



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE FRUTOS DE GUAYABA
(*Psidium guajava*) ALMACENADOS EN FRIGORÍFICO:
EFECTO DEL CLORO, CALCIO Y CHOQUE TÉRMICO EN
POSTCOSECHA”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.QFB. BERENICE ARREOLA RIVERA

ASESOR

D.C. CONSUELO DE JESUS CORTES PENAGOS

MORELIA MICH. OCTUBRE 2006





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE FRUTOS DE GUAYABA
(*Psidium guajava*) ALMACENADOS EN FRIGORÍFICO:
EFECTO DEL CLORO, CALCIO Y CHOQUE TÉRMICO EN
POSTCOSECHA”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.QFB. BERENICE Arreola RIVERA

ASESOR

D.C. CONSUELO DE JESUS CORTES PENAGOS

SINODALES

M.C. JORGE CAMPOS

M.C. BERENICE YAHUACA JUAREZ

Q.F.B. JUAN BOSCO GUZMAN PEREZ

MORELIA MICH. OCTUBRE 2006



La presente investigación se efectuó en el Laboratorio de investigación en Biotecnología de Alimentos “M.C. Víctor Manuel Rodríguez Alcocer” en la Escuela de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás De Hidalgo, bajo la dirección de la D.C. Consuelo de Jesús Cortes Penagos.

RESUMEN

Palabras claves: guayaba, calidad microbiológica, almacenamiento, cloro, calcio y choque térmico.

Michoacán sobresale como primer productor de guayaba, abarcando el 41% de la producción nacional. Los problemas que con mayor frecuencia enfrenta el fruto son daños físicos, daños directos e indirectos por insectos, daños fisiológicos, daños mecánicos, enfermedades por varios géneros de microorganismos. El lavado con cloro es uno de los tratamientos más utilizados con la finalidad de desinfectar el fruto y así disminuir la carga microbiana. En la actualidad la aplicación poscosecha de Calcio es utilizado para el retraso de la senescencia, control de desordenes fisiológicos y efectos sobre diferentes tipos de patógenos en frutos y vegetales. Una alternativa para reducir el daño por frío y la carga microbiana, es la exposición del fruto previo al almacenamiento a tratamientos térmicos con temperaturas de 38°C a 40°C por un tiempo de 30 -240 minutos, induciendo las proteínas de choque térmico (HSP17 y HSP70). La respuesta al choque térmico se encuentra ligada a otros tipos de estrés, ya que produce protección contra deshidratación, daño por frío, congelamiento, metales pesados y estrés oxidativo en plantas. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la inmersión en cloro, solución de cloruro de calcio y choque térmico sobre la calidad microbiológica del fruto de guayaba. La metodología que se siguió fue: un lote de frutos se sometió a inmersión en cloro al 1% por 1 min.; para posteriormente someterlos a la inmersión en una solución de CaCl_2 al 1% por 120 min. Se llevaron a una cámara climática a 38°C por 30 min. considerando los controles respectivamente para cada tratamiento. Se almacenaron a 10°C durante 28 días, evaluando un lote de 3 frutos cada semana. Se determino la calidad microbiológica de las guayabas mediante el aislamiento de microorganismos tales como: *Coliformes totales. Vaciado en placa con Agar Bilis Rojo Violeta; *Determinación de Hongos y levaduras. Vaciado en placa con Agar Papa Dextrosa; *Determinación de Enterococcus. Prueba en placa con Agar KF-Base de Agar Sangre con Ázida; *Determinación de Bacterias Mesofilas Aerobias. Vaciado en placa con agar cuenta estándar; *Determinación de *S. aureus*, prueba en placa con Agar Base Baird Parker. En tres diluciones 1:10, 1:100, 1:1000. Los resultados obtenidos nos demuestran que con la aplicación de los tratamientos hay una disminución y eliminación de la carga de microorganismos indicadores. Con ello concluimos que la utilización de estos tratamientos es viable para garantizar la inocuidad y la calidad del fruto.

INDICE GENERAL

Resumen	I
Índice General	II
I. Introducción	1
II. Revisión Bibliográfica	3
2.1 Importancia de las frutas y verduras	4
2.2 inocuidad	4
2.3 Inocuidad de los alimentos	5
2.4 HACCP	7
2.4.1 Programas pre-requisitos a la aplicación de HACCP	8
2.4.2 Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)	9
2.4.3 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)	10
2.5 Microbiología de frutas y verduras	13
2.5.1 Deterioro microbiano de frutas y verduras	14
2.5.2 Microorganismos patógenos en frutas y verduras	15
2.5.3 Sobrevivencia	17
2.6 Guayaba	18
2.6.1 Principales enfermedades que atacan a la guayaba	19
2.6.2 Plagas que atacan a la Guayaba	21
2.7 Grupos microbianos indicadores en los alimentos	23
2.7.1 Microorganismos indicadores	24
2.7.2 Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)	25
2.7.3 Coliformes Totales	28
2.7.4 Enterococos	30
2.7.5 Hongos	32
2.7.6 Levaduras	
2.7.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.8 Manejo poscosecha	37
2.8.1 Clasificación de la guayaba de acuerdo a la norma del Codex alimentario.	38
2.8.2 Clasificación por calibres	39
2.8.3 Clasificación por peso	39
2.9 Cosecha	39
2.10 Empaque	41
2.11 Pre-enfriamiento de productos frescos	42

