferenciales (Terragno *et al.*, 2003).

II.4.2.1 Prueba de rojo de metilo y Voges-Proskauer

De cada una de las 91 cepas reactivadas se seleccionaron dos colonias para crecerlas por separado en 5 mL de medio MR-VP (dos tubos por cepa) a 35°C por cuatro días. Uno de los crecimientos se usó para la prueba de Voges-Proskauer y el otro para la prueba de rojo de metilo. Al crecimiento seleccionado para la prueba de Voges-Proskauer se le agregaron 5 mL de solución de sulfato de cobre y amonio (solución Leifson) (Apartado 1.2 del Anexo) mientras que al seleccionado para la prueba de rojo de metilo se le agregaron cinco gotas de solución indicadora para rojo de metilo (Apartado 1.1 del Anexo).

II.4.2.2 Prueba de citrato en Agar Citrato de Simmons (ACS)

La evaluación de la producción de citrato se hizo con crecimientos en tubo inclinados con 5 mL de Citrato de Simmons (Anexo). Para este fin, se seleccionó una colonia de cada una de las 91 cepas crecidas en AEH para sembrarse por separado con un asa sobre la superficie del medio ACS en tubo inclinado. Después de un periodo de incubación a 35°C por 24 h se registraron los cambios de color del medio.

II.4.2.3 Prueba de Movilidad, Indol y Ornitina en Agar Movilidad, Indol y Ornitina (MIO)

Para esta prueba se eligieron dos colonias de cada una de las 91 cepas crecidas en AEH. Se tomó por separado con un asa recta una muestra de masa bacteriana de cada colonia y se depositó en la parte central de un tubo de ensaye (25 x 150 mm) con 5 mL medio semisólido MIO. A las 24 h de incubación a 35°C, en uno de los tubos con crecimiento se registró visualmente la movilidad de la bacteria y la producción de ornitina; y en el otro, la formación de un anillo rojo indicativo de la producción de indol después de habersele adicionado 3 gotas de solución *de Kovac's* modificada de Erlich (Apartado 2 del Anexo).

II.4.2.4 Prueba para Lisina y Producción de ureasa

De cada una de las 91 cepas crecidas en AEH, se tomó masa bacteriana de una colonia con un asa recta y se depositó en el centro de un tubo con 5 mL de medio: Agar Hierro y Lisina (LIA) para la prueba de lisina; y, Caldo Urea (CU), para la producción de ureasa. Los medios inoculados se incubaron a 37°C por 24 h para registrar cambios de color y producción de ácido sulfhídrico, en el primer caso; y en el segundo, solo cambio de color.

II.4.2.5 Fermentación de azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa) y producción de H₂S

Para la fermentación de azúcares se usaron los medios de cultivo: Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI), para evaluar lactosa, sacarosa y glucosa; y, Agar Hierro de Kliger (AHK), para evaluar glucosa, lactosa y la capacidad de producir ácido sulfhídrico. Dos colonias de cada una de las 91 cepas crecidas en AEH se sembraron por separado en tubos con TSI y AHK. Después de 24 h de incubación a 37°C se registró visualmente el cambio de color y la producción de gas por desplazamiento del medio de cultivo.

II.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.5.1 Calidad Sanitaria de Jugos Elaborados a Base de Nopal Verdura

Durante el periodo de julio de 2009 a junio de 2010 se colectaron un total de 162 muestras procedentes de 20 tipos de jugos frescos, preparados a base de nopal, en dos expendios comerciales de la zona centro de Texcoco, Estado de México (Cuadro 2.1).

Las muestras registraron un pH promedio general de 4.65 ± 0.42 y calidad microbiológica deficiente de acuerdo a las NOM-113-SSA-1994 y NOM-114-SSA1-1994. Esto último independiente del tipo de jugo, expendio o mes de colecta (Cuadros 2.2-2.9; Figura 2.10).

II.5.2 Detección, Aislamiento e Identificación de Enteropatógenos como Indicadores de Contaminación

En 29 de las 162 muestras de jugos frescos colectadas se detectaron colonias sospechosas de *Salmonella* en medio AEH. Estas colonias se observaron verdes con centro negro y halo transparente por lo que se aislaron como cepas puras en AEH. En total se aislaron 91 cepas sospechosas de *Salmonella* a las cuales se les asignó una clave para manejo en laboratorio durante las pruebas de confirmación de identidad y caracterización bioquímica.

De acuerdo a los resultados obtenidos ninguna de las 91 cepas sospechosas se confirmó como *Salmonella* por las pruebas bioquímicas establecidas (Cuadro 2.10; Figuras 2.4-2.9). En general, las reacciones se registraron como negativas considerando los cambios en la coloración de los medios, así como la falta de crecimiento en los medios establecidos para tal fin de acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994 y al manual de procedimientos de aislamiento, identificación y serotipificación de *Salmonella* (Terragno *et al.*, 2003). Considerando las reacciones registradas en las diferentes pruebas, el 90.1 % de las cepas presentó características de *Citrobacter*

freundii y el 9.9% de *Proteus mirabilis*. Terragno *et al.*, (2003) indican que en pruebas preliminares *Salmonella* puede confundirse con *Citrobacter* y *Proteus*.

En el caso de *P. mirabilis* la pruebas de desaminación de la lisina y la producción de ureasa sirven para diferenciar esta bacteria del género *Salmonella*; mientras que, en el caso de *C. freundii*, la ausencia de descarboxilación-desaminación de la lisina sirve para hacer la diferenciación de *Salmonella*.

Aunque *P. mirabilis* y *C. freundii*, pertenecientes también a la familia Enterobacteracea, se consideran bacterias oportunistas (Terragno *et al.*, 2003) pueden ocasionar serias enfermedades en el hombre; como por ejemplo, *C. freundii* meningitis neonatal (Doran, 1999); y *P. mirabilis*, infecciones urinarias las cuales pueden resultar en la formación de cálculos renales (Allan, 2003).

De las 162 muestras de jugo a base de nopal analizadas, 136 (84%) resultaron positivas a CT y a *E. coli*, con cuentas de 4.2 a 4.6 y de 2.5 a 3.5, respectivamente. Como referencia la NOM-127-SSA1-1994 establece que en una muestra simple de agua el límite permisible de CT y *E. coli* es ausencia o no detectables. Por lo anterior, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que alguno(s) de los productos con los que se prepararon los jugos pudo estar contaminado al momento de elaborar el jugo. Sin embargo, la cantidad y diversidad de ingredientes de cada uno de los jugos evaluados hace más complejo determinar con exactitud cuál de los frutos y/o verduras usados fue la fuente de contaminación.

Algunos de los ingredientes usados en las formulas de los jugos muestreados como naranja, manzana, zanahoria, apio y perejil, han sido previamente reportados como vehículos de varios serotipos de *Salmonella* (Burnett y Beuchat 2001; Miranda *et al.*, 2009; Quiroz-Santiago *et al.*, 2009). Debido al tipo de manejo de las materias primas y a la falta de condiciones optimas en los establecimientos ubicados en la vía pública, los cuales carecen servicios de agua potable y drenaje, se corre el riesgo de contaminación cruzada y por consiguiente de adquirir alguna enfermedad por parte de los consumidores de jugos frescos (Martínez-Gonzales *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2006). Utensilios como exprimidores, cuchillos y jergas pueden ser reservorios de importantes patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales (Martínez-Gonzales *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2006).

Los resultados de las cuentas de CT aquí obtenidos no mostraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) cuando se analizaron por tipo y origen de jugo; sin embargo, al analizarse de acuerdo a la estación del año de colecta se registraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre ellos. Aunque la cuenta de CT se mantuvo relativamente constante se registró una cantidad significativamente menor ($\alpha=0.05$) en invierno (2009-2010) respecto a las obtenidas en las otras estaciones. Similarmente, la cuenta de *E. coli* fue significativamente mayor en verano y otoño de 2009, en relación a la registrada durante las estaciones de invierno y primavera. Lo anterior coincide con otros estudios que indican que las enfermedades gastrointestinales se reducen durante la época fría, disminución que se relaciona con una baja en la frecuencia de aislamiento de coliformes, en particular de *E. coli*, en dicho periodo (Herrera, 1990). La detección de *E. coli* en un producto es indicativo de la presencia de otros microorganismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* y *Citrobacter* (Parish, 1997). La contaminación por estos y otros patógenos puede ocurrir durante el manejo del producto por el personal o equipo con poca higiene o bien por contacto de insectos con la superficie de la fruta, entre otros (Parish, 1997).

II.6 CONCLUSIONES

Los 20 tipos de jugos frescos preparados a base de nopal, colectados mensualmente durante el periodo de julio de 2009 a junio de 2010, en expendios comerciales de la zona centro de Texcoco, Estado de México, registraron calidad microbiológica deficiente ya que se detectó a *E. coli*. Esta bacteria puede ser un indicador de la presencia de otros microorganismos entéricos patogénicos a las personas.

De 162 muestras de jugos analizadas, se aislaron 91 cepas sospechosas de *Salmonella*; sin embargo, ninguna de estas cepas se confirmó como *Salmonella* por las pruebas bioquímicas: producción de indol, rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer y producción de citrato (pruebas IMViC, por sus siglas en inglés), complementadas con las pruebas de movilidad, producción de sulfuro de hidrogeno (SO_2), desaminación y

descarboxilación de la lisina, producción de azúcares y fermentación de azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa), en medios diferenciales.

Debido a que los jugos frescos pueden servir como vehículos de transmisión de patógenos a los consumidores, el monitoreo de la calidad sanitaria de las frutas y hortalizas frescas así como la implementación de Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y la higiene personal, son puntos importantes de control para reducir la contaminación de estos productos.

II.7 LITERATURA CITADA

- Allan R. 2003. The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens. *Disease-a-month* 49 (2): 71-82.
- Basurto-Santos D., Lorenzana-Jiménez M., and Magos-Guerrero G. A. 2006. Utilidad del nopal para el control de la glucosa en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista de Facultad de Medicina. UNAM* 49 (4): 157-162.
- Burnett S. L., and Beuchat L. R. 2001. Food-borne pathogens human pathogens with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27: 104-110.
- Castillo A., Villarruel-López A., Navarro-Hidalgo V., Martínez-González N. E., and Torres-Vitela M. R. 2006. *Salmonella* and *Shigella* in freshly squeezed orange juice fresh oranges, and wiping cloths collected from public markets and street booths in Guadalajara, México: incidence and comparison and analytical routes. *Journal of Food Protection* 69 (11): 2595-2599.
- Doran T.I. 1999. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: Review. *Clinical Infectious Diseases* 28:384–94.
- Doyle M. P., and Erickson M. C. 2008. Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce an overview. *Journal of Applied Microbiology* 105 (2): 317-330.

- Felix-Fuentes A., Campas-Baypoli O. N. y Meza-Montenegro M. 2005. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad Obregón, Sonora, México. RESPYN. Revista Salud Pública y Nutrición 6 (3): 1-12.
- Feugang J. M., Konarski P., Zou D., Stintzing F. C., and Zou, C. 2006. Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience* 11: 2574-2589.
- García-Gómez R., Chávez-Espinosa J., Mejía-Chávez A., y Durán-de-Bazúa C. 2002. Microbiological determinations of some vegetables the Xochimilco zone in Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44 (1): 24-30.
- Gorny J. 2006. Microbial contamination of fresh fruits and vegetables *In: Microbiology of microbiology of fruits and vegetables*. CRS Taylor & Francis. 2006. Sapers G.M., Gorny J. R., Yousef A. E.
- Hernández A. A. M., Landa S. P., Mora A. G., Eslava C. C. A., Call J. E., Porto-Fett A. C. S., and Luchansky J. B. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. Abstracts of the Annual Meeting of the International Association for Food Protection (P1-37):74-75.
- Herrera G. 1990. Epidemiología de las diarreas Pp. 5-16. En: Prevención y control de las diarreas. Oficina Sanitaria de Panama. UNISEF.
- Hirovani H., Naranjo J., Motoyoqui P. G., and Gerb C. P. 2002. Demonstration of indicator of microorganisms on surface of vegetables on the market in the United States and Mexico. *Food Microbiology and Safety* 67 (5): 1847-1850.
- Lewis J. E., Thompson P., Rao BVVBN., Kavavati C., and Rajanna. 2006. Human bacteria in street vended fruit juices: A case study of Visakhapatnam city, India. *Internet Journal of Food Safety* 8: 35-35.
- López-Herranz G. P., y Arroyo-Valerio A. G. 2008. Consumo de hierbas medicinales en pacientes pre-quirúrgicos en el Hospital General de México. *Revista Médica del Hospital General de México* S.S 71 (1):6-10.
- Martínez-Gonzales N. E., Hernández-Herrera A., Martínez-Chávez M.O., Rodríguez-García M.R., Torres-Vitela M. R., and Mota de la Garza L., Castillo A. 2003.

- Spread of bacterial pathogens during preparation of freshly squeezed orange juice. *Journal of Food Protection* 66: 1490-1494.
- Miranda J. M., Mondragon A. C., Martínez B., Guarddon M., and Rodríguez J. A. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in México. *Journal of Food Protection* 72 (5): 966-971.
- Mudgil S., Aggarwal D., and Ganguli A. 2004. Microbial analysis of street vended fresh squeezed carrot and kinnow-mandarin juices in Patiala city, India. *Internet Journal of Food Safety* 3:1-3.
- 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*.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. *Diario Oficial de la Federación*.
- Parish M. E. 1997. Public health and nonpasteurized fruit juices. *Critical Reviews in Microbiology*, 23 (2): 109-119.
- Quiroz-Santiago C., Rodas-Suárez O., Vázquez-Q C.R., Fernández F. J., Quiñonez-Ramírez E. I., and Vásquez-Salinas C. 2009. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from México. *Journal of Food Protection* 72 (6): 1279-1282.
- Sapers G. M. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetables products. *Food Technology and Biotechnology* 39: 305-311.
- Saucedo-Tamayo M. del S., Bañuelos-Flores N., Cabrera-Pacheco R. M., Ballesteros-Vásquez N. 2006. La práctica de la medicina alternativa una realidad en el paciente diabético en Hermosillo, Son., México. *Revista Salud Pública y Nutrición* 7 (4): 1-12.
- Scallan E., Hoekstra R. M., Angulo F. J., Tauxe R. V., Widdowson M-A., Roy S. L. Jones J. L., and Griffin P. 2011. Foodborne Illness acquired in the United States – Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17 (1): 16-22.

- Taddei-Bringas G. A., Santillana-Macedo M. A., Romero-Cancio J. A. and Romero-Tellez, M.B. 1999. Aceptación y uso de la herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública de México* 41 (3): 216-220.
- Terragno R., Caffer M. A. I., Bruno S., and Binsztein N. 2003. Parte I: Aislamiento Identificación y Serotipificación de *Salmonella*. Manual de Procedimientos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Departamento de Bacteriología. Buenos Aires, Argentina. pp.56.
- Warriner K., Huber A., Namvar A., Fan W. and Dunfield K. 2009. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Advances in Food Nutrition Research* 57:155-208.
- Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Koneman E. W., Procop G. W., Schreckenberger P. C., and Woods G. L. 2008. Koneman, Diagnóstico microbiológico, texto y atlas en color. 6ta. Edición. Editorial Panamericana. Pp-1475.

III. PERSISTENCIA E INTERNALIZACIÓN DE *Salmonella typhimurium* EN SUELO Y CLADODIOS DE NOPAL VERDURA

III.1 INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas frescas se han relacionado con numerosos brotes de enfermedades por patógenos de humanos (Berger *et al.*, 2010; Beuchat, 2002; Tauxe *et al.*, 2002). Brotes por salmonelosis se asociaron con el consumo de lechuga, tomate y melón cantaloupe, los cuales resultaron en numerosas hospitalizaciones y muerte de varias personas (Hilborn *et al.*, 1999; Horby *et al.*, 2003; Sivapalasingam, 2003).

El suelo fertilizado con abono orgánico fresco, sin compostear, se encuentra entre las principales fuentes de inóculo de *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) (Chapman *et al.*, 1993; Veling *et al.*, 2002). En el suelo, la bacteria puede permanecer viable por periodos extendidos de tiempo y de ahí transmitirse a las plantas en crecimiento (Himathongkham *et al.*, 1999a,b; Islam *et al.*, 2004). Guo *et al.*, (2001) reportaron que *Salmonella* se encuentra entre los microorganismos patógenos de humanos con capacidad de invadir e internalizarse en los tejidos de las plantas. Estos investigadores registraron la presencia de células de *Salmonella* en la pulpa de frutos de tomate colectados de plantas inoculadas en etapa de floración por inyección de tallos y cepillado de flores con los serotipos *S. enterica* serovar Poona, *S. enterica* serovar Michigan, *S. enterica* serovar Enteritidis, *S. enterica* serovar Montevideo y *S. enterica* serovar Hartford.

Por otra parte, Warriner *et al.*, (2003), reportaron que una raza de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo bioluminiscente expresó capacidad para colonizar plántulas de frijol después de 24 h de iniciada la germinación de semillas de frijol mungo contaminadas con esta bacteria. Células bacterianas de baja viabilidad se observaron en los espacios intercelulares de las células epidermales del hipocotilo y células viables se recuperaron de fluido apoplástico y de extractos de germinados, previamente desinfectados con 20,000 ppm de hipoclorito de sodio. Similarmente, las razas de *S. enterica* serovar Typhimurium, MAE 110 (de morfología multicelular) y 119 (de morfología tipo silvestre), transformadas con el plásmido de la proteína verde fluorescente (pGFP) mostraron capacidad de colonizar el tejido interno de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* cv. Tamburo) crecidas tanto en un sistema de suelo como en un sistema hidropónico inoculados con la bacteria. Aunque en el sistema de hidroponía

la colonización ocurrió solamente con altas densidades de la raza MAE 119; en el sistema suelo, ambas razas 110 y 119 se encontraron en altas densidades infectando las hojas (Franz *et al.*, 2007).

Lo anterior es de especial importancia cuando las frutas y hortalizas se consumen frescas por la dificultad de remover o eliminar las células bacterianas durante el proceso normal de lavado y desinfección (Itoh *et al.*, 1998; Jablasone *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2002; Wachtel *et al.*, 2002; Warriner *et al.*, 2003).

Cabe señalar que en México diferentes serotipos de *Salmonella* se han aislado de hortalizas como perejil (*Petroselinum hortense*), cilantro (*Coriandrum sativum*), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis*), papaloquelite (*Porophyllum ruderale*), verdolaga (*Portulaca oleracea*), lechuga orejona (*Lactuca sativa*), espinaca (*Spinacia oleracea*), berro (*Nasturtium officinalis*), perejil chino (*P. hortense*), betabel (*Beta vulgaris*), apio (*Apium graveolens* var. *dulce*), lechuga Romana (*L. sativa*), repollo (*B. oleracea* var. *capitata*), y papa (*Solanum tuberosum*) (Quiroz-Santiago *et al.*, 2009).

Recientemente *Salmonella* se aisló de plantas de nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) así como de muestras de suelo y agua de uso agrícola obtenidas de plantaciones de nopal verdura sin un esquema de Buenas Prácticas Agrícolas (Hernández *et al.*, 2009). La detección de *Salmonella* se relacionó, en este estudio, con la práctica común, entre algunos productores de la región, de aplicar abono orgánico sin compostear así como con la poca higiene de los materiales utilizados durante el manejo pre y postcosecha del cultivo Hernández *et al.*, (2009).

Debido a que el nopal puede servir como un vehículo de transmisión de *Salmonella* a las personas que consumen este producto en fresco o mínimamente procesado, y a que puede servir como un factor de contaminación de otros productos alimenticios, el objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium de persistir e internalizarse en cladodios de nopal. Lo anterior es relevante en la toma de decisiones sobre recomendación de consumo de este producto en fresco, por sus propiedades medicinales y actividad antiulcerosa, o bien de requerimientos de desinfección del cladodio previo a su consumo.

III.2 OBJETIVOS

III.2.1 Objetivo General

Determinar el potencial de persistencia e internalización de *Salmonella* en plantas de nopal bajo condiciones de invernadero.

