

Recuperación de *Salmonella* spp. a partir de *berries* frescas con el uso de BPW como caldo de preenriquecimiento

Villalpando Delgadillo C.D.¹ • Rodríguez Ruíz Esparza A.¹ • Pérez Montaña J.A.¹
Martínez Chávez L.^{1*} • Martínez Gonzáles N.E.¹

Palabras clave: *Salmonella*, *berries*, BPW, preenriquecimiento
Key words: *Salmonella*, *berries*, BPW, pre-enrichment

Introducción

Las *berries* (fresa, frambuesa, zarzamora y arándano) son frutas caracterizadas por sus colores intensos y diversidad de tamaños, sin semilla, con sabores ácidos y dulces de acuerdo al tipo de *berry*, además que tienen alto contenido de humedad (>0.91%), fibra, antioxidantes, vitaminas C y E, micronutrientes como ácido fólico, calcio y selenio [1]. También son apreciadas debido al aporte de antioxidantes y sustancias fitoquímicas como los polifenoles y flavonoides, incluyendo antocianinas y elagitaninos. El consumo de *berries* ha sido asociado con mejoras en la salud cardiovascular y una reducción significativa en la mortalidad por enfermedades cerebrovasculares [2].

Las *berries* pueden contaminarse a partir de diver-

sas fuentes como el agua de riego, animales, humanos y equipos, que pueden afectar su inocuidad [3]. En 2011, la FDA detectó *Salmonella* spp. en 143 muestras de fresas importadas a los Estados Unidos [4]. El Sistema Nacional de Informes de Brotes (NORS, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos reportó 27 brotes, 102 hospitalizaciones y dos muertes por consumo de *berries*, en el periodo de 2009 a 2020 [6]. Los principales agentes de enfermedades transmitidas por *berries* fueron Norovirus, *Salmonella* spp. *Cyclospora cayetanensis*, *Escherichia coli* O157:H7, Hepatitis A y *Bacillus cereus*.

La metodología para la recuperación de *Salmonella* del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM, por sus siglas en inglés) no incluye un procedimiento para la

1 Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1421, Colonia Olímpica, 44430 Guadalajara, Jalisco, México

* liliana.mchavez@academicos.udg.mx



etapa de preenriquecimiento de muestras de *berries* frescas [7]. Un estudio llevado a cabo con *berries* señala como los flavonoides y ácidos fenólicos muestran una actividad inhibitoria y antimicrobiana contra bacterias Gram negativas como *Salmonella* spp.; estos compuestos son liberados al modificar la estructura original del fruto cuando se emplean métodos destructivos de procesamiento [8]. El ultrasonido ha sido empleado como un método no destructivo para desprender *Salmonella* spp. de fresas frescas [9]. Por otra parte, se ha comparado la efectividad del agua peptonada amortiguada (BPW, por sus siglas en inglés) como medio de preenriquecimiento para la recuperación de *Salmonella* en melones, mangos y tomates enteros o triturados. Los resultados del estudio evidenciaron que el BPW y el caldo de preenriquecimiento universal fueron significativamente más efectivos que el caldo lactosado para recuperar al patógeno. Ninguna diferencia significativa ($p > 0.05$) fue encontrada entre el UP y el BPW [10].

Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar un método de recuperación de *Salmonella* spp. a partir de *berries* frescas, con el uso de BPW como caldo de preenriquecimiento.

Metodología

En un mercado local se adquirieron fresas, zarzamoras, frambuesas y arándanos a granel en bolsas o recipientes de polietileno de 1 L. Se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente en un periodo no mayor a 2 h después de su compra. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente previo al análisis.

Preparación del inóculo.

Los frutos fueron inoculados con una mezcla de tres cepas de *Salmonella* aisladas del epicarpio de aguacate recuperado de un mercado (Sm-R-559), del epicarpio de jitomate (Sm-R-035) y de heces (Sm-R-037). Las cepas se conservaron en tubos de agar soya triptica inclinado a 5°C.

Para la preparación del inóculo se realizaron tres resiembras consecutivas a 35°C en caldo soya triptica adicionado con 0.6 % de extracto de levadura (CSTEL). Los cultivos fueron lavados mediante centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos a 5°C; se des-

echó el sobrenadante y la biomasa se resuspendió con solución salina fisiológica al 0.85% (SSF). Se preparó una mezcla de células lavadas de las tres cepas, la cual contenía 9.0 ± 0.1 Log UFC/mL. A partir de esta mezcla se prepararon diluciones decimales con diluyente de peptona al 0.1% (DP) para obtener los niveles de inóculo bajo (4.3 Log UFC/mL) y alto (6.1 Log UFC/mL).