2.12 Almacenamiento	43
2.12.1 Almacenamiento refrigerado	44
2.13 Tratamientos Poscosecha	46
2.13.1 Tratamientos térmicos	46
2.13.2 Choque Térmico	47
2.13.3 Tratamiento con Calcio	48
2.13.4 Tratamiento con Cloro	49
III. Objetivo General	51
IV. Objetivos Específicos	51
V. Materiales y Métodos	52
5.1 Diagrama general de proceso	52
5.2 Material biológico	53
5.3 Tratamiento fitosanitario con Hipoclorito de Sodio	53
5.4 Tratamiento con solución de Cloruro de Calcio	53
5.5 Tratamiento de inducción de las proteínas de choque térmico	54
5.6 Almacenamiento del fruto de Guayaba	54
5.7 Evaluación de la calidad Microbiológica	55
5.8 Diagrama de la evaluación microbiológica	56
5.8.1 Metodología para determinación de Bacterias Mesofilas Aerobias	57
5.8.2 Metodología para determinación de Hongos y Levaduras	58
5.8.3 Metodología para determinación de Coliformes Fecales	59
5.8.4 Metodología para determinación de Enterococos	60
5.8.5 Metodología para determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	61
5.8.6 Equipo y materiales	63
5.8.7 Medios de Cultivo (Bioxon)	64
5.8.8 Reactivos, Soluciones y Colorantes	65
VI Resultados Y Discusión	67
6.1 Promedio de crecimiento en los tratamientos	67
6.2 Promedio de crecimiento en los diferentes tiempos de almacenamiento	68
VII Conclusiones	70

I. INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras constituyen una parte importante de la dieta del ser humano y se les consideran generalmente como alimentos saludables.

Las frutas y verduras son fuente importante de vitaminas, minerales, ácido fólico, carbohidratos y fibra; gracias a estas propiedades las frutas y verduras favorecen a la disminución de enfermedades crónicas, siempre y cuando estas sean cultivadas, cosechadas y almacenadas apropiadamente; pero si estas contienen pesticidas o fertilizantes no permitidos (o en grandes concentraciones), así como la presencia de microorganismos patógenos, la salud del consumidor podría verse afectada (García Flores, 2005). Es debido a esto que es muy importante la producción de alimentos con calidad e inocuidad.

En la actualidad la inocuidad es considerada una característica fundamental, prácticamente una exigencia, de los alimentos para ser aceptados por el consumidor ya que la inocuidad es la propiedad del alimento de no contener agentes que puedan causar enfermedades a la salud (Castillo Ayala, 2006).

En estudios recientes se ha demostrado que la guayaba es un producto rico principalmente en vitamina C, y en antioxidantes, estos siendo benéficos para la salud del consumidor (Arciga Orozco, 2006).

En la actualidad en nuestro país, el estado de Michoacán sobresale como primer productor de guayaba abarcando el 41% de la producción nacional (Sagarpa, 2005). Sin embargo por la falta de conocimiento sobre la tecnología usada en el cultivo y a las prácticas que obedecen a la propia autogestión del productor, el cultivo es poco rentable.

Los problemas que con mayor frecuencia enfrenta el fruto son daños físicos, enfermedades por varios géneros de microorganismos (Bacterias Mesofilas Aerobias, Coliformes Totales, Enterococcus, *S. aureus*, Hongos y Levaduras), daños directos e indirectos por insectos, daños fisiológicos, daños mecánicos, además del daño por frío cuando el fruto es almacenado a bajas temperaturas (Urueta, 2004). Debido a estos problemas y a la importancia de producir alimentos con inocuidad ha crecido el interés por el uso y mejoramiento de tratamientos poscosecha.

La desinfección es uno de los tratamientos utilizados en poscosecha que tiene la función de eliminar los agentes patógenos y de modificar las condiciones ambientales, ayudando así a la preservación de la salud. El cloro es uno de los agentes desinfectantes más utilizado (Martínez Téllez, 2006).

Estudio previos nos demuestran que los trastornos que con mayor frecuencia son asociados a la deficiencia de calcio en el fruto de manzano incluyen la podredumbre amarga, el corazón acuoso, el pardamiento interno, el desorden por bajas temperaturas y el desquebrajamiento.

Es por esto que el Calcio en fisiología de poscosecha, ha cobrado mayor importancia; siendo el mineral que más influencia tiene sobre el retraso de la senescencia, control de desordenes fisiológicos y efectos sobre

diferentes tipos de patógenos en frutos y vegetales. Logrando así un retraso en la maduración y una mayor vida de anaquel (Shear, 1975).

Una alternativa para reducir el daño por frío y la carga microbiana, es la exposición del fruto previo al almacenamiento a tratamientos térmicos con temperaturas de 38°C a 40°C por un tiempo de 30 -240 minutos, induciendo las proteínas de choque térmico (HSP17 y HSP70). Lo anterior le confiere termotolerancia al fruto inhibiendo el daño por frío prolongando la vida de anaquel (Fuentes López, 2006). Este tratamiento dadas las condiciones de temperatura, puede tener efecto sobre la carga microbiológica del fruto.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la inmersión en cloro, solución de cloruro de calcio y choque térmico sobre la calidad microbiológica del fruto de guayaba.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Importancia de las frutas y verduras

Las frutas y verduras constituyen una parte importante de la dieta del ser humano y se les consideran generalmente como alimentos saludables.