III.2.2 Objetivos Específicos

1. Establecer la capacidad de persistir de *S. typhimurium* en suelo de plantas de nopal en macetas.
2. Determinar la capacidad de persistir de *S. typhimurium* en cladodios madre y cladodios secundarios en planta, así como en cladodios secundarios precortados.
3. Evaluar la capacidad de internalización de *S. typhimurium* en raíces y cladodios madre y secundario.

III.3 HIPOTESIS

1. *S. typhimurium* tiene el potencial de persistir tanto en suelo como en cladodios en planta y cladodios precortados en condiciones de invernadero y laboratorio, respectivamente.
2. *S. typhimurium* tiene la capacidad de internalizarse en los tejidos de plantas de nopal cuando se encuentra presente en suelo contaminado.

III.4 METODOLOGÍA

III.4.1 Establecimiento de Plantas en Invernadero

El material propagativo (cladodios) se obtuvo de plantas de nopal (*Opuntia ficus indica* variedad Milpa Alta), de un año de edad crecidas en invernadero. Previo al

establecimiento de las plantas. Los cladodios se mantuvieron sobre papel estraza a temperatura ambiente de laboratorio por tres semanas para dar tiempo a que la herida donde se hizo el corte secura. Posteriormente, los cladodios se colocaron en macetas de plástico (Carrasco®) con una mezcla de suelo-vermicomposta (3.5:1.5 Kg), estableciendo un cladodio por maceta (Figura 3.1-A) y se mantuvieron en invernadero a temperatura ambiente con dos riegos con agua de pozo por semana hasta la producción de cladodios secundarios (de segundo orden) y terciarios (de tercer orden). Después de 9 meses de establecidas las plantas se inició la inoculación de suelo y de cladodios con una suspensión de *Salmonella* (Figura 3.1-B) como se describe a continuación.

III.4.2 Cepa Bacteriana y Preparación de Inoculo

Se usó una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC23564, donada por el Centro de Investigación en alimentación y desarrollo, A. C. (CIAD), resistente a Kanamicina (Sigma-Aldrich®) (50 µg/mL) (Landa *et al.*, 2009) y almacenada en agua-glicerol (50:50) a -20°C. La cepa, registrada en el laboratorio como *Salmonella* Typhimurium (*S. typhimurium*) St4-Km⁵⁰, se reactivó en Caldo Soya Tripticaseína (CST) más Kanamicina (CST-Km⁵⁰) a 37°C por 18 h y se creció en Agar Soya Tripticaseína (AST) más Kanamicina (AST-Km⁵⁰) a 37°C por 48 h. De las cajas con crecimiento se preparó inoculo en tubos de ensaye con 9 mL de Agua Buferada Peptonada (ABP) a 0.1% donde la población bacteriana se ajustó a 8×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, en un espectrofotómetro (Genesys® 10 UV, Termo spectronic) a 560 nm. De las suspensiones obtenidas, se tomaron muestras de 1 y 3 mL las cuales se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y en frascos de vidrio de 450 mL con 297 mL de ABP a 0.1%, respectivamente. Los tubos y frascos con las suspensiones de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ se transportaron al invernadero para la inoculación de suelo y de cladodios en un periodo no mayor de 2 h de haberse preparado el inoculo.

III.4.3 Inoculación de Suelo y de Cladodios

Se probaron tres esquemas de inoculación para determinar: 1) la persistencia de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ en suelo y en tejido de nopal; 2) la capacidad de St4-Km⁵⁰ para colonizar la superficie de raíces y de ingresar al tejido interno de las mismas; y, 3) la habilidad de la bacteria para internalizarse en el tejido de los cladodios de nopal.

III.4.3.1 Inoculación de suelo. Se estableció para simular la condición de un suelo agrícola contaminado con *Salmonella* y en proximidad con las raíces de las plantas. Para esto, 300 mL de suspensión bacteriana de St4-Km⁵⁰ con 6 log UFC/mL en ABP a 0.1%, se depositaron directamente sobre el suelo de una maceta con una planta de nopal de 9 meses de crecimiento. La deposición se realizó evitando salpicar el tejido de la planta. En total se inocularon 50 macetas de las cuales a 45 se les aplicó suspensión bacteriana y a las 5 restantes solo ABP (control) (Figura 3.2-A).

III.4.3.2 Inoculación de cladodios en planta. Para determinar la capacidad de *Salmonella* de persistir e invadir los tejidos internos de nopal, 300 µL de suspensión bacteriana de St4-Km⁵⁰ en ABP a 0.1% con 8 Log UFC/ mL se infiltraron a través de la aguja (30G x 13 mm) de una jeringa de 1 mL (BD Ultra-Fine™) en un cladodio madre (cladodio de primer orden) o un cladodio secundario por planta. El inóculo se aplicó lentamente en tres puntos equidistantes (con 10 cm de distancia entre ellos) y en volumen similar en la parte superior del cladodio para evitar derrames del líquido (Figura 3.2-B y C). Cerca de la región de inoculación se puso una marca con tinta permanente (BIC® marking, permanent marker) para ubicar dicha región durante la inspección y el muestreo de tejido (Figura 3.2-D). En total se inocularon 45 cladodios con St4-Km⁵⁰ y 5 cladodios con ABP a 0.1% como control negativo. En el caso de cladodios madre, se inoculó un cladodio por planta; y en el de los secundarios, dos cladodios por planta. Después de cada 10 cladodios inoculados se hizo cambio de jeringa por una nueva. Las plantas inoculadas se mantuvieron en condiciones de invernadero y se regaron dos veces por semana con agua de pozo, sin fertilización ni aplicación de pesticidas.

III.4.3.3 Inoculación de cladodios precortados. Para determinar la capacidad de *Salmonella* de persistir en cladodios precortados, 300 μ L de suspensión bacteriana de St4-Km⁵⁰ en ABP a 0.1% con 8 Log UFC/mL se infiltraron como se describió anteriormente a través de la aguja (30G x 13 mm) de una jeringa de 1 mL (BD Ultra-Fine™) en un cladodio secundario, previamente colectado de plantas de nueve meses crecidas en invernadero. Después de la inoculación, los cladodios se colocaron sobre papel aluminio (Specialfoil aluminum®), dentro de cajas de plástico con tapa (27.8 x16.5 x 4.5 cm) y se mantuvieron en condiciones de laboratorio.

El esquema anterior de inoculación de suelo y cladodios se repitió al menos una vez con el mismo número de unidades durante el periodo de invierno y otoño de 2010. En cada experimento se tomaron lecturas de pH de cladodios secundarios en planta, previamente inoculados con St4-Km⁵⁰, durante 8 h a intervalos de 1 h, con un potenciómetro con electrodo tipo aguja (pH/ °C meter with GLP; Hanna® Instruments HI 98230, Rumania). Así mismo, se registró la temperatura y humedad relativa del laboratorio e invernadero con un data logger HOBO® (Figura 3.3).

III.4.4 Persistencia de *S. typhimurium*

III.4.4.1 Persistencia en suelo. Después de la inoculación, durante 15 días cada 24 h se colectaron muestras de suelo de tres macetas con St4-Km⁵⁰ y de una maceta control. Para esto se colectaron 50 g de suelo por maceta, se depositaron en una bolsa Ziploc® (17.8 x 22.1 cm) estéril y se analizaron durante las siguientes 2 h (Figuras 3.4-A y B). De cada muestra se tomaron 25 g de suelo (Figura 3.4-C) los cuales se depositaron en matraces con 225 mL de ABP a 0.1% y se agitó suavemente por 30 s (Figura 3.4-D). De la mezcla homogeneizada se transfirió 1 mL a un tubo con 9 mL de ABP a 0.1% para hacer diluciones seriales hasta 10⁻⁵. Cien μ L de cada dilución se depositaron por duplicado en Agar Entérico Hektoen más Kanamicina (50 μ g/mL) (AEH-Km⁵⁰) y se incubaron a 37°C por 48 h.

III.4.4.2 Persistencia en tejido de nopal. Se colectaron cladodios de nopal inmediatamente después de la inoculación y posteriormente cada 24 h por 10 o 15 días para la detección de St4-Km⁵⁰ de acuerdo a la Norma Oficial NOM-114-SSA1-1994.

Para esto se cortó a 5 y a 10 cm por encima del nivel del suelo, para obtener los cladodios madre, y en el punto de unión con el cladodio madre, para tener los cladodios secundarios. Para los cortes se utilizó un cuchillo previamente desinfectado con etanol a 96%. Los cladodios colectados se depositaron sobre papel aluminio (Figura 3.5-A), previamente esterilizado con luz UV (Lámpara PHILIPS UV 30W/630 T8) por 15 min, y se transportaron al laboratorio para ser procesados en las siguientes 2 h.

Previo a la extracción, los cladodios se lavaron con agua corriente de la llave, se desinfectaron superficialmente, por separado, en una charola (30 x 27.5 X 5.5 cm) con cloro a 200 ppm por 3 min (Figura 3.5-B), y después de enjuagarse con agua destilada se colocaron sobre papel aluminio estéril bajo luz UV (Lámpara PHILIPS UV 30W/630 T8 a una distancia de 63 cm) por 15 min en una campana de bioseguridad (ThermoForma®, Class II Biological Safety Cabinet). La extracción y estimación del número de células viables de St4-Km⁵⁰ se realizó de acuerdo a Madigan *et al.*, (2001). Del área de inoculación, de cada cladodio se cortó 1 cm de tejido con un cúter estéril (Figura 3.5-C), se depositó en una bolsa Bol-Lock® (17 x 17 cm) estéril con 900 µL de ABP a 0.1% y se maceró en un stomacher (Seward®, stomacher 400 circulator) por 1 min a 300 rpm (Figura 3.5-D). Del macerado obtenido se tomaron tres muestras de 100 µL cada una; una para siembra directa en AEH-Km⁵⁰, otra para hacer diluciones seriales, y una más para enriquecimiento en Caldo Soya Trypticaseína con Kanamicina (CST-Km⁵⁰) (MCD Lab S.A. de C.V.). Esto último para incrementar la oportunidad de detectar la bacteria en caso de encontrarse debajo del límite de detección. De las suspensiones bacteriales obtenidas se tomaron muestras con un asa estéril y se estriaron en AEH-Km⁵⁰. Las cajas inoculadas se incubaron a 37°C por 48 h.

III.4.5 Internalización en Tejido de Nopal

Para determinar la capacidad de internalización de la bacteria se colectaron raíces y cladodios de plantas crecidas en suelo inoculado así como de plantas inoculadas directamente con St4-Km⁵⁰. Para la colecta, el cladodio madre, con cladodios secundarios y terciarios, se cortó a 5 cm sobre el nivel del suelo; y las raíces se extrajeron directamente de la maceta cada 24 h durante 10 días. Los cladodios y

raíces colectados se transportaron por separado en bolsas Ziploc ® estériles al laboratorio donde se lavaron con agua corriente de la llave y se desinfectaron como sigue. Las raíces con etanol a 80% por 30 min y posteriormente con cloro a 200 ppm por 15 min; y los cladodios, con cloro a 200 ppm por 3 min (Zhang *et al.*, 2009). En ambos casos se realizó un enjuague final con agua destilada estéril.

Las raíces desinfectadas se depositaron en bolsas Ziploc ® estériles, con ABP a 0.1% en proporción 1:10, con respecto al peso fresco del tejido, y se maceraron en un stomacher (Seward ®, stomacher 400 circulator) por 3 min a 300 rpm. Del macerado obtenido se tomaron muestras de 100 µL, se estriaron en AEH-Km⁵⁰ y se incubaron a 37°C por 48 h. Los cladodios madre y los cladodios secundarios desinfectados (10 de cada uno, respectivamente), colectados de plantas crecidas en suelo inoculado con St4-Km⁵⁰, se procesaron como se indicó anteriormente.

De los cladodios secundarios desinfectados, colectados de plantas inoculadas con St4-Km⁵⁰, se extrajo tejido a 1, 5 y 10 cm a partir del punto de inoculación así como tejido de la base del cladodio terciario para ser procesados. Para esto el tejido se colocó por separado en tubos de ensaye Eppendorf con CST-Km⁵⁰ y se incubó a 37°C por 48 h. De la suspensión así obtenida se tomaron muestras de 100 µL para estriarse en cajas Petri con AEH-Km⁵⁰. Las cajas se incubaron a 37°C por 48 h.

III.4.6 Preparación de Muestras para Microscopía

Muestras de tejido de cladodios secundarios, previamente lavados y desinfectados, se analizaron al microscopio electrónico de barrido JSM 6390 (JEOL, Japón). El tejido se colectó a 0 y 10 cm a partir del punto de inoculación al tiempo 0 y a las 24, 48, 72, 96, 120 y 168 h, después de la inoculación con St4-Km⁵⁰. Una vez fijadas en glutaraldehído a 2.5%, las muestras (de 3 a 5 mm, Figura 3.6 A y B) se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen 0.1 M pH 7.2 (González *et al.*, 2003), y se deshidrataron con soluciones graduales de alcohol etílico (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%; dos veces en cada una) por 1 h en cada concentración con un cambio de alcohol de la misma concentración cada 30 min (Figura 3.6-C). Después de secarse por 40 min a punto crítico con CO₂ en una

secadora Samdri-780A® (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA; Figura 3.6-D), las muestras se recubrieron con una aleación oro-paladio (Au-Pd) con una ionizadora de metales (JEOL, Fine coat JFC-1100; Figura 3.7-A y B) para ser observadas al microscopio electrónico de barrido (Figura 3.7-C y D).

III.4.7 Confirmación de Identidad de Cepas por PCR

De 12 cepas presuntivas de *Salmonella* aisladas de suelo (3) y de cladodios madre (5) y cladodios secundarios en invernadero (1) y laboratorio (3), inoculados con St4-Km⁵⁰, se extrajo ADN de células crecidas en tubos con 5 mL de CST-Km⁵⁰ sin agitación a 37°C por 24 h. La extracción de ADN se hizo de acuerdo a Guo *et al.* (2000) para la amplificación del gen *invA* con los iniciadores Sal-3 (5' TAT CGC CAC GTT CGG GCA A 3') y Sal-4 (5' TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3') y con el Kit de PCR (PCR Master Mix) (Promega®). La mezcla de reacción constó de: agua libre de nucleasas, 6.2 µL; muestra problema de ADN 100 µmol, 5 µL; iniciadores Sal-3 y Sal-4, 100 µmol de cada uno, 0.65 µL por iniciador; mezcla de PCR Master Mix, 12.5 µL, con volumen final de 25 µL. La reacción se efectuó en un termociclador de gradiente (Techne®, TC-512) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 1 min; 35 ciclos, cada uno con: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación de iniciadores a 50°C por 1 min y extensión de ADN a 72°C por 2 min; y extensión final a 72°C por 5 min. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa a 0.8% con bromuro de etidio (1 µL) y se visualizó en un transiluminador (Gene Wizard®, Syngene Bio Imaging).

III.4.8 Análisis Estadístico

Los datos de poblaciones bacterianas obtenidas de dos ensayos con tres repeticiones cada uno, se transformaron a Log UFC g⁻¹ de suelo y tejido, respectivamente, y se analizaron utilizando el modelo lineal correspondiente a un diseño completamente al azar, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias, usando el método de Tukey (P≤0.05).

III.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.5.1 Persistencia de *S. typhimurium*

III.5.1.1 Persistencia en suelo

Salmonella typhimurium St4-Km⁵⁰ persistió en suelo por 14 días después de la aplicación por infiltración del inoculo al suelo en macetas con plantas de nopal, de nueve meses de crecimiento, en invernadero (Cuadro 3.1). Después de ese tiempo no se recuperaron células de la bacteria aún en muestras sometidas a enriquecimiento en Caldo Soya Trypticaseína con Kanamicina (50 µg/mL). En suelo el decremento de la población bacteriana fue paulatino pero constante hasta alcanzar niveles de 1 UFC/mL o menos después de los 9 días después de la inoculación (ddi).

La capacidad de *Salmonella* de persistir en suelo es muy variable, pudiendo alcanzar periodos que van desde los 49 (Guo *et al.*, 2001) hasta los 231 días (Islam *et al.*, 2004). Sin embargo, son diversos factores los que afectan la supervivencia de la bacteria tales como el tipo de suelo (Zibilske y Weaver 1978), la presencia de otros microorganismos (Cooley *et al.*, 2006; Zibilske y Weaver 1978), y las condiciones de temperatura ambiental (García *et al.*, 2010). Algunas veces puede presentarse la lixiviación de las células bacterianas al momento del riego (Natvig *et al.* 2002). En este estudio, es probable que la reducción de la población de *Salmonella typhimurium* en suelo se deba principalmente a las condiciones ambientales de temperatura (T_{\max} 34.5°C y T_{\min} 2.03°C), y humedad relativa (HR_{\max} 94.5% y HR_{\min} 23.5%) registradas en el invernadero durante el periodo en el que se desarrolló el experimento; así como a la condición del sustrato utilizado. Como sustrato se utilizó una mezcla de suelo franco arenoso con vermicomposta (5.5:1.5) sin esterilizar para el crecimiento de las plantas de nopal. Cabe señalar que se detectó la presencia de *Fusarium* sp., en el suelo de las macetas. Por lo anterior es posible que alguna de éstas o varias de las condiciones anteriores pudieran haber influido en la persistencia de *S. typhimurium* en el suelo de las macetas de nopal en invernadero.

Aunque no se tienen registros de la producción de exudados de raíces de plantas de *O. ficus indica* con efectos antimicrobianos, Gómez-Flores *et al.*, (2006), reportaron la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana en cladodios de la cactácea *Nopalea cochenillifera*, contra *E. coli*, *S. typhimurium* y *Candida albicans*. Es posible que los compuestos antimicrobianos que se encuentran en *N. cochenillifera* sean semejantes y/o iguales a los de *O. ficus-indica* por pertenecer ambos géneros a la familia de las cactáceas (Griffith y Porter, 2009).

III.5.1.2. Persistencia en cladodios de nopal

III.5.1.2.1 Madre en planta. *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ persistió en el tejido por 14 días después de la aplicación por infiltración del inóculo en el cladodio madre en invernadero. Similarmente a lo registrado en suelo, el decremento de la población de la bacteria fue paulatino pero constante hasta alcanzar niveles de 1 UFC/mL o menos a partir de los 9 ddi (Cuadro 3.1).

III.5.1.2.2 Secundario en planta. *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ persistió en el tejido por 9 días después de la aplicación por infiltración del inóculo en cladodio secundario en invernadero. Sin embargo, en contraste a lo registrado en cladodio madre, la población de la bacteria decreció rápidamente durante las primeras 24 h alcanzando niveles de 1 UFC/mL o menos a los 5 ddi. A partir de los 10 ddi no se recuperó a la bacteria aun en medios con enriquecimiento (Cuadro 3.1).

III.5.1.2.3 Secundario precortado. *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ persistió en el tejido por 14 días después de la infiltración del inóculo en el cladodio secundario precortado, mantenido en laboratorio. Inicialmente la población de la bacteria registró un decremento durante los primeros 8 ddi; sin embargo, a partir de esa fecha mostró un incremento paulatino de aproximadamente 2 Log a los 14 ddi (Cuadro 3.1). Lo anterior contrasta con lo registrado en suelo y cladodios en plantas en invernadero.

El tejido inoculado de los cladodios madre y secundario *en planta* y cladodios precortados, con *Salmonella typhimurium* St4-Km⁵⁰, registraron cambio en la coloración de tejido, de verde a café. Aunque el cambio, tardó pero de mayor intensidad, se

registró en el tejido de los cladodios precortados (Figura 4.2). Es probable que el cambio rápido de color en los cladodios en planta se deba a una respuesta de defensa caracterizada por la producción de compuestos antimicrobianos de naturaleza fenólica como la registrada previamente por Gómez-Flores *et al.*, (2006) en *Nopalea cochenillifera*. En esta cactácea se registró la producción de compuestos antimicrobianos en respuesta a *E. coli*, *S. typhimurium* y *Candida albicans*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que aunque *Salmonella* puede persistir en tejido de nopal, su duración depende del estado fisiológico del tejido. En tejido joven, como el del cladodio secundario en planta, la capacidad de persistir se encontró limitada así como su crecimiento, posiblemente por la respuesta rápida registrada y asociada con el cambio de color en este tipo de tejido. En este caso el cambio de color puede estar relacionado con la producción y acumulación de compuestos de naturaleza fenólica. Cabe señalar que las sustancias fenólicas forman parte de la resistencia en plantas no hospederas en respuesta a microorganismos patogénicos (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

En cladodio secundario precortado de nopal, *S. typhimurium* registró el mayor tiempo de persistencia (14 días) y un incremento en la población de la bacteria (2 Log). Varios reportes indican que la capacidad de *Salmonella* de persistir en tejido vegetal es de nueve días, aunque algunos otros indican periodos menores o mayores (3 y 231 días, respectivamente) (Cuadro 1.4). Brandl y Amudson (2008), encontraron que el tamaño de las poblaciones de *E. coli* y de *Salmonella enterica* fue similar tanto en tejido joven de lechuga en planta como en el de lechuga precortada. Esta diferencia que contrasta con lo encontrado en este estudio, puede estar relacionada con el tipo de planta y de tejido así como con las condiciones experimentales en las que se establecieron los experimentos. Por ejemplo, Pu *et al.*, (2009), reportaron que hojas de espinaca entre tres y cinco semanas de edad fueron más susceptibles a la colonización por *E. coli* O157:H7, que las hojas de tres semanas.