Uso del BPW como medio de preenriquecimiento.

El proceso se dividió en etapas. Las muestras de 50 g de *berries* fueron inoculadas con 100 µL de la suspensión del inóculo bajo/alto de la mezcla de cepas, las cuales fueron divididas en dos grupos, el primero fue analizado inmediatamente para recuento de *Salmonella* y en el segundo, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 h previo al recuento del patógeno. Posteriormente, se obtuvieron muestras que fueron suspendidas en 450 mL de BPW y homogeneizadas en un baño de ultrasonido a 300 W a 40 kHz por 1 min. Se prepararon diluciones decimales para su siembra por extensión en superficie en agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD). Las muestras de *berries* de esta segunda etapa fueron conservadas en reposo durante 1 h a temperatura ambiente. Después, se incubaron a 35 °C por 24 h. Después de la incubación, se realizaron recuentos del patógeno en agar XLD a 35 °C por 24 h.

De acuerdo al método del BAM para la determinación de *Salmonella*, después del pre-enriquecimiento se inocularon tubos de ensayo con 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV) y Caldo Tetrionato (CTT) con 0.1 mL y 1 mL de la muestra respectivamente. Se incubaron a 42.5 °C (CRV) y a 43 °C (CTT) por 24 h. Posteriormente, se realizó la siembra por estría en agar XLD, Entérico de Hektoen (HE) y Sulfito de Bismuto (SB). Las cajas de agar XLD y HE se incubaron por 24 h a 35 °C, mientras que las de SB por 48 h a 35 °C. Se seleccionaron colonias presuntivas de *Salmonella* para la confirmación bioquímica en agar lisina hierro, agar de hierro y tripe azúcar, y caldo urea. La evaluación fue realizada con tres repeticiones y dos replicas para cada nivel de inóculo.

Por otra parte, se determinó el valor de pH en 50 g de *berries* no inoculadas suspendidas en 450 mL de

BPW, para registrar el comportamiento del pH en las muestras durante 0, 1, 4, 8 y 24 h de almacenamiento a 35 °C. Previo a la medición del pH, la muestra fue homogenizada en un baño de ultrasonido, bajo las condiciones descritas previamente. El estudio fue realizado con seis repeticiones y dos réplicas.

Análisis de datos.

Los recuentos de *Salmonella* fueron expresados en log UFC/450 mL del BPW. Se realizó un ANOVA multifactorial para comparar el efecto del tipo de *berry* y las etapas de procesamiento de la muestra, para los dos niveles de inóculo.

Resultados y discusión

El uso de BPW para preenriquecer muestras de *berries* inoculadas con dos niveles de células de *Salmonella* condujo a la recuperación de la misma.

Los recuentos promedio de *Salmonella* en las muestras de *berries*, después de conservarlas a temperatura ambiente durante 1 h, contenían entre 3.7 y 5.0 Log UFC/450 mL para el inóculo bajo y de 6.4 a 6.6 Log UFC/450 mL para el inóculo alto (Tabla 1). Al adicionar el BPW y conservar los frutos a 25°C por 1h, los recuentos fueron de 4.8, 3.6, 4.4 y 5.3 para fresa,

zarzamora, frambuesa y arándano, respectivamente, cuando se contaminaron con un inóculo bajo. Se observaron niveles menores ($P < 0.05$) de recuperación de *Salmonella* en la zarzamora respecto a los demás frutos (Tabla 1, Figura 1a). En tanto, no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la recuperación del patógeno entre el tipo de *berries* contaminadas con un inóculo alto (Figura 1b).

Cuando se utilizó el inóculo bajo, los recuentos de *Salmonella* fueron similares ($P > 0.05$) en las *berries* inoculadas y en las *berries* suspendidas en BPW y almacenadas por 1 h (Figura 1c). Lo anterior evidenció que la conservación de las muestras durante 1 h no afectó las poblaciones del patógeno. Sin embargo, se detectaron diferencias ($P < 0.05$) cuando se analizaron las muestras contaminadas con un inóculo alto, en las condiciones referidas anteriormente (Figura 1d). Las cuentas del patógeno se duplicaron en las *berries* inoculadas con niveles bajo y alto de células ($P < 0.05$) después del preenriquecimiento por 24 h; el aumento de la población fue de aproximadamente 5 log UFC. Cabe señalar que independiente de las condiciones estudiadas *Salmonella* se recupera en las etapas de enriquecimiento y aislamiento en medios selectivos diferenciales.