Las frutas y verduras son fuente importante de vitaminas, minerales, ácido fólico, carbohidratos y fibra; gracias a estas propiedades las frutas y verduras favorecen a la disminución de enfermedades crónicas, siempre y cuando estas sean cultivadas, cosechadas y almacenadas apropiadamente; pero si estas contienen pesticidas o fertilizantes no permitidos (o en grandes concentraciones) así como la presencia de microorganismos patógenos, la salud del consumidor podría verse afectada (Serna, 2004).

Por lo tanto en todos los aspectos de la cadena alimenticia - producción, preparación, venta y consumo- se debe aplicar el concepto de inocuidad de alimentos que constituye un factor clave para garantizar la salud de la población.

2.2 Inocuidad

Propiedad del alimento de no contener agentes que puedan causar enfermedades a la salud (Castillo, 2006).

La inocuidad es considerada una característica fundamental, prácticamente una exigencia, de los alimentos para ser aceptados por el consumidor.

2.3 Inocuidad de los alimentos

Es la garantía de que los alimentos no causaran daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan (Codex Alimentarius, 2003)

La inocuidad de los alimentos es un elemento fundamental de la salud pública y un factor determinante del comercio de alimentos. Involucra a varias personas interesadas, entre ellos los productores primarios, los manipuladores de alimentos, los elaboradores y los comerciantes, a lo largo de toda la cadena alimenticia, los servicios oficiales de control de alimentos y los consumidores (<http://www.proamazonia.gob>).

Ningún alimento causa daño, excepto aquellos que contienen sustancias alérgicas o tóxicas que afectan sólo a consumidores susceptibles, que constituyen un peligro para el hombre (Castillo, 2006).

Un peligro para la inocuidad de los alimentos se define como un agente biológico, químico o físico presente en el alimento, o bien la condición en que éste se halla, que puede causar un efecto adverso para la salud (Codex, 2003).

El daño puede ser causado por peligros Biológicos, Químicos y Físicos.

Los Peligros Biológicos pueden ser las plagas (insectos, roedores y aves), microorganismos (bacterias, virus y hongos), procesos fisiológicos.

Los Peligros Químicos son sustancias tóxicas o cualquier otro compuesto cuya presencia en el alimento lo haga peligroso para la salud del público en

general, grupos de población que son particularmente sensibles a ciertos compuestos.

Estos compuestos pueden ser usados en el procesamiento de alimentos pero si son mal usados o usados ilegalmente pueden resultar en un alimento peligroso.

Los Peligros Físicos son objetos capaces de causar daño al consumidor y estos pueden ser fragmentos o piezas de metal, astillas de madera, etc.

La preservación de alimentos inocuos implica la adopción de metodologías que permitan identificar y evaluar los potenciales peligros de contaminación de los alimentos en el lugar que se producen o se consumen, así como la posibilidad de medir el impacto que una enfermedad transmitida por un alimento contaminado puede causar a la salud humana. Todo esto se puede lograrse gracias a la implementación del sistema HACCP.

2.4 HACCP

El sistema HACCP se define como el análisis de riesgos y puntos críticos de control y es la herramienta óptima de trabajo para facilitar y racionalizar las actividades necesarias para garantizar la seguridad de los alimentos. Es además una aproximación sistemática hacia la identificación, evaluación y control de la seguridad alimentaria.

HACCP es un método cuyo enfoque principal debe ser de naturaleza preventiva y dinámica en los diferentes eslabones de la cadena de producción de alimentos. Es un sistema que sirve como un medio efectivo y racional de asegurar la calidad sanitaria de los alimentos en toda la cadena de producción.

Está enfocado a las partes del proceso que generan riesgo, a la prevención más que la inspección, a la seguridad sanitaria del producto no a su calidad. Tiene como objetivo fundamental minimizar o prevenir la posible ocurrencia de riesgos en los alimentos que puedan dañar la salud del consumidor.

La Internatinal Comisión on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) y el Nacional Advisory Committee on the Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) consideran al HACCP un procedimiento natural y sistemático para garantizar la inocuidad de los alimentos e integrado por los siguientes siete postulados:

1. Determinar los riesgos y peligros relacionados con el crecimiento, con la recolección, con las materias primas, con el tratamiento, con la elaboración, con la distribución, con la venta, con la preparación y el consumo del alimento en cuestión.
2. Determinar los PCC necesarios para controlar los riesgos identificados.
3. Establecer los límites críticos que se deben satisfacer en cada uno de los PCC identificados.
4. Establecer los procedimientos para controlar los PCC.
5. Establecer las medidas correctivas a adoptar cuando existe un error identificado mediante el control de un determinado PCC.
6. Establecer sistemas eficaces d mantenimiento de archivos que documenten el plan HACCP.
7. Establecer procedimientos para comprobar que el sistema de HACCP esta funcionando correctamente (inocuidad de los alimentos.....).