Por otra parte, *Salmonella* ha mostrado capacidad de colonizar y multiplicarse dentro de los tejidos de las plantas. Por ejemplo, en jitomate *S. typhimurium* colonizó el

tejido apoplástico y se internalizó en el tejido de las plantas Guo *et al.*, (2001) y Gu *et al.*, (2011).

III.5.1.3 Análisis estadístico

La prueba de comparaciones múltiples de medias del análisis estadístico usando el método de Tukey muestra diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los resultados registrados de cladodios madre y cladodios secundario, en planta, y cladodios secundarios precortados (Cuadro 3.1).

III.5.2 Internalización de *S. typhimurium*

El análisis microbiológico del tejido obtenido de raíces y de cladodios de plantas, crecidas en suelo inoculado, así como de plantas inoculadas directamente, mantenidas en condiciones de invernadero, resultó negativo a St4-Km⁵⁰. En las cajas Petri con AEH-Km⁵⁰ inoculadas con suspensión de esos tejidos e incubadas a 37°C no se registró crecimiento de colonias sospechosas de *Salmonella* ni de ningún otro tipo de bacterias.

Lo anterior indica que bajo las condiciones aquí probadas *Salmonella typhimurium* no mostró capacidad para movilizarse e internalizarse en el tejido de plantas de nopal verdura. *S. typhimurium* se detectó únicamente en el punto donde se depositó en los cladodios. Estos resultados contrastan con lo reportado por Cooley *et al.*, (2003), Franz *et al.*, (2007), Jablasone *et al.*, (2005) y Deering *et al.*, (2012) sobre la capacidad de especies de *Salmonella* de internalizarse a través de las raíces y de transportarse dentro de los tejidos de las plantas como lo señalaron previamente Guo *et al.*, (2001).

La incapacidad de *Salmonella* de penetrar e internalizarse en nopal verdura a través de las raíces puede estar relacionada con su periodo de persistencia en suelo, bajo las condiciones de temperatura y HR del invernadero (Figura 3.8), así como con la naturaleza misma de las raíces de *O. ficus indica*. Las raíces de esta cactácea se caracterizan por tener varias capas de tejido suberizado (Nobel, 2002). Por otra parte, la falta de movimiento dentro del tejido de los cladodios pudo deberse a la alta viscosidad del mucílago. El mucílago es un polisacárido que tiene la capacidad de

retener agua para evitar la deshidratación del tejido, y tiende a ser más viscoso a mayor edad del tejido (Sáenz *et al.*, 2004). Esta característica podría haber evitado el libre desplazamiento de la bacteria a través de los tejidos. Sin embargo es necesario establecer pruebas adicionales para poder verificar esta hipótesis.

Aunque no se detectó crecimiento de otro tipo de bacterias diferentes a *Salmonella* en AEH-KM⁵⁰, éste si se registró en tubos de enriquecimiento con CST-Km⁵⁰. Unidades formadoras de colonias (UFC) diferentes a las de *Salmonella* se detectaron de manera sistemática en CST-Km⁵⁰ donde se inocularon muestras de tejidos de cladodios madre y cladodios secundarios en planta. Las colonias se observaron blancas translucidas, de forma irregular, y de aspecto rugoso con bordes ondulados. Por estas características así como por los resultados registrados con la prueba de Ryu y el crecimiento en medio gelosa-sangre se deduce que las colonias detectadas en CST-Km⁵⁰ corresponden a una especie de *Bacillus* (Figura 3.9). Es probable que esta especie de bacteria sea endófito de las plantas de nopal usadas en este estudio ya que recientemente De Carvahlo-Costa y Soares de Melo (2012), reportaron la presencia de una gran cantidad de bacterias endófitas en *Opuntia ficus-indica* Mill, entre las que destaca *Bacillus*. Los endófitos son bacterias que colonizan el interior de las plantas y tienen múltiples funciones, entre las que se encuentra suprimir el crecimiento de otra bacterias (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

III.5.3 Observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido

En observaciones al microscopio electrónico de barrido de preparaciones de tejido de cladodios secundarios en planta, inoculado con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰, no se registraron células bacteriales (Figura 3.10). Estos resultados negativos fueron consistentes tanto en lo registrado en las observaciones del tejido donde se inoculó a la bacteria como en el tejido cercano a éste. Existe la posibilidad de que la ausencia de células en el tejido esté relacionada con una pérdida de las mismas por el efecto de “lavado”. Es decir que las células bacterianas hayan sido arrastradas junto con el mucílago de los cladodios cuando se procesaron las muestras de tejido para su

observación. El mucílago de nopal posee fuertes propiedades adherentes, por lo que se utiliza no solo para remover partículas sólidas y algunos metales pesados (Miller *et al.*, 2008) sino también células bacterianas como las de *Bacillus* (Buttice *et al.*, 2010) y coliformes (López, citado por Saénz *et al.*, 2006). Otra posibilidad es que la técnica utilizada en este estudio no fuera la más adecuada para detectar las células de *Salmonella* en tejidos internos de nopal. Por lo anterior se sugiere, para estudios futuros, emplear otras técnicas como la de fluorescencia o la de microscopía confocal, que indiquen sin lugar a dudas si esta bacteria tiene o no la capacidad de internalizarse en tejido de nopal.

Por otra parte, se registró la formación intracelular de diferentes cristales de oxalato de calcio en forma de drusa (CaOx, por sus siglas en inglés) y algunos cristales de potasio en el tejido inoculado y sin inocular (Figura 3.11). La formación de cristales en nopal verdura tiene algunas funciones fisiológicas y de defensa (Contreras Padilla *et al.*, 2011). Al respecto, Franceschi y Nakata (2005), indican que los cristales CaOx tienen diferentes funciones como: regulación de calcio, protección de la planta contra herbívoros, desintoxicación, balance iónico, soporte de tejidos, rigidez de la planta, recolección y refracción de la luz. Mientras que Punja y Jenkins (1984) reportan que estos cristales también pueden producirse como respuesta de defensa en *Beta vulgaris* a la infección por el hongo *Sclerotium rolfsii*. Sin embargo, en este último caso, la presencia de cristales CaOx en los tejidos de cladodios de nopal no se relacionaron con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ debido a que no se encontraron diferencias en el número y la composición química de los cristales registrados en los tejidos inoculados y sin inocular.

III.5.4 Confirmación de Cepas por PCR

Todas las cepas presuntivas de *Salmonella* recuperadas de muestras de suelo (3) y de cladodios madre y secundario (9) en AEH-Km⁵⁰ resultaron positivas en pruebas de PCR con los iniciadores Sal-3 y Sal-4. Los productos de amplificación de las

muestras dieron bandas de 275 pb similares al de la banda obtenida con el serotipo de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ (Figura 3.12).

III.5.5 Valores de pH de Cladodios y Condiciones Ambientales de Invernadero y Laboratorio

El pH promedio registrado en los cladodios madre y secundario en planta fue de 4.7 y 4.4, respectivamente (Cuadro 3.2). Respecto a las condiciones ambientales, en invernadero se registró una temperatura promedio de 16.7°C (con máxima de 34.4°C y mínima de 2.03°C) y HR promedio de 63.0% (con máxima de 94.5% y mínima de 23.5%); y en laboratorio una temperatura promedio de 22.1°C (con máxima de 25.5° y mínima de 15.6°C) y HR promedio de 47.1% (con máxima de 58.7% y mínima de 32.2 %).

III.6 CONCLUSIONES

Salmonella typhimurium (St4-Km⁵⁰) mostró capacidad de persistir en suelo y en planta de nopal bajo condiciones de invernadero y laboratorio. Por un periodo de 14 días en suelo de plantas de nopal en maceta y en cladodios madre en planta aunque con un decremento paulatino pero constante de la población hasta alcanzar niveles de 1 UFC/mL. Mientras que en cladodio secundario en planta, St4-Km⁵⁰ persistió por 9 días aunque la población decreció rápidamente durante las primeras 24 h hasta alcanzar niveles de 1 UFC/mL a partir de los 5 ddi. En contraste en cladodio secundario precortado, St4-Km⁵⁰ se mantuvo viable en el tejido por 14 días después de la infiltración del tejido con una disminución inicial de la población durante los primeros 8 ddi y un incremento paulatino posteriormente de 2 Log a los 14 ddi.

Bajo las condiciones de este estudio, *Salmonella typhimurium* no mostró capacidad para internalizarse en los tejido de nopal; desde el suelo hacia el tejido de la raíz ni del tejido del cladodio madre al cladodio secundario o de éste al terciario.

III. 7 LITERATURA CITADA

- Berger C. N., Sodha S. V., Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., and Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12 (9): 2385-2397.
- Beuchat L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* 4: 413-423.
- Brandl M., and Amudson R. 2008. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8): 2298-2306.
- Buttice A. L., Stroor J. M., Lim D. V., Stroot P. G., and Alcantar N. A. 2010. Removal of sediment and bacteria from water using green chemistry. *Environmental Science and Technology* 44: 3514-3519.
- Chapman P.A., Siddons C.A., Wright J.D., Norman P., Fox J., and Crick E., 1993. Cattle as a possible source of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 contaminations in man. *Epidemiology and Infection* 111 (3): 439-447.
- Contreras-Padilla M., Pérez-Torrero E., Hernández-Urbiola M., Hernández-Quevedo G., del Real A., Rivera-Muñoz E., and Rodríguez-García M. E. 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(1): 38-43.
- Cooley M. B., Chao D., Mandrell R. E. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection* 69 (10): 2329-2335.
- Cooley M. B., Miller W. G., and Mandrell R. E. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 4915-4926.
- De Carvahlo Costa E., and Soares de Melo I. 2012. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *African Journal of Microbiology Research* 6 (6): 1345-1353.

- Deering A. J., Mauer L. J., and Pruitt R. E. 2012. Internalization of *E. coli* and *Salmonella* spp., in plants: a review. *Food Research International* 45: 567-575.
- Franceschi V. R., and Nakata P. A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* 56: 41-71.
- Franz E., Visser A. A., Van Diepeningen A. D., Klerks M. M., Termorhuizen A. J., and Van Bruggen A. H. C. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology* 24: 106-112.
- García R., Bælum J., Fredslund L., Santorum P., and Jacobsen C. S. 2010. Influence of temperature and predation on survival of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium and expression of *invA* in soil and manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15): 5025-5031.
- Gómez-Flores R., Tamez-Guerra P., Rodríguez-Padilla C., Monreal-Cuevas E., Hauad-Marroquin L. A., Cordova-Puente C., and Rangel-Llanas A. 2006. *In Vitro* antibacterial and antifungal activities of *Nopalea cochenillifera* pad extracts. *American Journal of Infectious Diseases* 2 (1): 1-8.
- Griffith M. P., and Porter J. M. 2009. Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *International Journal of Plant Sciences* 170 (1): 107-116.
- González-Gallardo S., Ruiz-Venegas M. R., and Hernández-Baumgarten E. M. 2003. Guía de microscopía electrónica. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).
- Gu G., Hu J., Cevallos-Cevallos J. M., Richardson S. M., Bartz J. A., and van Bruggen A. H. C. 2011. Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in tomato plants. *PLoS One* 6 (11): e27340.doi:10.1371/journal.pone.0027340.
- Guo X., Chen J., Beuchat L. R., and Brackett E. R. 2000. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (12): 5248-5252.
- Guo X., Chen J., Brackett R. E., and Beuchat L. R. 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(10): 4760-4761.

- Hernández A. A. M., Landa S. P., Mora A. G., Eslava C. C. A., Call J. E., Porto-Fett A. C. S., and Luchansky J. B. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. Abstracts of the Annual Meeting of the International Association for Food Protection (P1-37):74-75.
- Hilborn E.D., Mermin J.H., Mshar P.A., Hadler J.L., Voetsch A., and Wojtkunski, C. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine* 159: 1758-1764.
- Himathongkham S., Bahari S., Riemann H., and Cliver D. 1999a. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and manure slurry. *FEMS Microbiology Letters* 178: 251-257.
- Himathongkham S., Nuanualsuwan S., and Riemann H. 1999b. Survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* chicken manure at different levels of water activity. *FEMS Microbiology* 172: 159-163.
- Horby P.W., O'Brien S.J., Adak G.K., Graham C., Hawker J.I., and Hunter P. 2003. A national outbreak of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiology and Infection* 130: 169-178.
- Islam M., Morgan J., Doyle M.P., Phatak S.C., Millner P., and Jiang X. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure compost or irrigation water. *Applied Environmental Microbiology* 70: 2497-2502.
- Itoh Y., Sugita-Konishi Y., Kasuga F., Iwaki M., Hara-Kudo Y., Saito N., Noguchi Y., and Konuma H. 1998. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Applied Environmental Microbiology* 64 (4): 1532-1535.
- Jablasone J., Warriner K., and 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.
- Landa-Salgado P., Hernández-Anguiano A. M., Corrales-García J., Mora-Aguilera G., Chaidez-Quíroz C. 2009. Sobrevivencia de *Salmonella* Typhimurium en melón

- “cantaloupe” durante el almacenamiento refrigerado en atmósferas controladas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (3): 209-215.
- Madigan M. T., Martinko J. M., and Parker J. 2001. *Brock, Biología de los microorganismos*. Prentice Hall. 8va. Edición revisada. 986 p.
- Miller S. M., Fugate E. J., Craver V. O., Smith J. A., and Z. J. 2008. Toward understanding the efficacy and mechanism of *Opuntia* spp., as a natural coagulant for potential application in water treatment. *Environmental Science and Technology* 42: 4274-4279.
- Nicholson R. L., and Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Nobel P. S. 2002. *Cacti, biology and uses*. University of California Press. 280 p.
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Diario Oficial de la Federación.
- Pu S., Beaulieu J. C., Prinyawiwatkul W., and Ge B. 2009. Effects of plant maturity and growth media bacterial and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in growing spinach leaves. *Journal of Food Protection* 72(11): 2313-2320.
- Punja Z. K., and Jenkins S. F. 1984. Light and scanning electron microscopic observations of calcium oxalate crystals produced during growth of *Sclerotium rolfsii* in culture and infected tissue. *Canadian Journal of Botany* 62 (10): 2028-2032.
- Quiroz-Santiago C., Rodas-Suárez O., Vázquez-Q C.R., Fernández F. J., Quiñonez-Ramírez E. I., Vázquez-Salinas C. 2009. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from México. *Journal of Food Protection* 72 (6): 1279-1282.
- Rosenblueth M., and Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with host. *MPMI* 19 (8): 827-837.
- Saénz C., Berger H., Corrales-García J., Galletti L., García del Cortázar V., Higuera I., Mondragón C., Rodríguez-Felix A., Sepúlveda E., y Varnero M. A. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de servicios agrícolas de la FAO*. 169 p.

- Saéñz C., Sepúlveda E., and Matsuhira B. 2004. *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments* 57: 275-290.
- Sivapalasingam S., Barrett E., Kimura A., Van Duyne S., De Witt W., Ying M., Frisch A., Phan Q., Gould E., Shillam P., Reddy V., Cooper T., Hoekstra M., Higgins C., Sanders J. P., Tauxe R. V., and Slutsker L. 2003. Multistate Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfestation technology. *Clinical Infectious Diseases* 37: 1585- 1590.
- Solomon E., Sima Y., and Matthews K. R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1): 397-400.
- Tauxe R. 2002. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 78: 31-41.
- Veling J., Wilpshaar H., Frankena K., Bartel C. and Barkema H. W. 2002. Risk factors for clinical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium infection on Dutch dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 54:157-168
- Wachtel M.R., Whitehand L.C., and Mandrell R.E. 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with pre-harvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection* 65: 18-25.
- Warriner K., Spaniolas S., Dickinson M., Wright C., and Waites W. 2003. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal Applied Microbiology* 95:719–727.
- Zhang G., Beuchat L. R., Erickson M. C., Phelan V. H., and Doyle M. P. 2009. Lack of internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after leaf surface and soil inoculation. *Journal of Food Protection* 72(10): 2028-2037.
- Zibilske L. M., and Weaver R. W. 1978. Effect of environmental factors on survival of *Salmonella* Typhimurium in soil. *Journal of Environmental Quality* 7:593-597.

**IV. RESPUESTA DE DEFENSA EN CLADODIOS DE NOPAL
VERDURA INOCULADOS CON *Salmonella typhimurium***

IV.1 INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco las plantas se consideraban como no hospederas naturales de patógenos de humanos (Tepliski *et al.*, 2011). Sin embargo, especies de los géneros *Klebsiella*, *Serratia* y *Salmonella* así como *Escherichia coli* frecuentemente se han aislado de tejidos de plantas y de su rizosfera (Tyler y Triplett, 2008). Por ejemplo, *Serratia marcescens* se ha aislado de plantas de arroz, donde se le ha encontrado colonizando endofíticamente (Gyaneshwar *et al.*, 2001), así como en calabaza donde provoca síntomas de marchitez y amarillamiento foliar (Bruton, 2003).

Por su parte, el género *Salmonella* se encuentra entre los microorganismos patógenos de humanos que han mostrado capacidad no solo de proliferar en la superficie de los tejidos de plantas (Solomon *et al.*, 2002) sino también de colonizar los tejidos internos de las mismas (Guo *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001). Células de *Salmonella* se detectaron en la pulpa de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) colectados de plantas inoculadas en etapa de floración con los serotipos *S. enterica* serovar Poona, *S. enterica* serovar Michigan, *S. enterica* serovar Enteritidis, *S. enterica* serovar Montevideo y *S. enterica* serovar Hartford, por inyección de tallo y cepillado de flores (Guo *et al.*, 2001). En tanto que células de un mutante bioluminiscente de *S. enterica* serovar Montevideo se observaron en los espacios intercelulares de las células epidermales del hipocotilo de plántulas de frijol mungo (*Vigna radiata*) a las 24 h de iniciada la germinación de semillas contaminadas con la bacteria. Células viables de la bacteria se recuperaron de fluido apoplástico y de extractos de germinados, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio (Warriner *et al.*, 2003). Similarmente, células de *S. enterica* serovar Typhimurium transformadas con el plásmido de la proteína verde fluorescente (pGFP), se aislaron del tejido interno de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* cv. Tamburo) crecidas tanto en un sistema de suelo como en un sistema hidropónico inoculados con la bacteria (Franz *et al.*, 2007). Lo antes mencionado sugiere que, al menos bajo ciertas condiciones, las bacterias patógenas entéricas de humanos pueden tener a las plantas como hospedantes alternos (Holden *et al.*, 2009).

Numerosos estudios señalan que genotipos de plantas responden específicamente a *Salmonella* (Klerks *et al.*, 2007a,b), indicando con esto que las interacciones entre las plantas y los patógenos de humanos no son accidentales sino programadas genéticamente (Holden *et al.*, 2009; Toth *et al.*, 2006). Al respecto, Barak *et al.*, (2005), señalan que *Salmonella enterica* requiere de genes de virulencia para colonizar los tejidos de las plantas. Por su parte, Iniguez *et al.*, (2005), encontraron que *Salmonella typhimurium* tiene capacidad de activar los genes responsables de inducir respuestas de defensa en *Medicago truncata* y *Arabidopsis* sp. Según estos autores la activación del sistema de defensa de ambas plantas se debe esencialmente a la presencia de componentes extracelulares como la flagelina y al sistema de secreción tipo tres (TTSS, por sus siglas en inglés) que posee el género *Salmonella*. Estos componentes son reconocidos por los receptores involucrados en las respuestas de defensa dependiente e independiente de la vía del ácido salicílico (AS). Los mutantes de *Salmonella typhimurium* que no poseen ninguna de estas características, pueden colonizar el tejido interno de las plantas con éxito, sin que se presente una respuesta adversa de la planta (Iniguez *et al.*, 2005).