Tabla 1. Recuperación de *Salmonella* a partir de *berries* frescas inoculadas.

Inóculo	Etapa	Log UFC/450 mL de BPW (n=6)			
		Fresa	Zarzamora	Frambuesa	Arándano
Bajo	Fruto inoculado después de conservar a temperatura ambiente durante 1 h	4.5 ± 0.5	3.7 ± 0.1	4.2 ± 0.9	5.0 ± 0.3
	Fruto + BPW conservado a 25°C por 1 h	4.8 ± 0.3	3.6 ± 1.1	4.4 ± 1.1	5.3 ± 0.2
	Fruto + BPW después del preenriquecimiento a 35°C durante 24 h	9.1 ± 1.1	8.3 ± 0.7	9.5 ± 1.0	9.5 ± 1.3
Alto	Fruto inoculado después de conservar a temperatura ambiente durante 1 h	6.4 ± 0.4	6.5 ± 0.5	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.4
	Fruto + BPW conservado a 25°C por 1 h	6.9 ± 0.4	6.9 ± 0.5	7.1 ± 0.3	7.3 ± 0.3
	Fruto + BPW después del preenriquecimiento a 35°C durante 24 h	11.7 ± 0.3	11.5 ± 0.2	11.4 ± 0.2	11.7 ± 0.3

Los valores del pH de los frutos (Figura 2) sin inocular suspendidos en BPW durante 1 h no muestran ningún cambio ($P>0.05$), mientras que a las 24 h de almacenamiento a 35°C fueron de 6.1, 5.8, 4.4 y 6.8, para fresa, zarzamora, frambuesa y arándano, respectivamente ($P<0.05$).

Lo anterior permite observar como el BPW muestra un efecto amortiguador con fresa y arándano, menor con zarzamora y frambuesa. No obstante, fue po-

sible recuperar al patógeno bajo las condiciones del estudio.

Conclusión

El BPW muestra capacidad para amortiguar las variaciones de pH durante el preenriquecimiento y permite la recuperación de *Salmonella* a partir de muestras de *berries* frescas cuando se combina con la metodología del BAM.