2.4.1 Programas pre-requisitos a la aplicación de HACCP

El HACCP es un sistema construido sobre una base firme de componentes cruciales de inocuidad y saneamiento, conocidos como programas prerrequisitos. El interés hacia la calidad e inocuidad de alimentos y el cumplimiento regulatorio relacionado, hace imperativo que toda industria de alimentos establezca, documente y mantenga programas prerrequisitos efectivos, sobre los que se desarrollará y respaldará el sistema HACCP, si se quiere que éste sea exitoso.

El proceso de alimentos reconoce que muchos de los programas prerequisites están basados en Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Procedimientos Operacionales Estándares de Sanitización (POES) listados en el Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos y en el Codex Alimentarius.

Es importante que la efectividad de los programas prerequisites sea evaluada antes que el plan HACCP sea desarrollado.

Los programas prerequisites deben ser establecidos y manejados por separado del sistema HACCP. Además, deben ser documentados y auditados regularmente. Algunos aspectos de estos programas deben ser incorporados en el procesamiento y mantenimiento, para evitar que el equipo falle o se pierda la producción.

Aunque los programas prerequisites son establecidos y manejados por separado de los sistemas HACCP, la existencia de un prerequisite no impide la utilización de actividades específicas dentro de un sistema HACCP.

2.4.2 Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)

Son todas aquellas prácticas que se llevan a cabo en el campo y sirven como base para establecer una adecuada aplicación del sistema HACCP. El implementar las BPA trae consigo las siguientes ventajas:

- Es posible exportar productos a países con altas normas de calidad.
- Aumentar las ganancias por el valor agregado que se les aplica a los productos.
- Previene y minimiza el rechazo de los productos.

- Mejora las condiciones de higiene de los productos.
- Mejora la imagen de los productos.

Para realizar un programa exitoso de BPA es necesario contemplar en primer plano la salud del personal y la higiene en el campo. Es por ello necesario implementar las siguientes recomendaciones:

- Capacitación a todo el personal.
- Programas contra heridas.
- Evitar enfermedades contagiosas.
- Aplicar las prácticas de higiene, entre ellas están:
 - Lavado de manos
 - Uso de letrinas
 - Higiene personal

Las BPA deben incluir programas para prevención de enfermedades que puedan afectar el producto en el campo.

2.4.3 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)

Las BPM son un conjunto de procedimientos, condiciones y controles que se aplican en las plantas empacadoras para minimizar riesgos de contaminación de los alimentos (frutas y vegetales), contribuyendo a la calidad, seguridad alimenticia y a la salud y satisfacción del consumidor.

Las BPM constituyen el pre-requisito más importante del HACCP y el de más amplia cobertura. Las BPM deben implementarse en toda la cadena de producción hasta el consumo final.

Las BPM involucran los siguientes elementos:

- Las instalaciones exteriores e interiores.
- El transporte.
- El almacenamiento.
- La capacitación, salud e higiene del personal.
- Las prácticas de procesamiento.
- Los programas de limpieza y saneamiento.
- El control de plagas.

En México existe el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria ([SENASICA](#)), cuyo objetivo es coadyuvar en la productividad y comercialización de los vegetales y animales, sus productos y subproductos a través de la prevención y control de plagas que los afectan así como regular y promover la aplicación y certificación de los sistemas de reducción de riesgos de contaminación de los alimentos y la calidad de éstos. A través de la utilización del sistema HACCP, Buenas Practicas Agrícolas (BPA) y Buenas Practicas de Manejo (BPM).

Para lograr su objetivo el SENASICA, cuenta con atribuciones contempladas en Leyes y Decretos, Acuerdos en materia de Sanidad Vegetal, Sanidad Animal e Inocuidad Agroalimentaria, que son la base jurídica del órgano desconcentrado. En forma específica aplica la normalización a través de Normas Oficiales Mexicanas que son requisitos y especificaciones de carácter obligatorio, para obtener una condición fitozoosanitaria o un grado óptimo de inocuidad y calidad.

El productor y empacador al poner en practica las BPA, las BPM y al apegar a las normas correspondientes a su producto puede obtener la certificación de la SENASICA, que es un requisito para poder obtener la certificación México Calidad Suprema.

México Calidad Suprema es una asociación civil que busca definir estándares mínimos de calidad en el proceso, con principios de competitividad. Proteger, mantener e incrementar mercados, incrementar ingresos, incrementar demandas y reposicionar a México.

Siendo así, México Calidad Suprema sinónimo de calidad e inocuidad en los productos que certifica.

Por lo tanto el no lograr la certificación ante SENASICA y México Calidad Suprema pone en manifiesto la falta o deficiencia de aplicación del sistema HACCP, BPA, BPM favoreciendo así la posible contaminación del producto, ya sea por peligros físicos, químicos y biológicos.

2.5 Microbiología de frutas y verduras

El origen, características físicas, estructurales, y composición química de las frutas y verduras, son determinantes de su contenido cualitativo y cuantitativo de microorganismos. Todas las plantas poseen una microflora residente que se nutre de trazas de carbohidratos y otros nutrientes disueltos en el agua condensada de la atmósfera o liberada por la misma planta (García Flores, 2005)

La flora microbiana normal de frutas y verduras consiste principalmente de organismos comúnmente encontrados en el suelo. Las bacterias Gram negativas predominan, pero también se encuentran hongos y levaduras en menor cantidad. Aunque hongos y bacterias lácticas con frecuencia pueden ser la mayoría de microflora de las frutas, debido principalmente al pH, que generalmente es menor a 4.0 (Serna Villagomez, 2004).