Aunque *Salmonella* puede activar la respuesta de defensa en ciertas plantas, muchas veces este sistema es superado o suprimido, aparentemente debido a la presencia del gen *invA* en la bacteria, dando como resultado la colonización del tejido (Shirron y Yaron, 2011).

En general, los reportes indican que las plantas infectadas por *Salmonella* son asintomáticas; sin embargo, trabajos recientes señalan el desarrollo de síntomas como marchitez, pérdida de biomasa y amarillamiento, entre otros, asociados con tejidos infectados (Gu *et al.*, 2011; Schikora *et al.*, 2008).

En observaciones preliminares de cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), en planta, infiltrados con *S. enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*) se observaron cambios en la coloración del tejido durante las primeras horas después de la infiltración. Por la rapidez y características de la respuesta del tejido inoculado así como por la delimitación de la lesión al sitio de inoculación se consideró que podría tratarse de una respuesta de defensa en la planta de nopal. Por lo anterior para este trabajo se planteó el objetivo siguiente.

IV.2 OBJETIVO

Determinar si plantas de nopal verdura responden hipersensitivamente a inoculaciones de cladodio con *S. typhimurium* y comparar dicha respuesta entre cladodios en planta y cladodios precortados.

IV.3 HIPOTESIS

Salmonella typhimurium tiene capacidad de inducir una respuesta de defensa en tejidos de cladodios de nopal verdura.

IV.4 METODOLOGÍA

Se utilizaron plantas de nopal (*Opuntia ficus-indica* variedad Milpa Alta) de 9 meses, crecidas en macetas con suelo-vermicomposta (3.5:1.5 Kg), regadas con agua de pozo y mantenidas en invernadero a temperatura ambiente. Así como una cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC23564, resistente a Kanamicina (Sigma-Aldrich®) (50 µg/mL) (*S. typhimurium* St4-Km⁵⁰).

IV.4.1 Inoculación de Cladodios en Planta y de Cladodios Precortados

Un volumen de 300 µL de suspensión de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ con 10⁸ UFC/mL, en Agua Buferada Peptonada (ABP) a 0.1%, se infiltraron a través de la aguja (30Gx13 mm) de una jeringa de 1 mL (BD Ultra-Fine™) en la parte superior del cladodio. En total en planta se inocularon 45 cladodios madre y 45 cladodios secundarios (uno por planta); y precortados, 15 cladodios secundarios, previamente colectados y mantenidos en laboratorio. Como testigos se inocularon: en planta, 5 cladodios madre y 5 cladodios secundarios; y precortados, 5 cladodios con APB a 0.1%. El esquema anterior de inoculación se repitió al menos una vez con el mismo número de cladodios durante el periodo de invierno y otoño de 2010. Después de la

inoculación, tanto los cladodios en plantas como los cladodios precortados se mantuvieron a temperatura ambiente de invernadero y laboratorio, respectivamente.

IV.4.2 Registro de Respuesta de Cladodios

Después de la inoculación con *Salmonella* y APB a 0.1%, durante 14 días cada 24 h se colectaron tres cladodios (uno por planta) y un cladodio precortado, para darle seguimiento a la aparición de síntomas de oscurecimiento en los cladodios madre y cladodios secundarios en planta así como en los cladodios secundarios precortados. Para detectar cambios en la coloración (oscurecimiento) en el tejido interno se realizaron cortes longitudinales en los cladodios.

IV.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.5.1 Respuesta en Cladodios Inoculados con *S. typhimurium*

En observaciones visuales de cortes longitudinales de cladodios madre y cladodios secundarios se registraron lesiones circulares internas de color café en el sitio de infiltración de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰. También se identificaron síntomas de deshidratación del tejido pero solamente en cladodios secundarios en planta y precortados. Estas respuestas no se registraron en el tejido de cladodios madre y cladodios secundarios en planta y precortados donde solo se aplicó APB a 0.1%. El inicio del desarrollo de las lesiones se registró a partir de las 24 h después de la inoculación (ddi) con la aparición de ligero oscurecimiento en el sitio de infiltración de la bacteria, tanto en cladodios madre como en cladodios secundarios, en planta y precortados. Sin embargo, entre los cladodios se registraron diferencias con respecto al desarrollo de las lesiones, intensidad del oscurecimiento y aparición de deshidratación de tejido (Figura 4.1).

A las 48 h ddi la lesión se encontró: en cladodios madre, no definida con oscurecimiento poco evidente; en cladodios secundarios en planta, bien definida con

oscurecimiento intenso; y en cladodios secundarios precortados, poco definida con oscurecimiento tenue.

A las 72 h la lesión se registró: en cladodio madre poco definida con oscurecimiento muy tenue; en los cladodios secundarios en planta, definida con oscurecimiento tenue; y en los cladodios secundarios precortados, bien definida con oscurecimiento intenso.

A las 96 h la lesión se registró en: cladodio madre, poco definida con oscurecimiento tenue; en los cladodios secundarios en planta, definida, con oscurecimiento tenue y con apariencia deshidratada (desezada); y en cladodios secundarios precortados, bien definida con oscurecimiento intenso.

A las 120 h la lesión se registró en: cladodio madre, definida con oscurecimiento tenue; en los cladodios secundarios en planta, definida con oscurecimiento tenue y con apariencia deshidratada; y en cladodios secundarios precortados, bien definida con oscurecimiento intenso.

A las 144 h la lesión se registró en: cladodio madre, definida con oscurecimiento tenue; en los cladodios secundarios en planta, definida con oscurecimiento tenue y con apariencia deshidratada; y en cladodios secundarios precortados, bien definida con oscurecimiento intenso y con apariencia deshidratada.

A las 168 h la lesión se registró en: cladodio madre, poco definida con oscurecimiento tenue; en los cladodios secundarios en planta, definida con oscurecimiento poco evidente y con apariencia deshidratada; y en cladodios secundarios precortados, bien definida con oscurecimiento muy intenso y con apariencia deshidratada. En este último caso, se observó que las lesiones desecadas se desprendían fácilmente del tejido sano (Figura 4.2); en contraste a las del tejido deshidratado de los cladodios secundarios en planta en las cuales no se observó.

La respuesta registrada con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ indica que los cladodios de nopal verdura en planta tienen mecanismos de defensas que se activan ante la presencia de la bacteria, y que de acuerdo a lo reportado podrían incluir cambios en la acumulación y oxidación de compuestos fenólicos así como destrucción de membranas celulares de células en contacto con la bacteria, con posterior desecación del tejido invadido por la bacteria (Whalen, 2005). En este caso en particular, la intensidad de la respuesta, expresada como oscurecimiento intenso y deshidratación de tejido, se

registró rápidamente en los cladodios secundarios en planta, a las 48 y 96 h, respectivamente. Lo anterior podría evitar el establecimiento exitoso de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ en los cladodios secundarios en planta en comparación con la respuesta observada durante las primeras 72 h en los cladodios secundarios precortados y en los cladodios madre en planta. En estos cladodios los niveles de la población bacteriana registrados fueron de 1.42, 3.27 y 4.0 Log de UFC por g, respectivamente, registrados a ese tiempo en el tejido infiltrado con 8 Log de UFC por mL.

La rapidez con la que el tejido responda a la infección por microorganismos es importante para aislar a los microorganismos del acceso a las sustancias nutritivas de la planta, en un punto donde se concentran sustancias con actividad antimicrobiana; como compuestos fenólicos. Al respecto, Gómez-Flores *et al.* (2006), reportaron que algunos compuestos, aparentemente de naturaleza fenólica, extraídos de la planta *Nopalea cochenillifera* presentaron actividad antimicrobiana contra *S. typhimurium*.

Aunque se considera a *Salmonella* como un patógeno de humanos y un contaminante de cladodios de nopal verdura (Hernández *et al.*, 2009), en el presente estudio se demuestra su habilidad para inducir una respuesta de defensa en cladodios secundarios en planta y enfermedad (necrosis) en cladodios secundarios precortados. En el primer caso podría tratarse de una respuesta hipersensitiva por los síntomas característicos de rápido oscurecimiento registrados durante las primeras 48 h ddi y por la deshidratación de tejido observada a las 96 h ddi en los cladodios secundarios en planta.

Lo anterior contrasta con lo reportado por Schikora *et al.*, (2008), quienes encontraron que aunque *S. typhimurium* puede desencadenar la activación del sistema inmune de la planta incluyendo la transcripción de genes relacionados con la patogenicidad (PR, por sus siglas en inglés), la bacteria puede vencer este sistema e invadir, proliferar y dispersarse en el tejido de plantas de *Arabidopsis thaliana*, así como causar algunos síntomas como clorosis y marchitez. Estos autores también indicaron que las respuestas de defensa de *Arabidopsis* se asocian principalmente con mecanismos de señalización vía el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (Et); mecanismos relacionados con la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Durrán y Dong, 2004).

De igual forma Shirron y Yaron (2011), mencionan que *S. typhimurium* indujo en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) una rápida respuesta de tipo hipersensible, la cual se asoció con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Aunque la intensidad de la respuesta hipersensible y la producción de ROS fueron mucho menores cuando se compararon con la respuesta y producción registrada en plantas inoculadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* en tabaco. Estos autores también señalan que la producción de ROS fue mayor cuando las plantas se inocularon con células muertas de la bacteria y que es probable que la supresión de la respuesta de la planta esté asociada con el sistema de transporte tipo tres (TTSS, por sus siglas in ingles), y la actividad del gen *invA* de *S. typhimurium* ya que observaron que plantas de *N. tabacum* registraron necrosis de tejido y producción ROS a los 4 días después de la aplicación del inoculo de células mutantes del gen *invA*.

En nopal la supervivencia *S. typhimurium* se asoció principalmente con el estado fenológico de los cladodios. En los cladodios madre y cladodios secundarios en planta el crecimiento de la bacteria se suprimió rápidamente y pocas o ninguna célula viable se recuperó al final del experimento (14 días); en contraste a lo registrado en los cladodios precortados donde la bacteria pudo sobrevivir y multiplicarse. Saenz *et al.* (2006) señalan que una vez cosechados, los productos hortofrutícolas entran en un rápido proceso de senescencia y que se tornan más susceptibles a la invasión por microorganismos.

Aunque se ha sugerido que las plantas pueden no “reconocer” a los patógenos de humanos como *Salmonella* y *E. coli* como potencialmente peligrosos para ellas y consecuentemente no iniciar respuesta de defensa (Berger *et al.*, 2010), otros trabajos señalan que no solo se puede inducir una respuesta de defensa de la planta sino que estas bacterias tienen capacidad para suprimirla (Iniguez *et al.*, 2005; Schikora *et al.*, 2008; Shirron y Yaron, 2011), por lo que estas interacciones son muy complejas y es necesario estudiarlas con más detalle.

La información generada en el presente estudio es importante, ya que la interacción entre los patógenos de humanos y las plantas es un fenómeno que aún no

se conoce del todo bien. Representa una contribución en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la infección de las plantas por patógenos de humanos.

IV. 6 CONCLUSIONES

La infiltración de cladodios de nopal verdura con *Salmonella typhimurium* St4-Km⁵⁰ indujo una respuesta de defensa la cual se caracterizó por el oscurecimiento del tejido inoculado. La rapidez e intensidad de esta respuesta de defensa se relacionó con la madurez del cladodio (cladodio madre versus cladodio secundario) así como con su condición fisiológica (cladodio en planta versus cladodio precortado). Estudios futuros sobre las defensas bioquímicas y estructurales involucradas en esta respuesta de defensa son requeridos para seleccionar variedades resistentes de nopal verdura como estrategia para reducir la contaminación por *Salmonella*.

IV.7 LITERATURA CITADA

- Barak J. B., Gorski L., Naraghi-Arani P., and Charkowski A. O. 2005. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10): 5685-5691.
- Berger C. N., Sodha S. V., Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., and Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12 (9): 2385-2397.
- Bruton, B. D. 2003. *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bug-transmitted bacterium: causal agent of cucurbit yellow vine disease. *Plant Diseases* 87: 937-944.
- Durrán W. E. and Dong X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.
- Franz E., Visser A. A., Van Diepeningen A. D., Klerks M. M., Termorhuizen A. J. and Van Bruggen A. H. C. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-

- expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Food Microbiology 24: 106-112.
- Gómez-Flores R., Tamez-Guerra P., Rodríguez-Padilla C., Monreal-Cuevas E., Hauad-Marroquin L. A., Cordova-Puente C. and Rangel-Llanas A. 2006. *In Vitro* antibacterial and antifungal activities of *Nopalea cochenillifera* pad extracts. American Journal of Infectious Diseases 2 (1): 1-8.
- Gu G., Hu J., Cevallos-Cevallos J. M., Richardson S. M., Bartz J. A., and van Bruggen A. H. C. 2011. Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in tomato plants. PLoS One 6 (11): e27340.doi:10.1371/journal.pone.0027340.
- Guo X., Chen J., Beuchat, L. R. and Brackett E. R. 2000. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. Applied and Environmental Microbiology 66 (12): 5248-5252.
- Guo X., Chen J., Brackett R. E. and Beuchat L. R. 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(10): 4760-4761.
- Gyaneshwar P., James E. K., Mathan N., Reddy R. M., Reinhold-Hurek B. and Ladha J. K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology 183 (8): 2634-2645.
- Hernández A. A. M., Landa S. P., Mora A. G., Eslava C. C. A., Call J. E., Porto-Fett A. C. S. and Luchansky J. B. 2009. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. Abstracts of the Annual Meeting of the International Association for Food Protection (P1-37):74-75.
- Holden N., Pritchard L. and Toth I. 2009. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. FEMS Microbial Review 33: 689-703.
- Iniguez A. L., Dong Y., Carter H.D., Ahmer B. M. M., Stone J. M. and Tripplet E. W. 2005. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plants defenses. Molecular Plant-Microbe Interaction 18 (2): 169-178.

- Klerks M. M., Franz E., van Gent-Pelzer M., Zijlstra C. and van Bruggen A. H. C. 2007a. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *The Isme Journal* 1: 620-631.
- Klerks M. M., van Gent-Pelzer., Franz E., Zijlstra X. and van Bruggen A. H. C. 2007b. Physiological and molecular response of *Lactuca sativa* to colonization by *Salmonella enterica* serovar Dublin. *Applied of Enviromental Microbiology* 73: 4905-4914.
- Saéñz C., Berger H., Corrales-García J., Galletti L., García del Cortázar V., Higuera I., Mondragón C., Rodríguez-Felix A., Sepúlveda E., y Varnero M. A. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de servicios agrícolas de la FAO*. 169 p.
- Schikora A., Carreri A., Charpentier E. and Hirt H. 2008. The dark side of the salad: *Salmonella* Typhimurium overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS One* 3 (5): e2279.doi:10.1371/journal.pone.0002279.
- Shirron B. and Yaron S. 2011. Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. *PLoS One* 6 (4): e18855.doi:10.1371/journal.pone.0018855.
- Solomon E., Sima Y. and Matthews K. R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1): 397-400.
- Teplitski M., Warriner K., Bartz J. and Schneider K. R. 2011. Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends in Microbiology* 19 (3): 121-127.
- Toth I.K., Leighton P., and Birch P. R. J. 2006. Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology* 44: 305-336.
- Tyler H. L., and Triplett E. W., 2008. Plants as habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 46:53–73.

- Warriner K., Spaniolas S., Dickinson M., Wright C. and Waites W. 2003. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal Applied Microbiology* 95:719–727.
- Whalen M. C. 2005. Host defense in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* 6: 347-360.

CONCLUSIONES GENERALES

1. De 162 muestras de jugos elaborados a base de nopal, obtenidas mensualmente de expendios comerciales, durante julio de 2009 a junio de 2010, y procesadas de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994, el 84% registraron coliformes totales y *Escherichia coli*. Aunque se aislaron colonias sospechosas de *Salmonella* éstas se confirmaron como *Proteus sp.*, y *Citrobacter sp.* Por lo anterior estos jugos se ubicaron en la categoría de jugos con calidad microbiológica deficiente.

2. En invernadero con temperatura promedio de 16.7 °C y HR promedio de 63.0 %, la cepa *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰, resistente a Kanamicina (50 µg/µL) mostró incapacidad de internalización en plantas de nopal aunque persistió en suelo y cladodios por varios días después de la inoculación (ddi); en suelo, por 14 ddi; en cladodio madre en planta, por 14 ddi; en cladodio secundario en planta, por 9 ddi; y en cladodio secundario precortado, por 14 ddi.

2.1 *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ mostró capacidad para incrementarse pero solo en cladodio secundario precortado a partir de los 8 ddi.

3.0 *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ expresó capacidad para inducir una respuesta de defensa en cladodios de nopal verdura. Esta respuesta se relacionó con la madurez del cladodio (cladodio madre versus cladodio secundario) así como con su condición fisiológica (cladodio en planta versus cladodio precortado).

3.1 En cladodios madre y cladodios secundarios en planta y en cladodios secundarios precortados, *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ indujo lesiones circulares caféas. El inicio del desarrollo de estas lesiones se registró a las 24 h después de la inoculación con la aparición de ligero oscurecimiento en el sitio de infiltración. Sin embargo, entre los cladodios se registraron diferencias en el desarrollo de las lesiones, intensidad del oscurecimiento y aparición de deshidratación de tejido.

3.2 Solamente en cladodios secundarios en planta y en cladodios secundarios precortados *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ indujo síntomas de deshidratación de tejido.

GENERAL CONCLUSIONS

1. Out of 162 samples of juices made from nopal, obtained monthly from commercial retailers, from July 2009 to June 2010, and processed according to the NOM-113-SSA1-1994 and the NOM-114-SSA1-1994, 84% of them registered total coliforms and *Escherichia coli*. Although colonies suspect of being *Salmonella* were isolated, they turned out to be *Proteus* sp. and *Citrobacter* sp. Because of this, these juices are placed in the category of juices with deficient microbiological quality.

2. Under greenhouse conditions, a mean temperature of 16.7 °C and RH of 63.0%, the *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ strain, resistant to Kanamicine (50 µg/µL) proved incapable of internalizing nopal plants, although it did persist in the soil and cladodes for several days after inoculation (ddi); in the soil for 14 ddi; in the mother cladode on the plant for 14 ddi; in secondary cladodes on the plant for 9 ddi; and in pre-cut secondary cladodes for 14 ddi.

2.1 *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ showed a capability to increase, but only so in pre-cut secondary cladodes 8 ddi.

3.0 *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ showed a capability to induce a defense response in nopal cladodes. This response was related with the maturity of the cladode (mother cladode vs. secondary cladode) as well as its physiological condition (cladode on the plant vs. pre-cut cladode).

3.1 *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ induced brown circular lesions in mother cladodes and secondary cladodes both on the plant and pre-cut. The beginning of the development of these lesions was registered 24 h after inoculation with the appearance of slight darkening at the place of infiltration. However, there are differences registered among cladodes with regard to lesion development, intensity of the darkening, and appearance of tissue dehydration.

3.2 Only in secondary cladodes on the plant and pre-cut secondary cladodes did *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ induce tissue dehydration symptoms.

CUADROS

Cuadro 2.1 Características de jugos a base de nopal analizados mensualmente de julio de 2009 a junio de 2010.