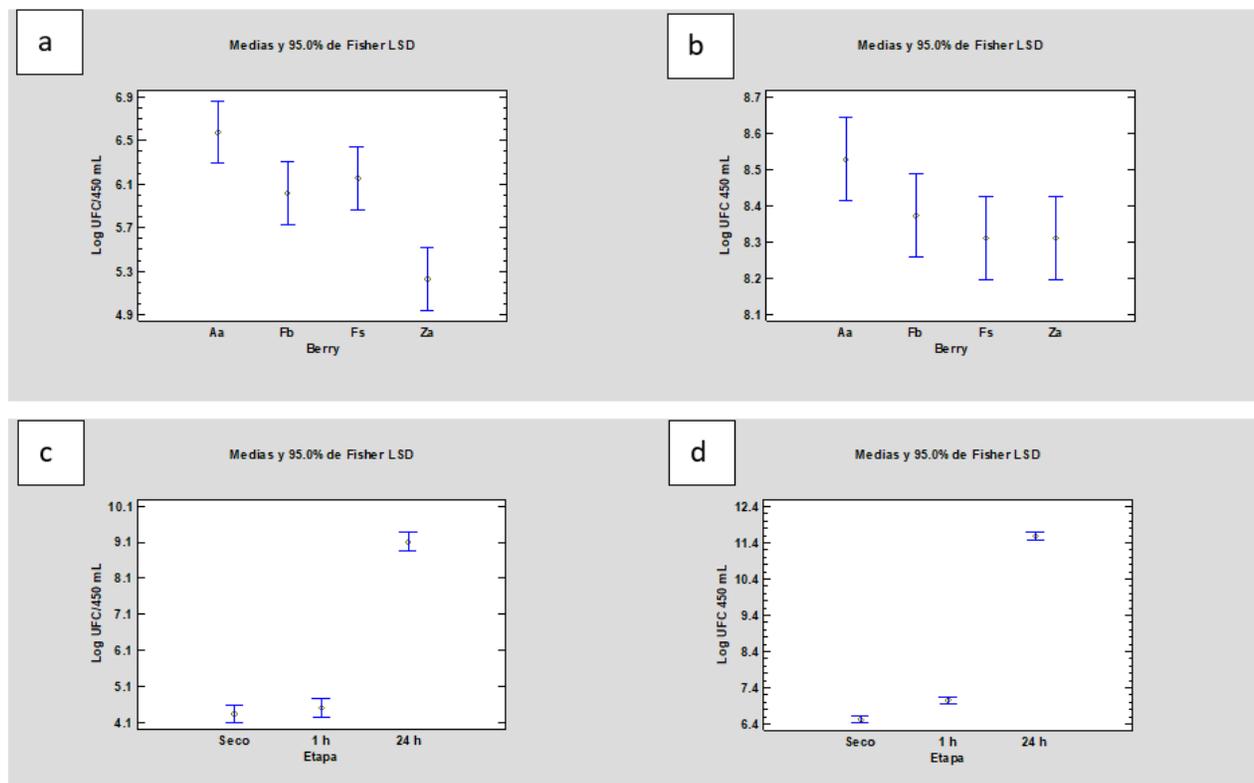


Figura 1. Recuento promedio de *Salmonella* en berries con niveles de inóculo bajo (a) y alto (b), e influencia del tiempo de incubación en las muestras inoculadas con niveles bajo (c) y alto (d).

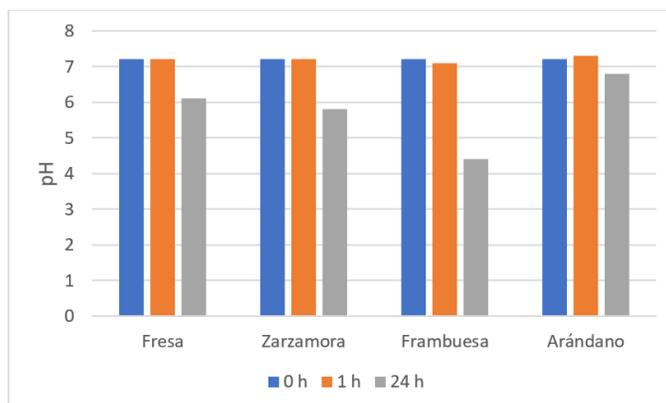


Figura 2. Valores de pH en berries en distintas etapas del análisis de muestras.

Referencias

1. SPE. Cultivo, poscosecha, procesado y comercio de *berries*. [En línea] Especialización de Servicios por la Producción Editorial. 2021. Disponible en: https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/cultivo_poscosecha_procesado_y_comercio_de_berries.
2. Basu, A., Rhone, M. y Lyons, T.J. Bayas: impacto emergente en la salud cardiovascular. *Revisiones de Nutrición*. 2010; 68 (3), 168-177.
3. EFSA. *Salmonella* and Norovirus un berries. *European Food Safety Authority Journal*. 2014; 12(6), 1-12. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3706>
4. Food and Drug Administration [FDA]. Survey of imported fresh produce FY 1999 field assignment. 2001. Disponible en: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170404223238/https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm118891.Htm>.
5. CDC. National Outbreak Reporting System (NORS) Dashboard | CDC. 2020. [En línea] Disponible en: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/> (Consultado: 18 octubre 2022).
6. FDA. BAM Chapter 1: Food Sampling/Preparation of Sample Homogenate. [En línea] U.S. Food and Drug Administration. 2022. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-1-food-samplingpreparation-sample-homogenate> (Consultado: 20 de agosto del 2022).
7. Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; 90(4), 494–507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x>.
8. Sanglay, G., Eifert, J. & Sumner, S. Recovery of *Salmonella* spp. from raw produce surfaces using ultrasonication. 2004. *Winter*; 1(4):295-9. doi: 10.1089/fpd.2004.1.295.
9. Hammack, T. S., Johnson, M. L., Jacobson, A. P., & Andrews, W. H. Effect of sample preparation and preenrichment media on the recovery of berries from cantaloupes, mangoes, and tomatoes. *Journal of AOAC International*. 2006. 89(1), 180–184. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.1.180>.