En gran medida la flora microbiana de frutas y verduras refleja la del medio ambiente en el cual se desarrollan. Es de esperar mayor carga microbiana en aquellas que se localizan sobre o por debajo de la tierra que en las que se generan alejadas del suelo (Fernández Escartín, 2000).

Las frutas y verduras contaminadas con tierra poseen una flora bacteriana compuesta principalmente de microorganismos de dicho substrato que tienen la capacidad de competir mucho mejor que otros microorganismos en ese substrato en particular (Vanderzant y Splittoesser 1992).

Las frutas y verduras presentan barreras que previenen la penetración de los microorganismos y el subsiguiente desarrollo en su interior (Madden, 1992). En general los tejidos internos de las frutas y verduras se consideran estériles (Luna, 1992). En condiciones naturales las bacterias pueden penetrar aunque en bajos números, como resultado de la infiltración a partir de daños mecánicos. Cuando la superficie de los tegumentos, es perforada o rota por insectos o daño mecánico; levaduras y mohos naturalmente presentes en la cutícula, pueden rápidamente desarrollar ante la abundancia de nutrientes disponibles que son liberados de los tejidos. Lo mismo puede ocurrir con la penetración y desarrollo de microorganismos patógenos (Beuchat, 2002). Causando así un deterioro en la fruta ocasionado por la penetración de microorganismos patógenos.

2.5.1 Deterioro microbiano de frutas y verduras

Este deterioro puede obedecer a los procesos fisiológicos propios de sus tejidos. El deterioro por actividad microbiana se presenta durante la precosecha o en el producto cosechado. La cutícula, cáscara o testa intactas que cubren frutas y verduras, y adicionalmente una capa cerosa externa, son una barrera importante contra la penetración y a veces, la colonización microbiana. La pérdida de integridad abre el camino de los microorganismos a las partes internas, hasta entonces libres de ellos (García Flores 2005).

Las frutas y verduras son susceptibles de deterioro por hongos, levaduras y bacterias, con alto predominio de los hongos. En las verduras tienen mayor importancia las Gram negativas.

Debido al bajo pH que generalmente muestran las frutas (menor de 4.5), su alta acidez y contenido de azúcar; los hongos y las levaduras son agentes deterioradores más activos que las bacterias. Dichos factores y la presencia de sustancias bactericidas propias de las frutas, tienden a destruir algunas bacterias. En el caso de las verduras el pH suele ser mayor de 4.5; presentan alto contenido de carbohidratos y baja acidez, por lo que las bacterias que generan podredumbre son más comunes (Serna Villagomez, 2004).

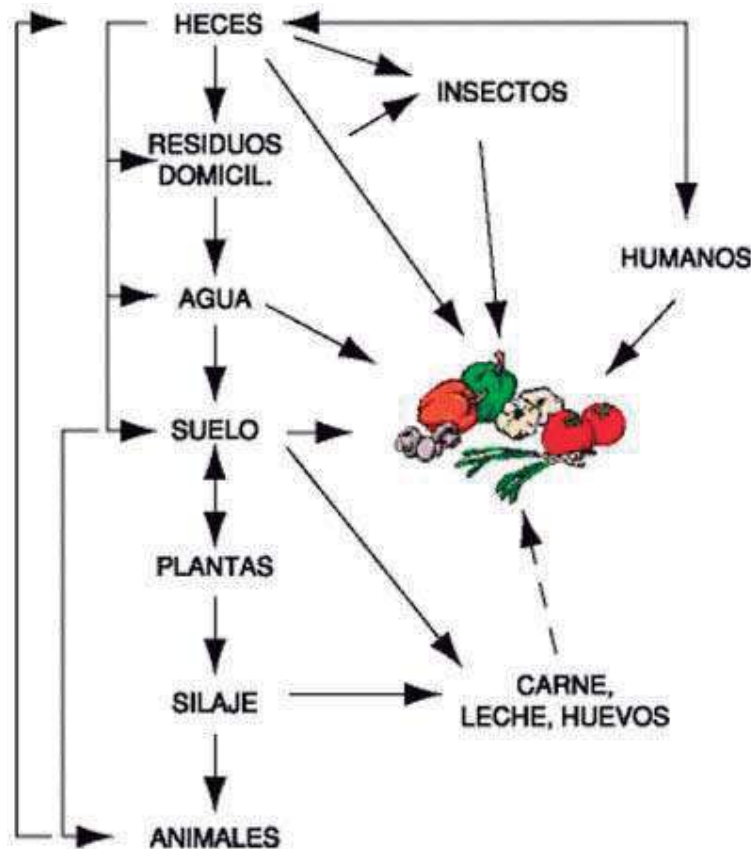
2.5.2 Microorganismos patógenos en frutas y verduras

Aunque bacterias deterioradoras, levaduras y mohos dominan la microflora de frutas y verduras, la presencia ocasional de bacterias, parásitos y virus patógenos también se pueden presentar.

Algunas frutas y verduras comúnmente utilizadas en la preparación de ensaladas, llegan a albergar diversos patógenos de gran importancia que afectan la salud pública, que provienen de su exposición a una amplia variedad de condiciones durante el crecimiento, cosecha y distribución del alimento (Brackett 1999, Beuchat 2000).