Expendio	Composición	Recomendado para	Código asignado	pH
A	Nopal, agua	-	JNA	5.12
	Nopal, apio, naranja, limón, piña, y verdolaga	Colesterol	7	4.4
	Nopal, avena, naranja y manzana	Colesterol	8	4.5
	Nopal, brócoli, col, espárragos y toronja	Glucosa	11	4.4
	Nopal, sábila, toronja y xoconostle	Diabetes	12	4.3
	Nopal, ajo, limón, perejil y piña	Reumas	19	4.6
	Nopal, apio, betabel y piña	Adelgazar	38	4.5
	Nopal, apio, limón, perejil y zanahoria	Limpiar estomago	41	5.3
	Nopal, chayote, naranja, pepino y piña	Riñones	47	4.4
	Nopal, agua natural, sábila y xoconostle	Matriz y quistes	59	4.6
	Nopal, apio, perejil y piña,	Dieta	62	4.5
	Nopal, ciruela pasa, linaza, papaya y naranja	Estreñimiento	67	4.7
A´	Nopal, apio, miel, naranja y piña	Dieta	Die	5.3
	Nopal, avena, manzana, miel y naranja	Colesterol 1	Col-1	4.5
	Nopal, alfalfa, limón, miel, naranja y piña	Colesterol 2	Col-2	4.9
	Nopal, agua, sábila y xoconostle	Diabetes	Dia	4.1
	Nopal, aceite de oliva, betabel, linaza, papaya, miel, y naranja	Laxante	Lax	4.8
	Nopal, sábila, toronja y xoconostle	Quistes	Q	4.6
	Nopal, ciruela pasa, linaza, miel, papaya y naranja	Estreñimiento	E	3.9
B	Nopal, agua	-	JNB	5.12
	Nopal, apio, naranja, perejil y piña	Dieta	JB	4.7

Donde A corresponde a expendio A; A´ a expendio A pero con diferente administración a partir de primavera 2010; y B a expendio B.

Cuadro 2.2 Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el verano de 2009.

Código de Muestra	Valores de pH ¹			Media
	Julio	Agosto	Septiembre	
JNA	5.43	5.10	5.12	5.22
7	4.80	4.41	4.37	4.53
8	5.03	4.59	4.33	4.65
11	4.60	4.51	4.58	4.56
12	4.40	4.47	4.35	4.41
19	4.30	4.48	4.30	4.36
38	4.90	4.67	4.54	4.70
41	5.00	5.47	6.23	5.56
47	4.80	4.55	4.58	4.64
59	4.60	4.91	4.72	4.74
62	4.90	4.56	-	4.73
67	5.43	4.82	4.85	5.03
JB	5.39	5.26	6.60	5.75
JNB	5.89	5.16	4.44	5.15

- Dato no estimado.

Cuadro 2.3 Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y *E. coli* registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el verano de 2009.

Código de Muestra	Coliformes totales				<i>E. coli</i>			
	Log ₁₀			Media	Log ₁₀			Media
	Julio	Agosto	Septiembre		Julio	Agosto	Septiembre	
JNA	4.08	4.71	4.82	4.54	-	2.00	3.44	2.72
7	5.58	5.22	3.79	4.68	4.00	3.60	2.48	3.36
8	5.83	4.61	3.85	4.66	3.78	2.48	2.70	2.98
11	4.34	4.53	4.54	4.47	3.70	2.30	3.41	3.14
12	3.30	6.05	3.53	4.29	-	5.00	2.60	3.80
19	-	3.30	3.11	3.21	-	-	-	-
38	5.89	4.58	4.51	4.99	4.48	3.15	3.08	3.57
41	6.15	-	6.89	6.52	5.18	-	5.04	5.11
47	5.71	4.16	4.71	4.86	4.70	3.08	2.48	3.49
59	3.70	4.26	4.40	4.12	3.00	2.60	2.60	2.73
62	-	6.01	-	6.01	-	4.95	-	4.95
67	5.37	4.59	3.41	4.46	4.78	3.08	2.60	3.48
JB	3.48	5.15	5.23	4.62	3.00	3.70	4.40	3.70
JNB	4.34	3.82	3.54	3.9	3.70	2.48	2.00	2.73

- Dato fuera de rango.

Cuadro 2.4 Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el otoño de 2009.

Código de Muestra	Valores de pH ¹			Media
	Octubre	Noviembre	Diciembre	
JNA	5.20	4.89	4.51	4.87
7	4.60	4.26	5.23	4.70
8	4.60	4.78	4.49	4.62
11	4.30	4.38	4.26	4.31
12	4.30	4.28	4.68	4.41
19	4.60	4.37	4.54	4.50
38	4.60	4.55	4.54	4.56
41	5.26	5.24	4.77	5.09
47	4.60	4.57	4.41	4.53
59	4.47	4.65	5.04	4.72
62	4.64	4.52	4.63	4.60
67	4.78	4.67	4.87	4.77
99	4.66	5.03	4.31	4.67
JB	5.37	4.88	5.71	5.32
JNB	4.44	4.40	4.51	4.45

Cuadro 2.5 Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y *E. coli* registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el otoño de 2009.

Código de Muestra	Coliformes totales				<i>E. coli</i>			
	Log ₁₀			Media	Log ₁₀			Media
Octubre	Noviembre	Diciembre	Octubre		Noviembre	Diciembre		
JNA	3.30	4.65	4.08	4.01	2.00	2.48	2.30	2.26
7	3.72	5.85	5.27	4.95	2.48	4.48	3.95	3.64
8	3.72	5.30	4.89	4.64	2.48	4.48	3.18	3.38
11	4.52	4.56	4.59	4.56	3.40	3.00	3.48	3.29
12	4.76	4.30	4.11	4.39	3.69	-	3.60	3.65
19	3.92	3.20	2.00	3.04	2.30	-	-	2.30
38	3.68	5.42	5.62	4.91	-	3.70	4.30	4.00
41	4.27	-	5.10	4.69	4.30	-	5.15	4.73
47	4.40	5.60	5.24	5.08	3.28	4.48	4.04	3.93
59	4.20	4.65	6.06	4.97	2.48	3.60	5.11	3.73
62	4.27	5.44	6.31	5.34	2.60	4.04	5.08	3.91
67	3.69	5.43	3.93	4.35	2.00	4.18	2.85	3.01
99	3.76	5.78	4.47	4.67	2.30	4.60	3.60	3.50
JB	2.85	3.20	4.41	3.49	-	2.30	3.60	2.95
JNB	4.49	3.79	4.89	4.39	3.41	2.70	3.70	3.27

- Dato fuera de rango.

Cuadro 2.6 Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el invierno de 2009-2010.

Código de Muestra	Valores de pH ¹			Media
	Enero	Febrero	Marzo	
JNA	4.81	5.03	4.21	4.68
7	4.72	4.50	3.57	4.26
8	4.64	4.64	3.78	4.35
11	4.97	4.67	3.72	4.45
12	4.21	4.53	3.66	4.13
19	4.40	4.61	3.65	4.22
38	4.48	4.65	3.78	4.30
41	5.38	5.03	3.78	4.73
47	4.27	4.60	3.77	4.21
59	4.58	4.59	4.18	4.45
62	4.45	4.62	3.78	4.28
67	4.63	5.02	3.81	4.49
99	4.83	5.04	4.34	4.74
JB	5.03	5.34	4.57	4.98
JNB	4.53	4.52	3.78	4.28

Cuadro 2.7 Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y *E. coli* registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante el invierno 2009-2010.

Código de Muestra	Coliformes totales				<i>E. coli</i>			
	Log ₁₀			Media	Log ₁₀			Media
	Enero	Febrero	Marzo		Enero	Febrero	Marzo	
JNA	4.09	4.09	3.15	3.78	2.90	3.43	3.15	4.16
7	5.61	4.43	3.61	4.55	4.00	3.49	3.55	3.68
8	3.69	4.44	3.62	3.92	2.48	2.95	3.23	2.89
11	2.48	4.30	3.77	3.52	-	3.38	3.49	3.44
12	4.20	4.23	3.65	4.03	2.48	3.11	3.34	2.98
19	3.74	4.48	2.74	4.65	2.00	2.30	2.00	2.10
38	5.03	5.12	3.98	4.71	4.15	3.85	3.92	3.97
41	5.43	5.49	6.01	5.64	4.08	4.30	5.30	4.56
47	3.64	4.62	4.00	4.09	2.30	3.60	3.08	2.99
59	5.09	4.19	2.95	4.08	3.90	2.90	2.00	2.93
62	4.32	4.99	4.27	4.53	2.70	3.60	3.61	3.30
67	3.81	4.31	4.01	4.04	2.70	3.36	3.45	3.17
99	4.18	5.45	5.13	4.92	3.18	3.30	3.26	3.25
JB	2.90	2.60	3.85	3.12	2.00	-	3.60	2.80
JNB	4.38	4.06	4.47	4.30	3.20	3.18	2.70	3.03

- Dato fuera de rango.

Cuadro 2.8 Valores de pH registrados en muestras de jugos preparados a base de nopal durante la primavera 2010.

Código de Muestra	Valores de pH ¹			Media
	Abril	Mayo	Junio	
JNA	4.22	5.47	5.09	4.93
Die	4.07	4.68	3.82	4.19
Col-1	4.66	4.80	4.27	4.58
Col-2	4.31	4.59	3.95	4.28
Dia	4.09	4.88	4.10	4.36
Lax	4.49	6.27	4.37	5.04
Q	3.97	5.41	4.51	4.63
E	4.67	5.64	4.15	4.82
JB	4.91	5.81	5.02	5.25
JNB	4.37	5.65	4.64	4.89

Cuadro 2.9 Unidades formadoras de colonias de coliformes totales y *E. coli* registradas en muestras de jugos preparados a base de nopal durante la primavera de 2010.

Código de Muestra	Coliformes totales				<i>E. coli</i>			
	Log ₁₀			Media	Log ₁₀			Media
Abril	Mayo	Junio	Abril		Mayo	Junio		
JNA	4.27	4.66	5.40	4.78	2.00	2.30	4.23	2.84
Die	5.32	5.43	5.28	5.34	0	0	3.78	1.26
Col-1	4.74	4.57	4.41	4.57	0	0	3.48	1.16
Col-2	5.15	5.29	4.39	4.94	0	0	2.78	0.93
Dia	4.53	3.41	4.36	4.10	0	0	3.00	1.00
Lax	5.41	4.45	4.42	4.76	0	0	2.60	0.87
Q	4.62	4.32	5.05	4.66	0	0	4.02	1.34
E	3.90	3.89	3.76	3.85	0	0	2.90	0.97
JB	3.33	3.89	3.69	3.64	2.00	2.00	2.30	2.10
JNB	4.95	5.78	4.90	5.21	3.30	3.30	3.60	3.40

- Dato fuera de rango.

Cuadro 2.10 Resultados de pruebas bioquímicas de cepas aisladas de jugos a base de nopal.

No. De cepa	Medio de cultivo												
	R	VP	C	M IO			LIA		U	Fermentación de azúcares			H ₂ S
				M	I	O	Descarboxilación	Desaminación		G	L	S	
1	+	-	+	NA ¹	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
2	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
3	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
4	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
5	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
6	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
7	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
8	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
9	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
10	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
11	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
12	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
13	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
14	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
15	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
16	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
17	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
18	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
19	+	-	+	NA	-	+	-	+	+	+	-	NA	+
20	+	-	+	NA	-	+	-	+	+	+	-	NA	+
21	+	-	+	NA	-	+	-	+	+	+	-	NA	+

Continuación

22	+	-	+	NA	-	+	-	+	+	+	-	NA	+
23	+	-	+	NA	-	+	-	+	+	+	-	NA	+
24	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
25	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
26	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
27	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
28	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
29	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
30	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
31	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
32	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
33	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
34	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
35	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
36	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
37	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
38	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
39	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
40	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
41	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
42	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
43	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
44	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
45	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
46	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+

Continuación

47	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
48	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
49	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
50	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
51	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
52	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
53	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
54	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
55	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
56	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
57	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
58	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
59	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	++
60	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
61	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
62	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
63	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
64	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
65	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
66	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
67	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
68	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
69	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
70	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
71	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+

Continuación

72	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
73	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
74	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
75	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
76	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
77	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
78	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
79	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
80	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
81	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
82	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
83	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
84	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
85	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
86	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
87	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
88	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
89	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
90	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+
91	+	-	+	NA	-	+	-	-	-	+	-	NA	+

Donde las abreviaciones de las reacciones corresponde a las siguientes pruebas: R : prueba rojo de metilo; VP = prueba de Vogues-Proskauer; C : Citrato de Simmons, M : movilidad; I : Indol; O : Ornitina; Descarboxilación de lisina o Desaminación de lisina; U : producción de ureasa; G : utilización de glucosa; L : utilización de lactosa; y S : utilización de sucrosa.

¹NA indica que la reacción no se aprecia por interferencia de color.

Cuadro 2.11 Resultados de las pruebas bioquímicas para *Salmonella*.

Prueba	Reacción positiva o negativa
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	+
Lactosa	-
Sacarosa	-
Sulfuro de hidrógeno	+
Descarboxilación de lisina	+
Indol	-
Movilidad	+
Utilización de urea	-
Ornitina descarboxilasa	+
Reacción de Voges-Proskauer	-

Tabla tomada de Terragno *et al.*, 2003.

Cuadro 2.12 Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subesp. *enterica* (I) *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii*.

Prueba bioquímica	<i>Salmonella enterica enterica</i>	<i>Citrobacter suesp. freundii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
H ₂ S	+	+	+
Urea (hidrólisis)	-	d	+
Fenilalanina deaminasa	-	-	+
Lisina descarboxilasa	+	d	-
Ornitina descarboxilasa	+	d	+
Lactosa	-	d	-

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos; d: diferentes reacciones. Tabla tomada de Terragno *et al.*, 2003.

Cuadro 3.1 Persistencia de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ en suelo y cladodios.

Días después de la inoculación ¹	Población bacteriana (Log de UFC por g) ^{2,3}			
	Suelo con planta de nopal	Cladodio madre en planta	Cladodio secundario en planta	Cladodio secundario precortado
1	4.72a	5.62a	2.31ab	3.55a
2	4.28ab	4.02b	3.00a	3.10abc
3	3.73bc	4.00b	1.42cde	3.27b
4	2.80cde	3.32bc	2.20abc	2.56bcd
5	2.73cde	3.73bc	2.10bcd	2.02cd
6	2.22def	4.01b	0.64efg	2.00cd
7	2.02efg	1.96e	1.08def	2.27bcd
8	2.09efg	2.77de	0.70efg	1.75d
9	2.02efg	3.14cd	0.11h	1.81cd
10	1.87fgh	0.33g	0.00h	2.12cd
11	1.59 ghi	0.00g	0.00h	2.46bcd
12	1.08 hij	0.00g	0.00h	2.42bcd
13	0.52jk	1.10f	0.00h	3.74a
14	0.48jk	0.33g	0.00h	3.72a
15	0.00l	ND	ND	ND

¹ Inoculo inicial de 6 y 8 Log UFC/mL, para suelo y cladodios, respectivamente, en APB a 0.1%. ² Los valores indican el promedio de al menos dos ensayos.

³ Medias con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey 0.05). ND Indica que a ese tiempo no se realizó ningún análisis de detección.

Cuadro 3.2 Datos de pH de cladodios secundarios y cladodio madre de nopal registrados “*in vivo*”.

Hora de lectura	Cladodio Madre	Cladodio secundario
08:30	4.95	4.30
09:30	4.60	4.26
10:30	4.65	4.20
11:30	4.77	4.19
12:30	4.77	4.38
13:30	4.65	4.30
14:30	4.53	4.27
15:30	4.80	4.34
16:30	4.82	4.35
Promedio	4.73	4.29

FIGURAS



Figura 2.1 Procedimiento para la recuperación y detección de células sospechosas de *Salmonella* y *E. coli* de muestras de jugo a base de nopal compradas en Texcoco, Estado de México. **A)** Pesado de muestra (10 g) de jugo para pre-enriquecimiento no selectivo de *Salmonella*. **B)** Mezclado de muestra de jugo con CST para pre-enriquecimiento no selectivo de *Salmonella*. **C)** Frascos con muestras pre-enriquecidas en Caldo Soya Tripticaseína (CST) incubadas por 24 h a 37°C. **D)** Tubos de ensaye con Caldo Base Tetrionato (CBT) como caldo de enriquecimiento selectivo incubadas por 18 h a 37°C.

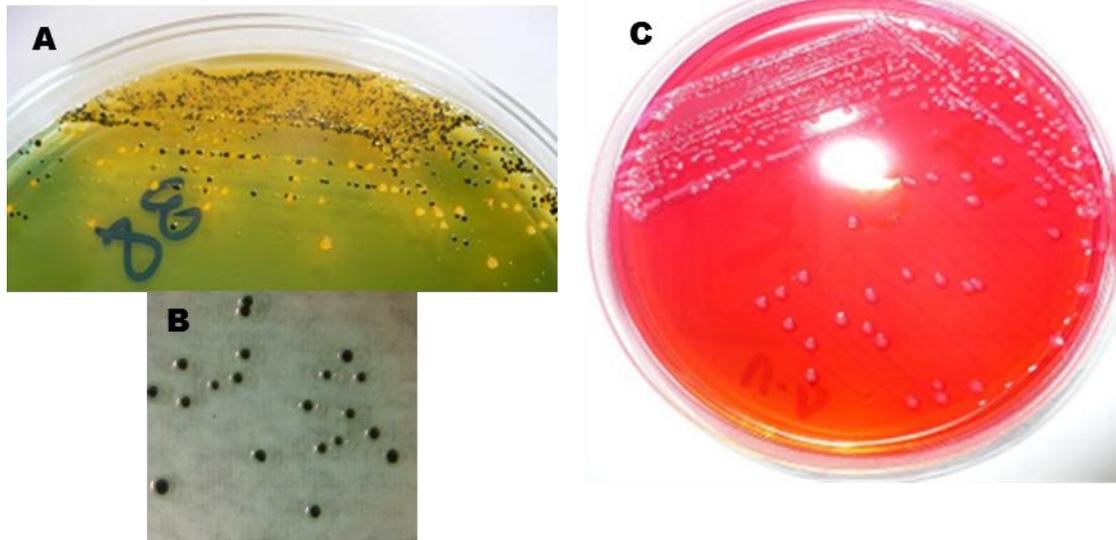


Figura 2.2 Crecimiento de cepas bacterianas en agares selectivos para detección de cepas sospechosas de *Salmonella* incubadas a 37°C por 24 h: **A** y **B** Agar Entérico Hektoen (AEH). En **A** se observan colonias negras sospechosas de *Salmonella*; y en **B** colonias de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ con centro negro y halo claro. **C**) Agar Verde Brillante (AVB), donde las colonias sospechosas de *Salmonella* se encontraron blancas en el medio.



Figura 2.3 Recuperación y conteo de cepas de coliformes totales y *E. coli* en muestras de jugo a base de nopal. **A)** Se pesaron 25 g de muestra de cada jugo para tomar la muestra. **B)** La muestra se mezcló con 225 mL de Agua Buferada Peptonada (ABP) a 0.1%, en frascos previamente esterilizados. **C)** Siembra directa de la muestra de jugo en cajas Petri con Agar MacConkey (AM) para detectar coliformes totales. **D)** Crecimiento bacteriano en AM, después de la incubación por 24 h a 37°C

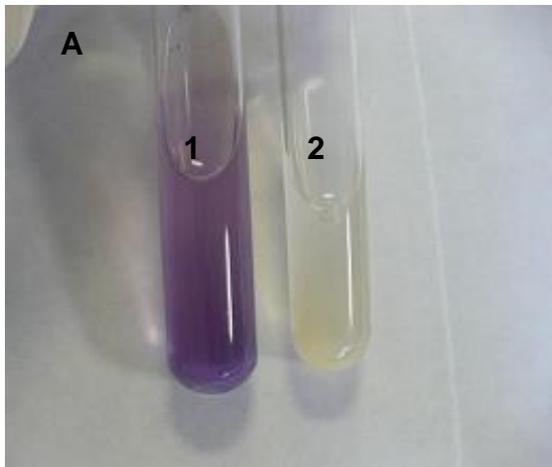


Figura 2.4 Tubos con Caldo VP-MR (**A**) y con Agar Citrato de Simmons (ACS, **B**), para observar las reacciones bioquímicas de Vogues-Proskauer y producción de citrato. **A**) Tubos con VP-RM inoculados con cepa de St4-Km⁵⁰, donde al tubo 1 se le adicionó reactivo de Leifson (reacción negativa). **Nota:** La prueba positiva se caracteriza por un vire de color blanco a color ladrillo. El tubo 2, se observa el caldo con crecimiento bacteriano sin la adición del reactivo. **B**) Tubo 1, con crecimiento de *E. coli* que permanece de color verde (negativo); y tubo 2, con crecimiento de St4-Km⁵⁰ de color azul (positivo).