La tierra parece ser la responsable de la mayor contaminación microbiana en frutas y verduras, como se ha sido evidenciado por el aislamiento de bacterias residentes del suelo. Especialmente si desechos animales y humanos y agua contaminada se utilizan en la fertilización e irrigación. Estos incluyen *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* (Bibek, 1996).

Las superficies de tejidos magullada y cortadas, exudan fluidos que contienen nutrientes, fitoalexinas y otros antimicrobianos. Estos compuestos pueden aumentar o retardar el desarrollo natural de la microflora incluidos los patógenos.



Mecanismos mediante los cuales las frutas y hortalizas se pueden contaminar con microorganismos patógenos (Adaptado de Harris, 1998).

2.5.3 Sobrevivencia

La sobrevivencia y/o desarrollo de un patógeno en un producto crudo o minimamente procesado, esta determinada por su capacidad metabólica. La manifestación de estas capacidades depende de las condiciones ecológicas presentes, naturales o impuestas, durante todo el proceso de producción, almacenamiento y distribución; así como de factores intrínsecos al alimento (naturaleza del epitelio y de la cutícula protectora, nutrientes disponibles, pH de tejido, actividad de agua, presencia de sustancias antimicrobianas) y de los microorganismos (numero y tipo, adaptación al substrato, estado fisiológico y asociaciones microbianas) y de factores extrínsecos (temperatura, composición de la atmósfera y humedad relativa) (Fernández Escartín, 2000).

Debido a la importancia económica y a los grandes beneficios que tiene el fruto de guayaba sobre la salud del consumidor, es que surge el interés por producir frutos inocuos. Esto debido a que el estado de Michoacán sobresale como primer productor de guayaba, abarcando el 41% de la producción nacional.

2.6 Guayaba

Nombre Científico: *Psidium guajava*

Familia: Myrtaceae

La guayaba es un cultivo originario de la América Tropical, actualmente se encuentra muy difundido en todo el mundo, pero los principales productores son India, Brasil, México, Sudáfrica, Jamaica, Kenya, Cuba, República Dominicana, Puerto Rico, Haití, Colombia, Estados Unidos (Hawaii y Florida), Taiwán, Egipto y Filipinas.

La forma del fruto depende de la variedad, lo mismo que el color de la pulpa y la cáscara, los hay redondos como pelotas y ovalados en forma de pera. La madurez se observa en la cáscara cuando alcanza un color verde amarillento, o amarillo rosado.

En general, los atributos de un buen cultivar comercial de guayaba son:

- Buen tamaño, más de 7 cm. de diámetro.
- Rendimiento consistente de 40 - 60 Tm/Ha
- Sabor y aroma agradables.
- Ligeramente ácida y dulcificada.
- Textura delicada y sabrosa, con pequeñas celdas.
- Cáscara fina, con semillas pequeñas.
- Pulpa color rosado profundo (Rica en vitamina A).
- Aproximadamente 9 - 12% de sólidos solubles.
- Resistente a plagas y enfermedades.

2.6.1 Principales enfermedades que atacan a la guayaba

Los Hongos son los patógenos que mas atacan a la especie y sus daños se presentan desde las raíces hasta el fruto. Se sabe que su presencia es común en nuestro país.

Entre las enfermedades que son causadas por hongos se encuentran las siguientes:

Falta de humectación. Se produce por no utilizar suelo esterilizado con la semilla, sin embargo se manifiesta principalmente en tallos y hojas y la plantita se marchita, los síntomas aparecen en el tallo, sobre la línea del suelo como lesiones de color café oscuro, una vez infectada, la planta muere a los tres días, es causada por el hongo *Rhizoctonia solani* y se controla mediante esterilización del suelo.

Pudrición por *Sclerotium*. Afecta a la planta de 3 - 6 semanas de edad y causa una mortalidad del 25%, la plantita se marchita y muere en la funda del vivero, es causada por el hongo *Sclerotium rofsii*.

Phytophthora Foliar. Aparece como pequeños lunares en las hojas jóvenes hasta expandirse a toda la hoja y marchitarla, es causada por el hongo *Phytophthora nicotianae* y se desarrolla a temperaturas entre 15 y 35°C.

Pudrición por nemátodos. Causa grandes pérdidas a los productores ya que afecta a los árboles de plantaciones viejas (más de 7 años), se presenta como síntomas generales de daño, mal rendimiento de la planta, enanismo, falta de vitalidad y frutas no comerciales en absoluto, se ha identificado al

nemátodo *Meloidogyne incognita*, y la presencia de esta diminuta plaga es revelada por raíces anudadas en hospederos sensibles.

Raíz blanca. Las raíces de los árboles enfermos se tornan blancas, luego cafés, hasta que sobreviene la muerte de la planta, a los pocos días, el causante es el hongo *Rigidoporus lignosus*, niveles bajos de pH estimulan la proliferación de un hongo antagónico: *Trichoderma koningii*.

Enfermedad rosada. Se la reconoce por la incrustación de un hongo rosado en las ramitas, hongo rugoso y disperso, mata a la ramita y a las hojas, es causada por el hongo *Corticium salmonicolor*.