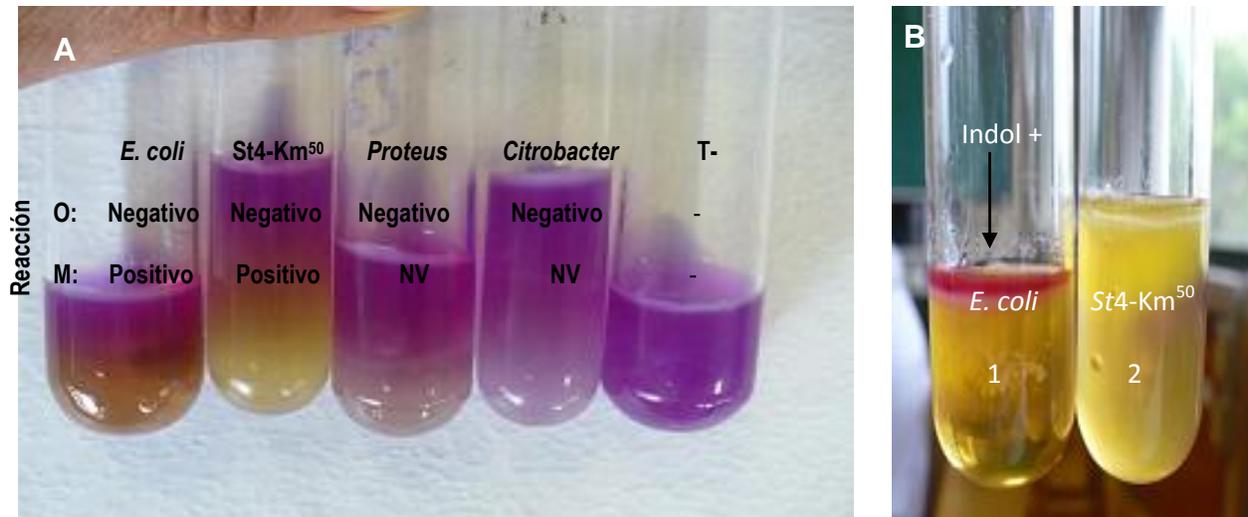


Figura 2.5 Prueba de Agar Movilidad, Indol y Ornitina (MIO). **A)** Medio inoculado con diferentes géneros de bacterias y sin inocular (T-). Donde la presencia de Ornitina (O) se evaluó de acuerdo al cambio de color del medio. El color amarillo indica la ausencia de Ornitina y falta de este color indica una prueba positiva. La movilidad (M) se aprecia por una difusión del crecimiento bacteriano a partir del punto de inoculación, No visible (NV) indica que la difusión no se observa por el cambio en la coloración del medio. **B)** La producción de indol (reacción positiva, tubo 1) se aprecia por la formación de un anillo rojo sobre la superficie del medio después de agregar el reactivo de Erlich, en contraste a la reacción negativa (tubo 2).

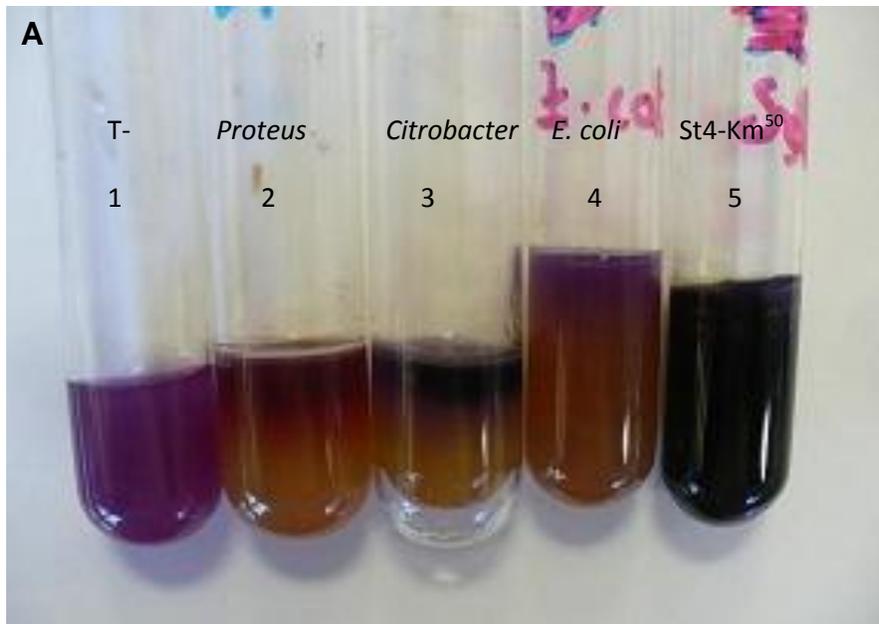


Figura 2.6 Prueba de descarboxilación o desaminación de la lisina. Tubo 1, medio sin inocular (T-), sin cambio de color. Tubo 2, medio inoculado con *Proteus*, con cambio de color de púrpura a amarillo con superficie roja por la desaminación de la lisina. Tubo 3, medio con superficie negra y fondo amarillo por la producción de ácido sulfhídrico y de gas, respectivamente. Tubo 4, medio inoculado con *E. coli* (control negativo) con cambio a amarillo en el fondo. Tubo 5, inoculado con *S. typhimurium* (St4-Km⁵⁰) (control positivo) con cambio a color negro en todo el medio por la descarboxilación de la lisina y producción de ácido sulfhídrico.



Figura 2.7 Caldo Urea (CU) para determinar la producción de ureasa. Tubo 1, medio inoculado con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ de color amarillo-naranja (reacción negativa); y Tubo 2, medio inoculado con *Proteus* con cambio a color rosa (cereza) (reacción positiva).



Figura 2.8 Prueba Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI) para evaluar la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa así como la producción de ácido sulfhídrico (H_2S). Tubo 1, medio sin inocular. Tubo 2, medio inoculado con *E. coli*, con cambio de color en la superficie, de naranja a amarillo, por la fermentación de la lactosa/sacarosa (reacción positiva;). Tubo 3, medio inoculado con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰, con cambio de color a negro por la producción de H_2S y gas en el fondo.

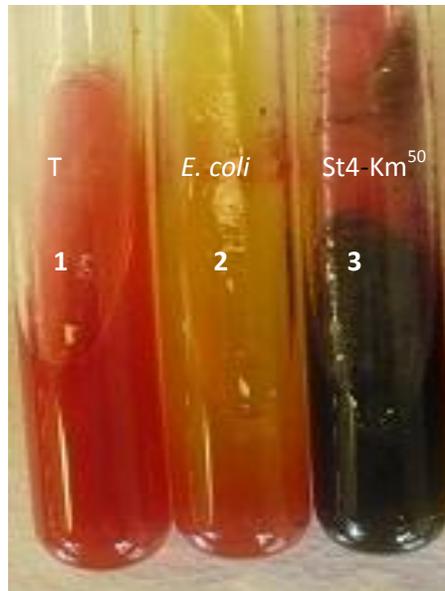


Figura 2.9 Prueba de Agar Hierro de Kligler (AHK), para determinar la fermentación de lactosa y glucosa. Tubo 1, medio sin inocular (T-). Tubo 2, medio inoculado con *E. coli* con cambio de color, de naranja a amarillo por la fermentación de la lactosa. Tubo 3, medio inoculado con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ con cambio de color, de naranja a negro, por la producción de H₂S.

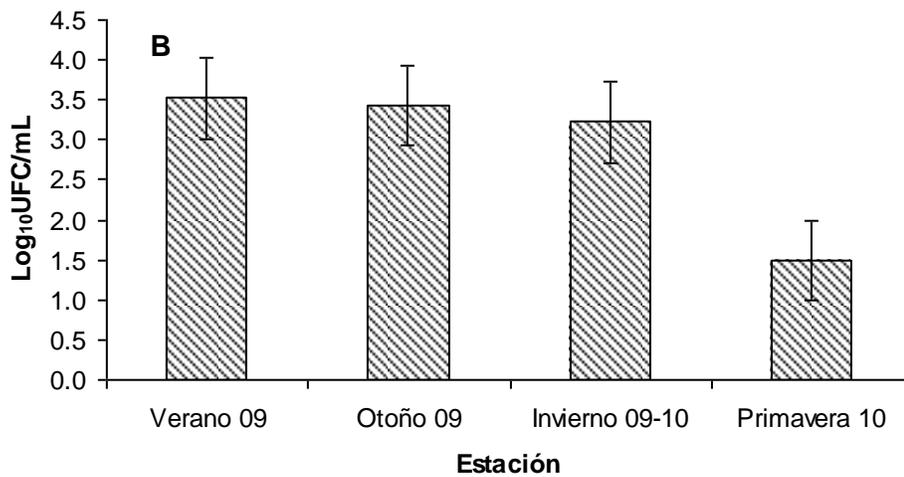
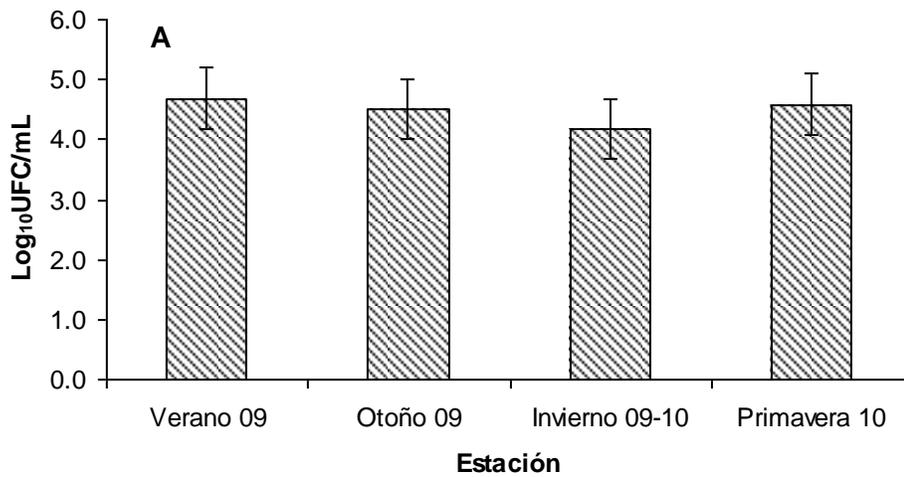


Figura 2.10 Cuenta promedio de coliformes totales (A) y *E. coli* (B) registrada en muestras de jugo fresco sin pasteurizar preparado a base de nopal, durante julio de 2009 a junio de 2010, colectadas en dos expendios comerciales en Texcoco, Estado de México. Las líneas verticales dentro de cada barra representan el error estándar entre los valores.



Figura 3.1 Establecimiento de plantas de nopal en invernadero. **A)** Preparación de mezcla de suelo franco-arenoso con vermicomposta en proporción 3.5-1.5 kg. **B)** Los cladodios se sembraron y distribuyeron en macetas de plástico con la mezcla suelo:vermicomposta establecidas en un invernadero con cubiertas plástica.

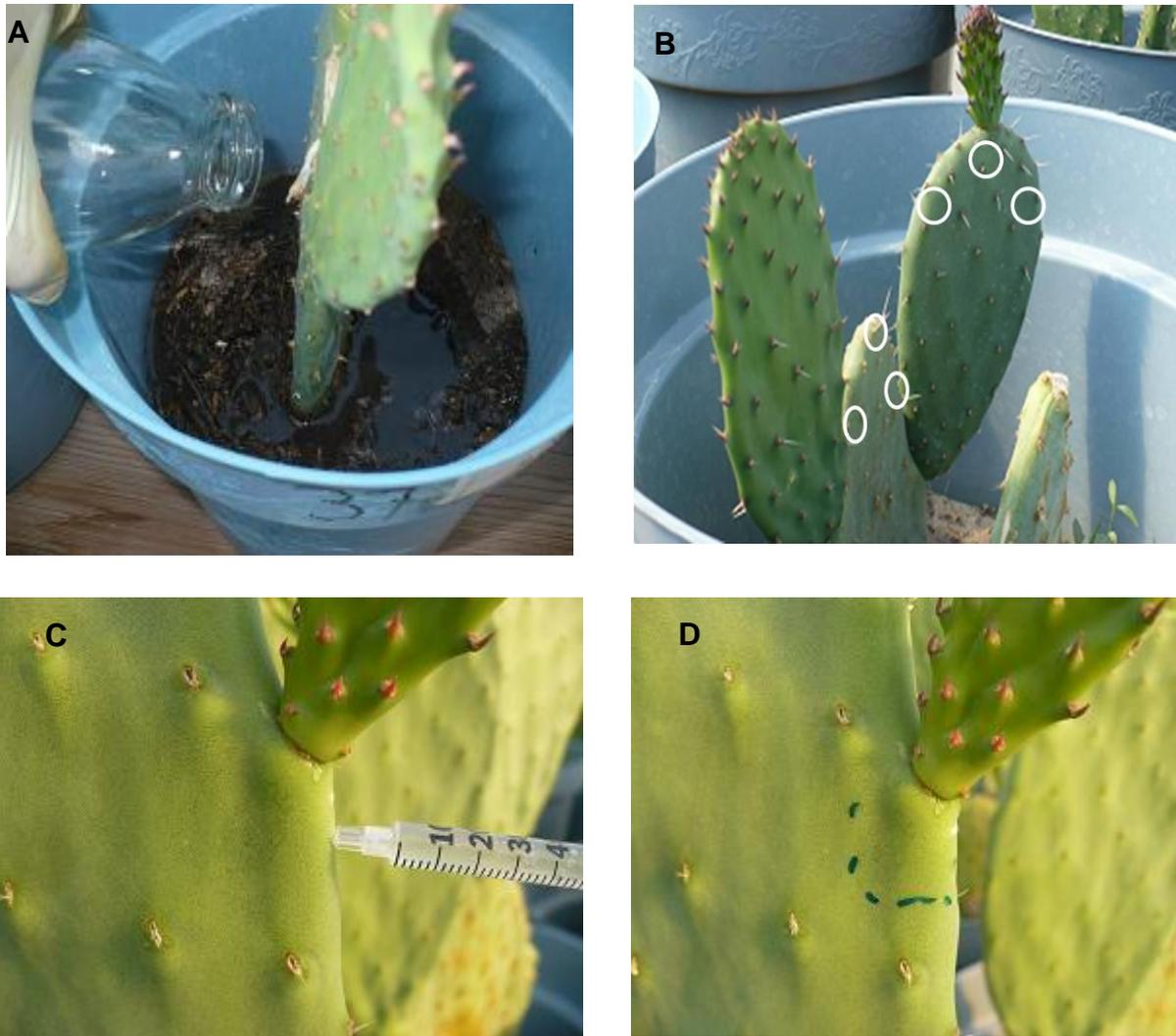


Figura 3.2 Aplicación de inoculo de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) en suelo, cladodios madre y cladodios secundarios de nopal. **A)** Aplicación directa de inoculo en suelo con 250 mL de suspensión bacteriana de St4-Km⁵⁰. **B)** Planta de nopal de nueve meses de edad mantenida en condiciones de invernadero, los círculos blancos indican los puntos en los cladodios madre (cladodio primario) y secundario (cladodios de segundo orden), donde se aplicaron 100 μ L del inoculo de St4-Km⁵⁰ por punción. **C)** Aplicación de inoculo en cladodios secundarios. **D)** Señalización de punto de inoculación para rápida identificación del sitio.

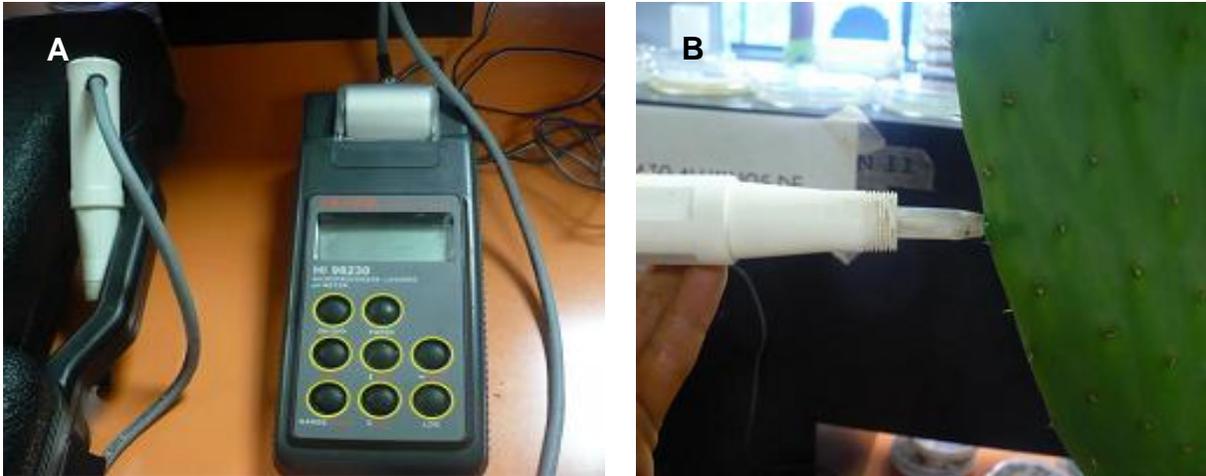


Figura 3.3 **A)** Potenciómetro con electrodo de aguja (Hanna®) para monitoreo de pH en nopal verdura *in vivo*. **B)** Electrodo insertado en cladodio secundario para determinar el pH interno del tejido.



Figura 3.4 Estimación de supervivencia de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) en muestras de suelo. **A)** Toma de muestra de maceta con planta de nopal. **B)** Bolsa Ziploc® con muestra de suelo para ser transportada al laboratorio para su procesamiento. **C)** Pesado de 25 g de muestra para su análisis. **D)** Muestra de suelo mezclado con 225 mL de ABP 0.1%.



Figura 3.5 Prueba para estimar la supervivencia de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) en nopal verdura. **A)** Cladodios madre sobre papel aluminio para ser transportados al laboratorio. **B)** Desinfección de cladodio con hipoclorito de sodio a 200 ppm por 3 min. **C)** Extracción de tejido para macerarse con ABP a 0.1%. **D)** Stomacher usado para macerar muestra de tejido por 1 min a 300 rpm.

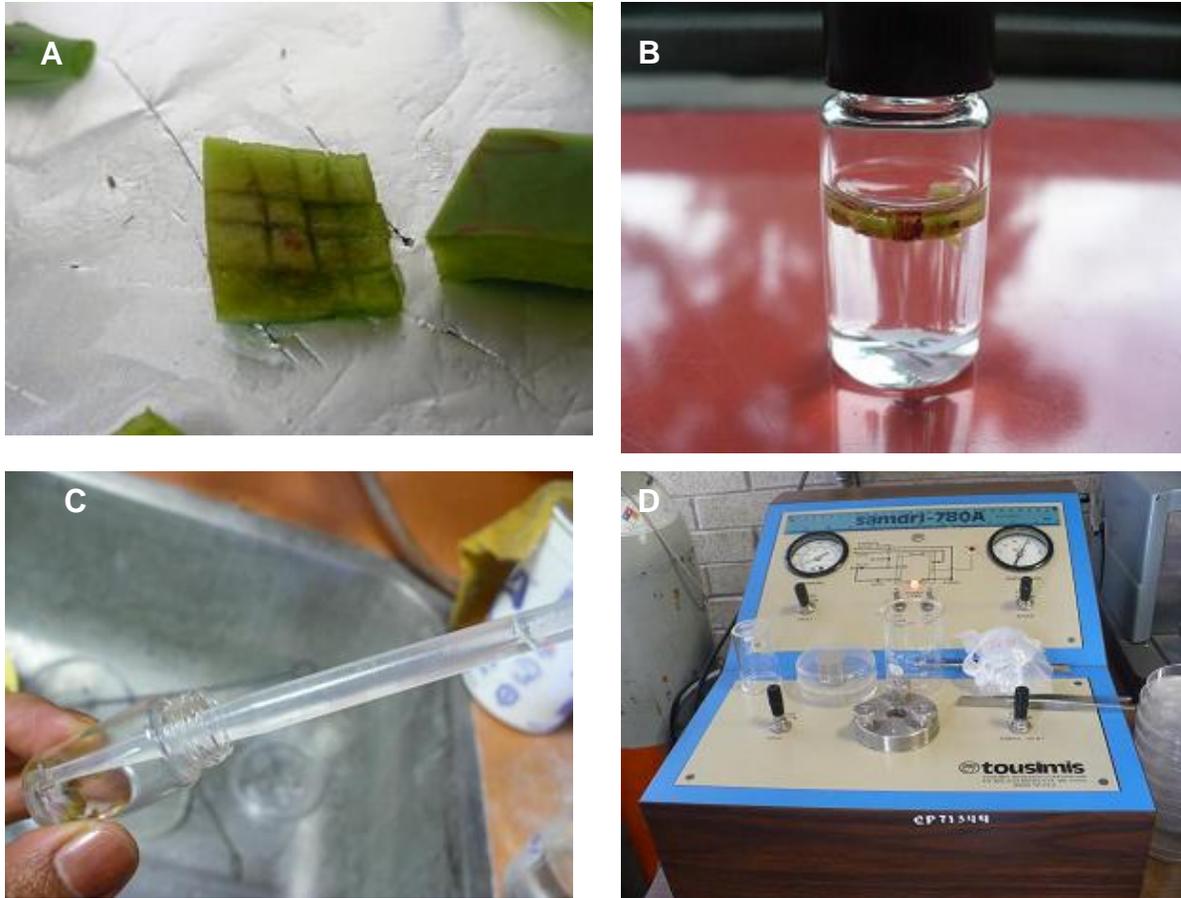


Figura 3.6 Procesamiento de muestras de tejido de nopal para microscopía electrónica de barrido (MEB). **A)** Segmentos de 3 mm de tejido inoculado con *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰). **B)** Tejido de nopal inoculado, fijado en glutaraldehído a 2.5%. **C)** Vial con tejido de nopal para deshidratación con etanol **D)** Equipo Samdri-780A® para secado de tejido a punto crítico de CO₂ por 40 min.



Figura 3.7 Procesamiento de muestras de tejido de nopal para microscopía electrónica de barrido (MEB). **A)** Ionizadora usada para recubrir muestras con aleación Au-Pd. **B)** Muestras de tejido de nopal después de la aplicación de la aleación Au-Pd. **C)** Equipo de microscopia electrónica de barrido integrado a equipo de computo. **D)** Platina de microscopio electrónico con porta-muestras.

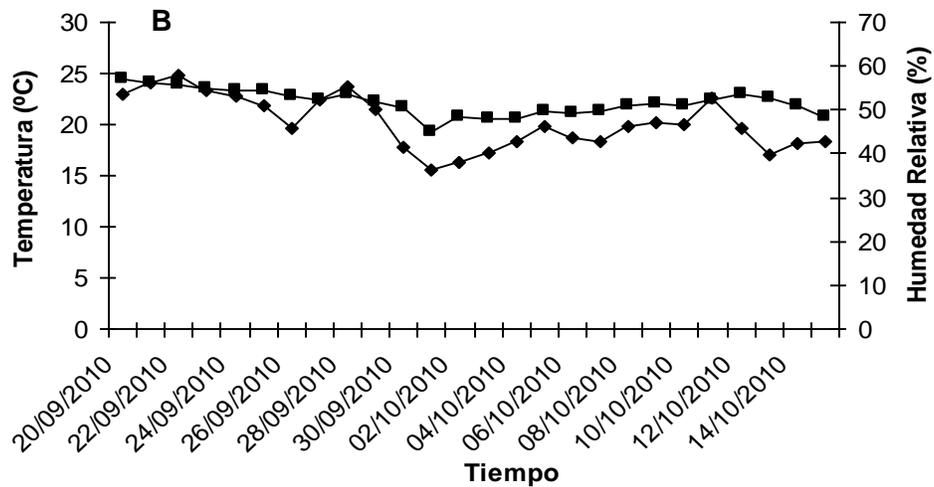
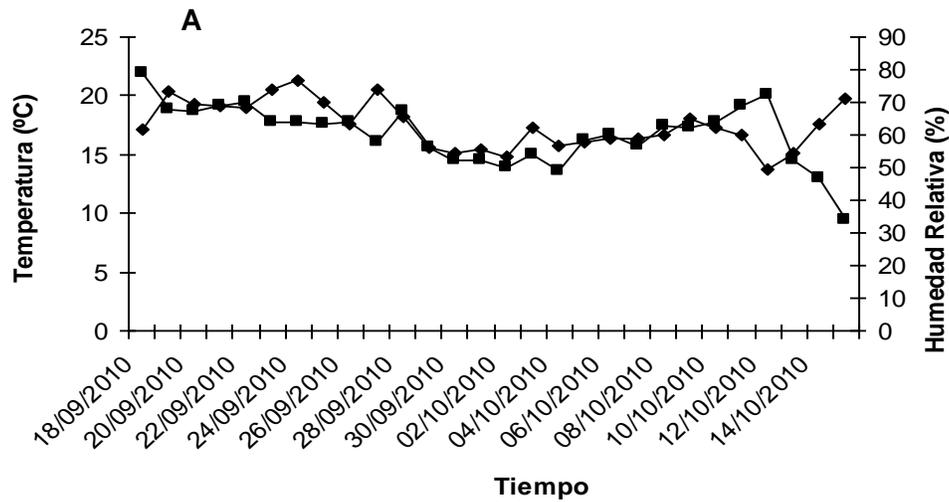


Figura 3.8 Condiciones de Temperatura (■, T, °C) y Humedad Relativa (◆, HR, %) registradas en invernadero (A), y en laboratorio (B), durante el desarrollo de cladodios inoculados con *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰). Los parámetros se registraron en un medidor digital de temperatura y HT (datalogger HOBO®). Cada valor representa el valor promedio de seis lecturas registradas por día.

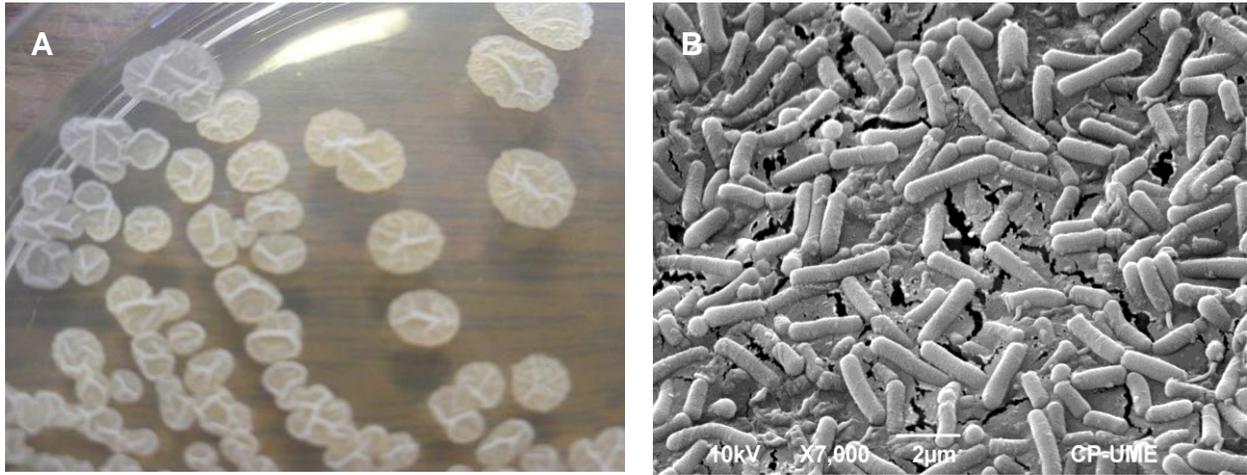


Figura 3.9 Colonias de *Bacillus* sp., aisladas de cladodios secundarios de nopal (*Opuntia ficus-indica*). **A)** Crecimiento de colonias de *Bacillus* sp. en Agar Soya Trypticaseína. Obsérvense las colonias con bordes irregulares, secas, rugosas y con sobrecrecimientos. **B)** Células de *Bacillus* observadas al microscopio electrónico de barrido a X 7,000.

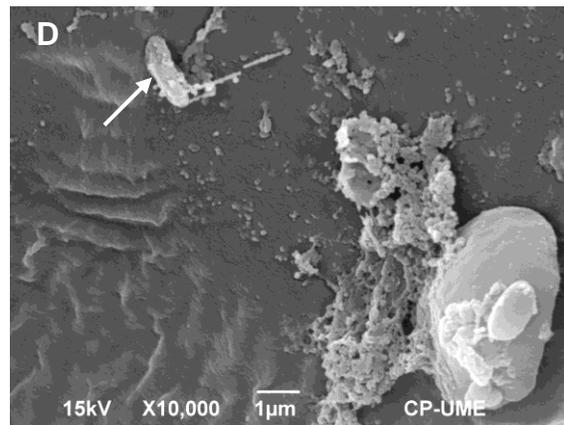
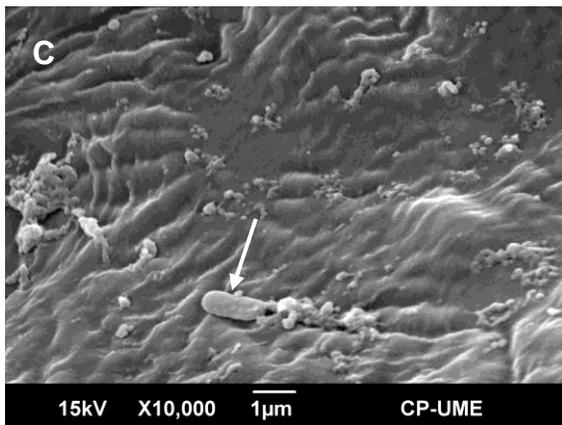
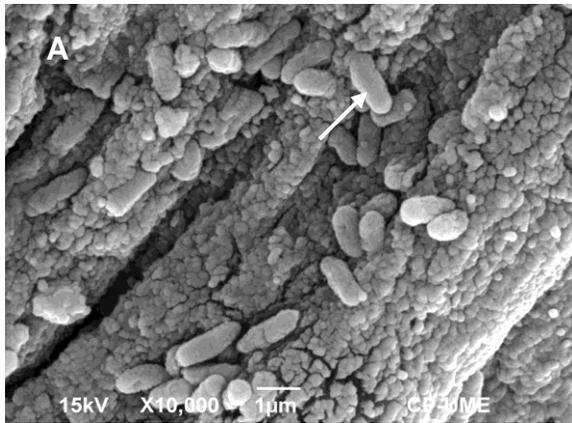


Figura 3.10 Células de *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰) al microscopio electrónico de barrido: Células observadas: en medio AST de 48 h de crecimiento (A); en tejido de nopal inmediatamente después de la aplicación del inóculo (B); y en tejido de cladodio secundario a las 24 h y 48 h después de la aplicación del inóculo, (C) y (D), respectivamente.

S. typhimurium St4-Km⁵⁰

Agua destilada

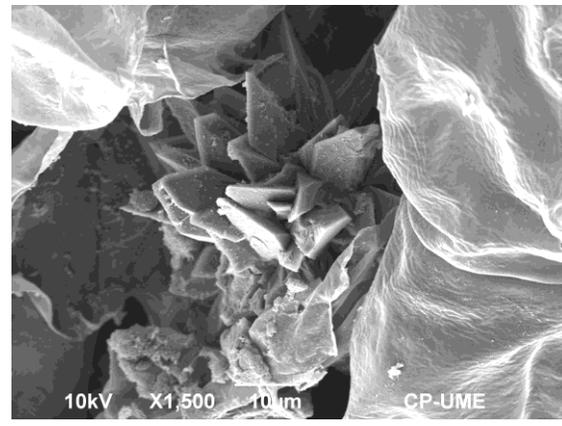
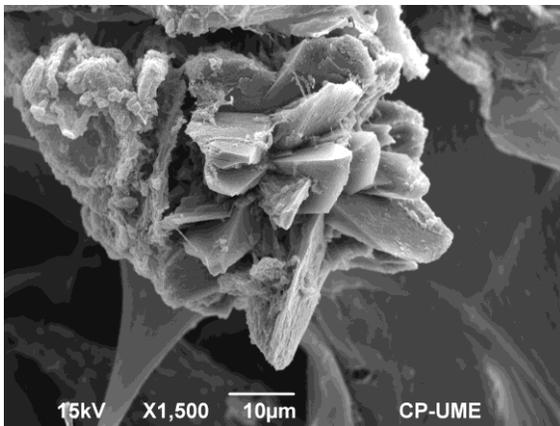
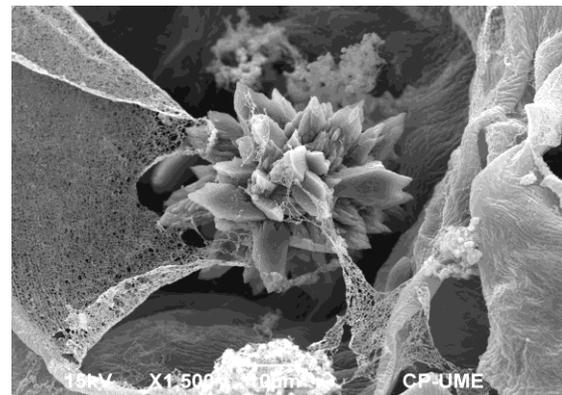
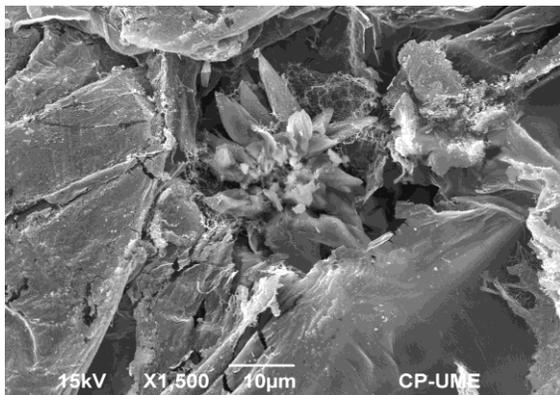
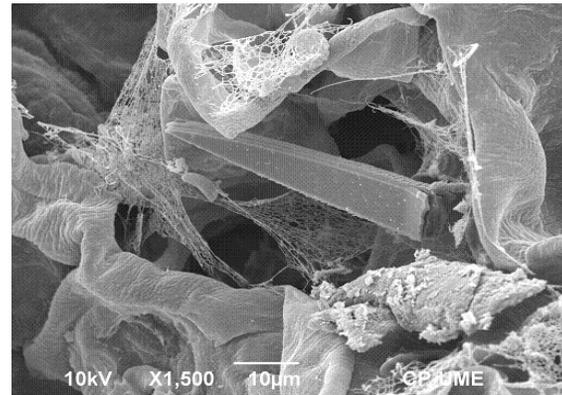
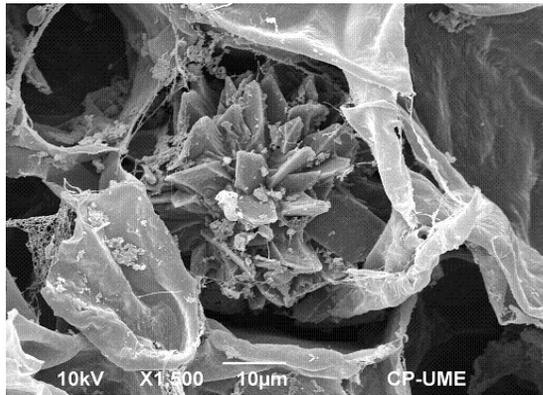


Figura 3.11 Diferentes tipos de cristales de oxalato de calcio en tejido de cladodios secundarios sin inocular e inoculados con *Salmonella typhimurium* (St4-Km⁵⁰).



Figura 3.12 Productos de amplificación por PCR en gel de agarosa a 0.8% con los iniciadores Sal-3 y Sal-4 de cepas presuntivas de *Salmonella* recuperadas de suelo, cladodios secundarios y cladodios madre. Línea 1: *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰; Línea 2: cepa 1 de cladodio secundario de laboratorio (1-CSL), Línea 3: cepa 2-CSL; Línea 4: cepa 3-CSL; Línea 5: cepa 1 cladodio madre (1-CM); Línea 6: cepa 2-CM; Línea 7: cepa 3-CM; Línea 8: cepa 4-CM; Línea 9: cepa 5-CM; Línea 10: cepa 1 de suelo (1-S); Línea 11: cepa 2-S; Línea 12: cepa 3-S; Línea 13: cepa 4-S; Línea 14: agua (TN); Línea 15: cepa 1 cladodio secundario de invernadero (1-CSI); Línea 16 marcador molecular Φ X174/Hae III (MM).

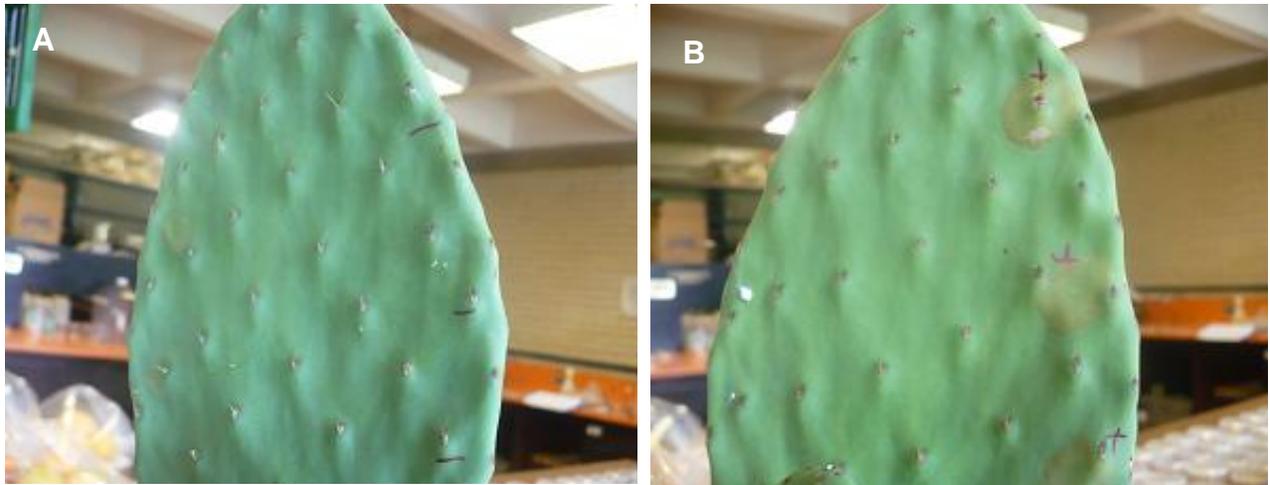


Figura 4.1 Cladodios secundarios inoculados con: **A)** Agua Buferada Peptonada a 0.1% (ABP), y **B)** con *Salmonella typhimurium*. Donde las líneas rojas (-) indican el área donde se aplicó el ABP y las cruces (+) donde se aplicó *S. typhimurium*. En **B)** se aprecian lesiones circulares amarillas como resultado de la reacción del tejido a la inoculación con la bacteria.