Antracnósis. Es con mucho, la enfermedad más destructiva y extendida contra la guayaba, ataca a la fruta madura y se manifiesta con la presencia de cráteres en la cobertura, el hongo causante es *Colletotrichum gloesporoides*, para su control se deben eliminar los frutos y ramitas infectados, eliminar la maleza para evitar la humedad y permitir la respiración del tronco, la infección poscosecha se controla almacenando la guayaba a bajas temperaturas (5 - 8°C).

Lasiodiplodia. Afecta principalmente a la fruta madura, la fruta se vuelve café necrótica a partir de su base, la pulpa se decolora y se vuelve suave y aguada, el causante es el hongo *Lasiodiplodia theobromae* ingresa a la fruta por las heridas de esta, se lo puede controlar con insecticidas o por irradiación.

Phytophthora de la fruta. Comienza como pequeñas manchas hasta tomarse toda la superficie de la fruta dentro de 14 días, la lesión parece cubrirse con un manto algodónado, es causada por el patógeno *Phytophthora*

nicotianae, el mismo que ataca a las plantas en el invernadero, se disemina a través del agua o por la acción de insectos.

2.6.2 Plagas que atacan a la Guayaba

A parte de la mosca de la fruta, hay muchas clases de plagas que atacan a la guayaba, sin embargo, la fruta los tolera, en cantidades razonables, con la inmersión en agua caliente suelen desaparecer sus efectos, sin embargo, hay que tener en cuenta que para el mercado internacional, es necesario eliminar todo vestigio de ataque de mosca de la fruta, lo que se logra desde la huerta y luego en el tratamiento poscosecha.

La mosca de la fruta (Díptera: Tephritidae)

La especie más común que infesta a la guayaba es *Dacus Dorsalis* o la *D. cucurbitae* y *D. pedestris*, aunque estas últimas en menor escala. En la práctica es difícil diferenciar la punsación por la que la mosca ha ovopositado de otras por enfermedad, a menos que se sepa exactamente que es lo que se busca. Los huevos se desarrollan en tres días y las larvas crecen dentro de la fruta, y están asociadas con la necrosis de la fruta, en estado larvario permanece de 8 a 9 días, luego de los cuales la larva abandona la fruta para pupar en el suelo y la mosca emerge luego de 10 días y alcanza su madurez sexual después de varios días, el ciclo total dura 22 días.

Suele ser muy efectiva la recolección y destrucción (no botarlas al suelo) de las frutas infestadas aunque esta medida pierde eficacia si en las huertas vecinas tenemos potenciales hospederos.

Además de la mosca de la fruta, la guayaba puede ser atacada por Mirídios (Hemíptera: Miridae) de la especie *Helopeltis theobromae* y atacan a la fruta antes de maduración y le causan la aparición de cráteres negros y evidencia empírica indica que su ataque se intensifica durante la estación lluviosa.

Entre los thrips (*Thysanoptera: Thripidae*) las especies que atacan a la guayaba son: *Selenothrips rubrocinctus* y *Scirtothrips dorsalis*.

Los insectos chupadores de la familia *Pseudococcidae* pueden dañar a la fruta volviendo rugosa su piel, estos infestan a las plantas especialmente en la época seca y la mejor forma de proteger a la fruta es envolviéndola.

No es común que bacterias dañen a la especie, pero dependiendo de la manipulación que se realice del fruto ya sea en cosecha o poscosecha, este puede llegar a contaminarse y generar así microorganismos indicadores de contaminación.

2.7 Grupos microbianos indicadores en los alimentos

En los alimentos existe una gran diversidad de microorganismos. La composición cualitativa y cuantitativa está determinada por diversos factores.

La diversidad de microorganismos permite agruparlos en función de la actividad o potencialidad que exhiben de manera más prominente en los alimentos. Eventualmente algunos se encuentran en más de un grupo.

Grupos de microorganismos en los alimentos

1. Indicadores
2. Deterioradores
3. Patógenos
4. Iniciadores
5. Flora indiferente

La actividad microbiana en los alimentos propicia en muchos su deterioro. El discreto desarrollo de ciertos géneros o especies puede acompañarse de cambios sensoriales notables en un producto. El desarrollo profuso de otros, eventualmente pasa desapercibido.

2.7.1 Microorganismos indicadores

Se califican de indicadores aquellos que sugieren o se asocian con un antecedente que compromete su calidad sanitaria. Por ejemplo, en el alimento:

Pone en evidencia una exposición a la contaminación fecal o animal, sugieren que se han dado facilidades para que ocurra o esté ocurriendo algún grado de actividad microbiana, constituyen evidencia de contaminación posterior a la aplicación de tratamientos térmicos, su concentración y los productos de su metabolismo indican falta de frescura y son indicadores de un riesgo potencial a la salud (Fernández Escartín 2000).

Los grupos microbianos indicadores de mayor aplicación en los alimentos son las bacterias mesófilas aerobias, los organismos coliformes, los coliformes fecales, la *E. coli*, los hongos y levaduras, las bacterias psicrótofas, los termodúricos, los termófilos, los proteolíticos y los lipolíticos, los osmotolerantes y los acidúricos.

2.7.2 Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)

Las bacterias mesófilas aerobias son bacterias que necesitan Oxígeno para crecer, y una temperatura de entre 20°C a 42°C para su desarrollo óptimo.