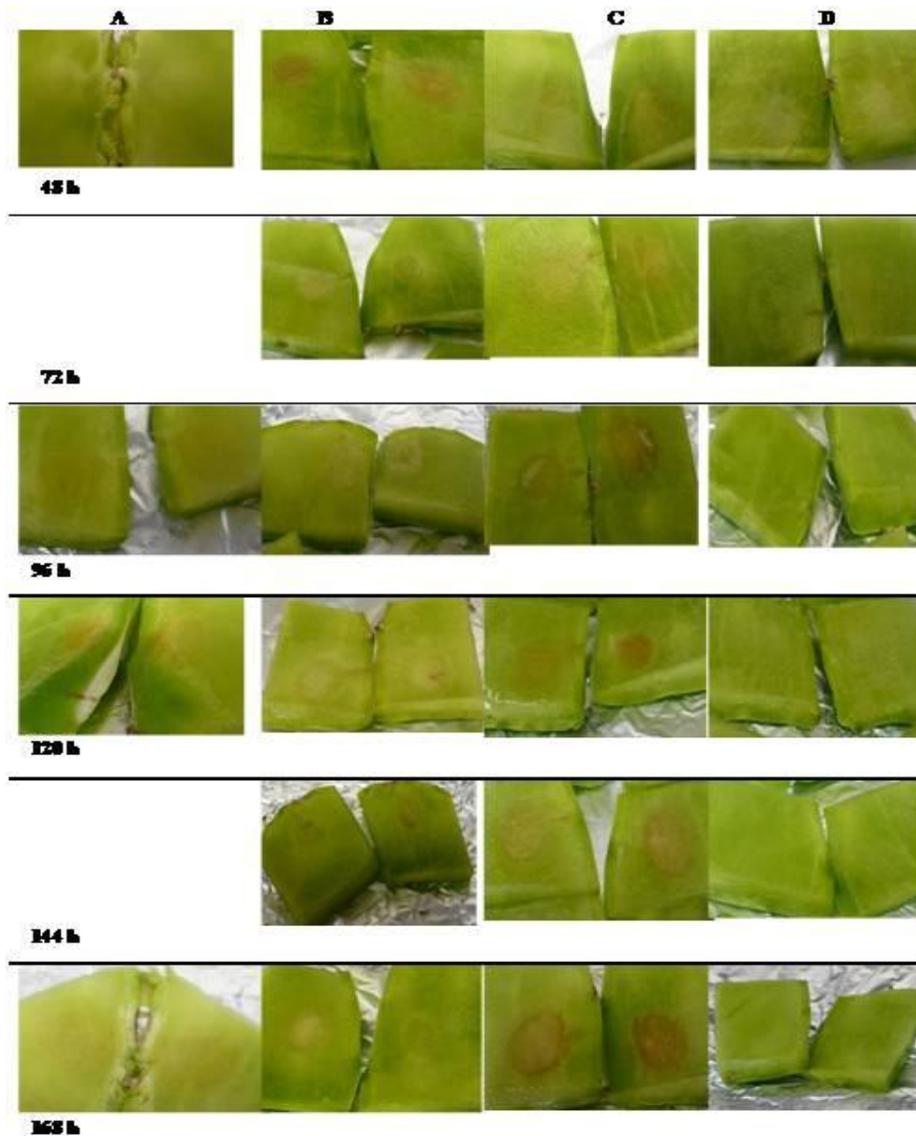


Figura 4.2 Respuesta en cladodios de nopal inoculados por infiltración con 8 Log UFC de *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ (A, B y C) y con Agua Buferada Peptonada a 0.1% (D). Nótese las lesiones con oscurecimiento desarrolladas en el tejido interno después de la inoculación en: A, cladodio madre; B, cladodio secundario en planta; y C, cladodio secundario precortado. Tejido de cladodio Nótese en B y C la deshidratación del tejido de la lesión a las 96 y 144 h, respectivamente.



Figura 4.3 Respuesta en cladodio secundario precortado de nopal verdura a las 168 h después de la infiltración con *S. typhimurium* St4-Km⁵⁰ (8 Log UFC/mL) y mantenido en condiciones de laboratorio. Nótese el oscurecimiento y desprendimiento del tejido infiltrado.

ANEXO

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

(Terragno *et al.*, 2003 y Winn *et al.*, 2008)

1. Medio MR-VP (BD BIOXON®)

Pesar 17 g del medio en un litro de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 min. Distribuir el líquido en tubos de ensaye. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) por 15 min. Si los tubos no se usan inmediatamente deben ser mantenidos en refrigeración de 2° a 8°C. Inocular 2 tubos de Caldo MR-VP con el cultivo puro objeto de investigación. Incubar hasta 4 días a 35°C. Posteriormente realizar los siguientes ensayos:

Prueba de rojo de metilo: Agregar 5 gotas de solución rojo de metilo a 5 mL de medio de cultivo líquido inoculado e incubado por 4 días a 35°C. Una

Reacción positiva	Reacción negativa
Color rojo bien definido	Sin cambio de color o color amarillo

Prueba de Voges-Proskauer:

Agregar 5 mL de solución de sulfato de cobre y amoniaco de Leifson a 5 mL de medio de cultivo líquido inoculado e incubado por 4 días a 35°C.

Reacción positiva	Reacción negativa
Aparición de color rojo a los 20 min indica la presencia de acetilmetil-carbinol	Ausencia de color.

1.1 Preparación de solución indicadora para el rojo de metilo

Disolver 0.1 g de rojo de metilo en 300 mL de alcohol al 95%. Aforar enseguida a 500 mL con agua destilada. Las reacciones se toman de acuerdo al cambio de color.

1.2 Preparación de solución de sulfato de cobre y amoniaco de Leifson

Disolver 1 g de sulfato de cobre (FERMONT®) en 40 mL de amoníaco concentrado (Química Meyer®). Posteriormente agregar 690 mL de hidróxido de potasio al 10%. Guardar en recipiente ámbar bien cerrado en un lugar fresco.

2. Medio MIO (BD BIOXON®)

Resuspender 31 g del medio MIO en un litro de agua destilada en un matraz de 500 mL. Calentar la suspensión con agitación suave hasta su completa dilución y hervir por un min. Dispensar 10 mL del medio en tubos de ensaye. Esterilizar el medio a 121°C (15 libras de presión) por 15 min y dejar enfriar en posición vertical. Las reacciones a registrar son las siguientes:

2.1 Prueba de movilidad

Reacción positiva	Reacción negativa
Difusión del crecimiento en la línea de siembra.	El crecimiento de la bacteria no se difunde.

2.2 Descarboxilación de Ornitina

Reacción positiva	Reacción negativa
El medio no cambia de color	El medio cambia de color púrpura a amarillo

2.3 Prueba de Indol (Adicionar de 3 a 4 gotas del reactivo de Kovac's o Erlich)

Reacción positiva	Reacción negativa
Desarrollo de color rosa a rojo	No hay cambio de color

3. Agar Citrato de Simmons (ACS, BD BIOXON®)

Pesar 24.2 g de ACS en un litro de agua destilada y calentar la suspensión hasta su completa dilución. Dejar hervir el líquido por un min y dispensar en tubos de ensaye de 5 mL. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 min. Dejar enfriar en posición inclinada.

Reacción positiva	Reacción negativa
Crecimiento en el medio con un intenso color azul.	Ausencia o pobre crecimiento sin cambio de color en el medio que permanece verde.

4. Agar de Hierro y Lisina (LIA, BD BIOXON®)

Re-hidratar 33 g de medio LIA en un litro de agua destilada por 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición por 1 min para disolver completamente. Distribuir el medio en tubos de ensayo de 13x100 mm, tapar con algodón o tapón de rosca flojo y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) por 15 min. Enfriar en posición inclinada para obtener un fondo de 1.5 a 2.0 cm. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

Cuadro 1. Cambios de color esperados y producción de ácido sulfhídrico en el medio LIA después de la inoculación con diferentes microorganismos.

Microorganismo	Color		H ₂ S ³
	Superficie	Fondo	
<i>Citrobacter freundii</i>	Púrpura ¹	Amarillo ²	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	Púrpura	Púrpura	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Roja	Amarillo	- (+)

El color ¹púrpura se asocia con reacción alcalina y el ²amarillo con una ácida. ³La producción de ácido sulfhídrico, reacción positiva (+) se manifiesta con un calor negro en el medio de cultivo. En la reacción negativa (-), no se presenta ningún cambio de color.

5. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI, BD BIOXON®)

Suspender 23 en 1 L de agua destilada. Calentar y hervir por un min. Dispensar en tubos de vidrio, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) por 15 min. Dejar enfriar en posición horizontal.

Cuadro 2. Tabla de cambios de color esperados en el medio TSI, después de la inoculación con diferentes microorganismos

Microorganismo	Color		H ₂ S ³	Gas (CO ₂) ⁴
	Superficie	Fondo		
<i>Escherichia coli</i>	Rojo ¹	Rojo	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Rojo	Rojo	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	Amarillo ²	Rojo	+	+

El color ¹rojo se asocia con reacción ácido y el ²amarillo con una alcalina. ³La producción de ácido sulfhídrico, reacción positiva (+) se manifiesta con un calor negro en el medio de cultivo. En la reacción negativa (-), no se presenta ningún cambio de color. ⁴La producción de gas (CO₂) se observa por el desplazamiento del medio de cultivo.

6. Agar de Hierro de Kligler (AHK, DIBICO®)

Re-hidratar 52 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar hasta el punto de ebullición por 1 min. Distribuir en tubos de ensayo, tapar con tapón de rosca flojo y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) por 15 min. Enfriar en posición inclinada para obtener un fondo de 1.5 a 2.0 cm. Conservar tubos en refrigeración de 4 a 8°C.

Cuadro 3. Cambios de color esperados en el medio AHK, después de la inoculación con diferentes microorganismos

Microorganismo	Color		H ₂ S ³	Gas (CO ₂) ⁴
	Superficie	Fondo		
<i>Escherichia coli</i>	Rojo ¹	Rojo	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Amarillo	Rojo	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	Amarillo ²	Rojo	+	+

El color ¹rojo se asocia con reacción ácido y el ²amarillo con una alcalina. ³La producción de ácido sulfhídrico, reacción positiva (+) se manifiesta con un calor negro en el medio de cultivo. En la reacción negativa (-), no se presenta ningún cambio de color. ⁴La producción de gas (CO₂) se observa por el desplazamiento del medio de cultivo.

7. Agar Verde Brillante (AVB, BD BIOXON®)

Re-hidratar 58 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar hasta el punto de ebullición por un min, y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) por 15 min. Enfriar y vaciar en cajas de Petri estériles. Las colonias típicas de *Salmonella* aparecen como colonias de color rosa, opacas y rodeadas de un color rojo brillante del medio.

NOTA: Es importante protegerlo de la luz. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

8. Agar Soya Trypticaseína (AST, BD BIOXON®)

Suspender 40 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar y hervir por un min. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 min. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

9. Agar McConkey (AM, BD BIOXON®)

Suspender 50 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar y hervir por un min. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 min. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles. Los microorganismos lactosa positiva dan colonias de color rosa con o sin zona de precipitado alrededor. Los microorganismos lactosa negativos dan colonias incoloras o de color muy claro.

10. Agar Entérico Hektoen (AEH, BD BIOXON®)

Re-hidratar 76 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar y hervir por un min. **NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE**. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles y conservar en refrigeración de 2° a 8°C.

11. Caldo Soya Trypticaseína (CST, BD BIOXON®)

Suspender 30 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar y hervir por un min. Dispensar en tubos de ensaye y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 min.

12. Caldo Vassiliadis-Rappaport (CRV, BD DIFCO®)

Suspender 26.6 g en un litro de agua destilada y mezclar. Calentar para disolver completamente los ingredientes. Distribuir en tubos de ensaye y esterilizar en autoclave a 116°C (10 libras de presión) por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización.

13. Caldo Base Tetrionato (CBT, BD DIFCO®)

Suspender 4.6 g de polvo en 100 mL de agua destilada y hervir a ebullición. Posteriormente enfriar por debajo de 60°C y agregar 2 mL de solución yodada. Dispensar en tubos de ensaye previamente esterilizados.

13.1 Solución yodada

Pesar 6 g de cristales de iodo resublimado (FERMONT®) y 5 g de yoduro de potasio (FERMONT®), mezclar ambos reactivos con 20 mL de agua destilada estéril. Guardar en contenedor de color ámbar en lugar fresco.

14. Caldo Urea (CU, BD BIOXON®)

Disolver 3.87 g de polvo en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Distribuir de 0.5 a 1.0 mL en tubos pequeños previamente esterilizados. Si no puede filtrarse el caldo, los tubos con el caldo pueden esterilizarse a 108°C entre 7 y 10 minutos. También puede usarse inmediatamente después de prepararse sin esterilizar, dando resultados confiables.

15. Agua Buferada Peptonada a 0.1% (ABP)

Pesar 0.2 g del medio de ABP y mezclar con 1000 mL de agua destilada estéril, esterilizar a 121°C (15 lb de presión) por 15 min.

16. Preparación de la Solución Stock de Kanamicina (50 µg/mL, SIGMA-ALDRICH®)

Para preparar una solución stock de Kanamicina a 50 mg/mL, adicionar 250 mg de Kanamicina a 5 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 10 mL, previamente esterilizado, y mezclar. Filtrar la solución de Kanamicina a través de un filtro Millipore® estéril. Utilizar portafiltro y aguja previamente esterilizados.

17. Preservación de Cepas de *Salmonella* en glicerol (ALTA PUREZA®)

Crece una colonia en tubos con 5 mL de Caldo Soya Trypticaseína (CST) con agitación a 37°C por 18 h. Después de la incubación adicionar 600 µL de la suspensión bacteriana a tubos Eppendorf con 400 µL de glicerol a 50%, previamente esterilizado. Almacenar los tubos con la bacteria a -10°C.

18. Reactivación de Cepas Mantenidoas en Glicerol a -20° C

De un tubo Eppendorf almacenado a -20°C con cada cepa sospechosa de *Salmonella*, se toma una alícuota del contenido y se deposita en un tubo con CST. El

tubo se incubo a 37°C por 18 h. Con un asa se tomó un poco de la suspensión bacteriana crecida en el tubo y se depositó en cajas Petri con AEH. De cada cepa de estas cajas se tomaron las colonias para llevar a cabo las pruebas bioquímicas antes mencionadas.

19. Reactivación de Cepas St4-Km⁵⁰

La bacteria, registrada en el laboratorio como *Salmonella* Typhimurium St4-Km⁵⁰, se reactivó en Caldo Soya Trypticaseína (CST) más Kanamicina (CST-Km⁵⁰) a 37°C por 18 h y se creció en Agar Soya Trypticaseína (AST) más Kanamicina (AST-Km⁵⁰) a 37°C por 48 h.

PCR

20. Resuspensión de Oligonucleótidos (Primers: Sal-3 y Sal-4)

Para preparar la solución stock a 100 µM, se debe tomar el número de nanomoles (información que se encuentra en la etiqueta del tubo y/o en la hoja de seguridad) y multiplicarlo por 10. El resultado obtenido, es el número de micromoles del líquido (buffer TE, o agua) que debe ser agregado al tubo. En este caso particular, cada tubo contenía 35.2 nm y 39.2 nm, de los oligonucleótidos liofilizados Sal-3 y Sal-4, respectivamente. Por lo que para resuspenderlos se agregaron 352 y 392 µL de agua, a los tubos de Sal-3 y Sal-4, respectivamente. De esta manera, se obtuvo una solución stock de 100 micromolar de cada oligonucleótido.

Para preparar la solución de trabajo a una concentración de 10 micromolar se procedió de la siguiente manera: Se tomo 1 µL de la solución stock del oligonucleótido y se mezcló con 9 µL de agua.

Los oligonucleótidos se usan a una concentración de 0.25 micromolar. Para obtener esta concentración se tomaron 0.625 µL de cada oligonucleótido y se mezclaron con el volumen restante del mix de reacción (volumen total de reacción (del mix) 25 µL).

Cuadro 4. Secuencia de iniciadores *Sal-3* y *Sal-4* usados para la amplificación de gen *Inva* de *Salmonella typhimurium*.

Secuencia de iniciadores	Longitud (pb)	Región de amplificación
Sal-3		
5' TAT CGC CAC GTT CGG GCA A 3'	19	275
Sal-4		
5' TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3'	19	275

21. PCR Master Mix

El PCR Master mix (promega ®) contiene el protocolo para llevar a cabo preparar diferentes volúmenes de reacción (25, 50 y 100 µL de reacción):

Para preparar un volumen de reacción de 25 µL se recomienda mezclar las cantidades que se listan a continuación tomando en cuenta la hoja de seguridad incluida en el Master mix.

Cuadro 5. Datos y componentes de Master mix, cantidades a utilizar y volumen final para preparar 1 reacción de PCR.

Datos proporcionados en la hoja de seguridad del PCR Master mix (Promega®)			Cantidades (µL) a usar para preparar 1 reacción de mix
Componente	Volumen (µL)	Concentración final	
PCR master mix, 2X	12.5	1 X	12.5
Oligonucleotido río	0.25-2.5	0.1-1.0 µM	0.65

arriba (primer 1, **Sal**
3)

0.25-2.5	0.1-1.0 μ M	0.65
----------	-----------------	------

Oligonucleotido río
abajo (primer 2, **Sal**
4)

1-5	< 250 ng	5
-----	----------	---

ADN templado

25	N.A	6.2
----	-----	-----

Agua libre de
nucleasas a

Volumen total = 25
 μ L

Del Master mix se tomaron 20 μ L y se depositaron en tubos para PCR (previamente esterilizados). Posteriormente, cuando todos los tubos estuvieron listos a cada uno se le agregó 5 μ L de la muestra de ADN de cada bacteria a evaluar.

22. Bromuro de Etidio

Preparación de Bromuro de etidio a una concentración de 1 μ g/mL

Bromuro de etidio 1 μ g

Agua destilada 1 mL

Pesar el bromuro con guantes por ser una sustancia cancerígena, disolver y almacenar la solución en un frasco oscuro envuelto con papel aluminio a temperatura ambiente. Agregar 8 μ L a la solución del gel, antes de verterlo en la cámara de electroforesis.

23. Preparación del Marcador

El marcador G1761 (Φ X174/Hae III) viene resuspendido en buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA), por lo cual no es necesario reconstituirlo de ninguna forma. Para usarlo en el gel se recomienda cargar 1 μ L de marcador más el buffer de carga (Blue/Orange 6X). Para cargar el marcador usar las siguientes cantidades: 1 μ L de marcador + 1 μ L de buffer de carga + 4 μ L de agua.

24. Preparación de Soluciones de Cloro

$$\text{Volumen de NaOCl (necesario)} = \frac{(\text{ppm de cloro libredeseado}) \times (\text{volumen total del recipiente})}{\% \text{ NaOCl del contenedor (bote)} \times 10,000}$$

Ejemplo:

Para preparar 1 L de solución clorada a 200 ppm, usando cloro a 12%

$$\text{Volumen de NaOCl a utilizar} = \frac{(200 \times 1000)}{12 \times 10,000}$$

Volumen necesario de NaOCl a 12% para preparar 1 L de solución de cloro a 200 ppm = 1.6 mL de cloro

25. Preparación de Amortiguador de Fosfatos de Sorensen (Microscopia)

Previo a la preparación del amortiguador de Sorensen, deben prepararse las soluciones A y B de la siguiente manera:

Para preparar 200 mL de la sol. A, se pesan 5.68 g de Na_2HPO_4 (Fosfato disódico anhídrido, J.T. BAKER®) y se disuelven en 200 mL de agua destilada.

Para preparar 200 mL de la sol. B., se pesan 5.52 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de sodio monobásico, J.T. BARKER®) y se disuelven en 200 mL de agua destilada.

Para preparar 200 mL de amortiguador de fosfatos se mezclan 81 mL de la solución A y 19 mL de la solución B, lo cual nos dará un volumen final de 100 mL. Esta última se mezcló con 100 mL de agua bidestilada.

26. Preparación de Glutaraldehído a 2.5%

Para preparar 100 mL de glutaraldehído se mezclan 10 mL de glutaraldehído a 25%, 90 mL de 90 mL de solución amortiguada, más 10 mL de CaCl₂ (a 1%, en gotas).

27. Preparación de Soluciones de Alcohol

Estas soluciones se prepararon a diferentes concentraciones para deshidratar tejidos a usar en Microscopia. La fórmula usada para hacer la preparación de estas soluciones fue la siguiente:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Tomando en cuenta lo siguiente: la concentración inicial (C₁) del alcohol (96%). El volumen a preparar de alcohol (100 mL, V₂), para preparar alcohol a 30% (C₂), se procede de la siguiente manera:

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(30 \times 100)}{96}$$

$$V_1 = 31.25 \text{ mL}$$

Cuadro 6. Cantidades y proporciones de etanol y agua destilada para preparar 100 mL de soluciones alcohólicas, a diferentes concentraciones para deshidratar de tejidos.

Concentración del alcohol (%)	Volumen a usar de alcohol 96% (mL)	Cantidad de agua (mL)	Volumen final (mL)
30	31.25	68.75	100
40	41.67	58.33	100
50	52.08	47.92	100
60	62.50	37.50	100
70	72.92	27.08	100
80	83.33	16.67	100
90	93.75	6.25	100