Los microorganismos que forman parte de este grupo son muy heterogéneos. Se incluyen en él a todos aquellos que muestran capacidad para formar colonias visibles en las condiciones de ejecución de la prueba (medio de cultivo, y tiempo y temperatura de incubación). Es evidente que en una situación particular podrían quedar incluidos microorganismos patógenos. Entre otras designaciones usuales para esta prueba se incluyen la cuenta total viable, cuenta estándar en placa, cuenta total aeróbica. Una proporción, a veces significativa de la población total de bacterias en el producto, no aparecerá en las placas. Las razones son: tensión de oxígeno en la atmósfera, temperatura de incubación, composición del medio de cultivo, efecto antagónico entre los microorganismos, e incluso el tiempo de incubación, son factores que no tienen la misma influencia para todos los gérmenes presentes.

El proceso de multiplicación microbiana se mantiene activo a una tasa que varía según la naturaleza del microorganismo y las condiciones ecológicas prevalentes (temperatura, humedad relativa, cambios en la composición de medio resultantes de la actividad de un microorganismo que afectan el desarrollo de los vecinos). Al cabo de 72h el número de colonias visibles se ha incrementado notablemente.

El recuento de bacterias mesófilas aerobias tendrá significado sólo a condición de que se definan las condiciones bajo las cuales se ha ejecutado la técnica de análisis. De ahí la designación de métodos estándar de análisis que se aplica al referirse a tales técnicas.

El recuento de BMA en el agua, alimentos y otros materiales relacionados puede tener, según el caso, algunas aplicaciones de interés que pondrían de manifiesto:

La exposición a fuentes de contaminación.

El exponer un producto a materiales o ambiente son estériles, lleva implícita la posibilidad del ingreso de microorganismos. Se trata de un proceso inconveniente por las repercusiones que puede tener en la inocuidad o frescura del alimento. El conocimiento de un incremento en el contenido de BMA de un alimento, permite establecer que se ha violado una norma de trabajo de antemano considerada inaceptable.

Las condiciones de almacenamiento.

Conforme la temperatura de un alimento se acerca a los 20 - 40°C se favorece el crecimiento de flora microbiana enmarcada dentro de las BMA. Si esta condición se prolonga, el alimento mostrara más y más elevada población bacteriana.

El elevado número de BMA en un alimento admite tres interpretaciones: una exposición intensa a la contaminación, una discreta contaminación seguida de condiciones de conservación que favorezcan la actividad microbiana, o ambas, es decir, intensa contaminación y almacenamiento inadecuado.

El nivel de frescura.

La pérdida de la frescura de un alimento implica la actividad de microorganismos (excluidas las causas físicas y químicas del deterioro), es decir un incremento en su número.

Es de esperar en general, alguna pérdida de la frescura en los alimentos que muestran cifras elevadas.

La eficacia de tratamientos antimicrobianos. Durante la preparación y procesamiento de los alimentos suelen aplicarse tratamientos expresamente diseñados (o que tienen el efecto) para abatir la carga microbiana. El recuento de BMA se utiliza en muchos casos para evaluar su eficiencia.

La predicción de la vida de anaquel. En algunos casos el conocimiento del contenido de BMA en un alimento perecedero tiene significado para estimar el tiempo, que bajo condiciones definidas de almacenamiento, habrá de transcurrir antes de que se presenten signos de deterioro. Las condiciones pueden referirse a la temperatura, pH, actividad de agua inicial, composición de la atmósfera y otras. Esto no obliga que sea precisa y necesariamente el grupo de BMA como tal, quien constituya la base para determinar la condición de deterioro.

2.7.3 Coliformes Totales

Organismos Coliformes

Los organismos Coliformes se definen como bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas de incubación a 35°C. Es una definición totalmente convencional que pretende involucrar bacterias de hábitat típicamente intestinal (*Escherichia coli*). El grupo no se configura a base de géneros microbianos, sino de cepas que en el desarrollo de la prueba cumplen con la definición.

La presencia de coliformes en muchos alimentos, especialmente aquellos que han recibido tratamiento térmico, sugiere contacto con materiales sucios.

Las bacterias más prominentes del grupo pertenecen a géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que fermentan la lactosa: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*.

La *Escherichia coli* es el típico coniforme en el sentido de que se trata de una bacteria cuyo hábitat natural es el contenido intestinal de los animales de sangre caliente.

Su hábitat natural es el contenido intestinal del hombre y animales superiores. Debido a su capacidad de sobrevivencia y gran potencial para desarrollar en la materia orgánica, pueden recuperarse de una diversidad de sustratos extraintestinales: piel humana y de animales, vegetales,

insectos, aguas superficiales, tierra y de hecho, cualquier material que entre en contacto con ellos.

Su desarrollo se suprime fuera de los siguientes límites: pH entre 4.0 y 8.5, temperatura entre 4 y 46°C, o actividad de agua menor de 0.935.

La presencia de coliformes en los alimentos resulta de su exposición al medio ambiente y a las posibilidades de desarrollo que encuentran en tales sustratos. Su hallazgo en un alimento no involucra necesariamente a la materia fecal.

Los coliformes en los alimentos tienen un significado diferente al que reciben en el agua. Esto radica en su capacidad para multiplicarse en los alimentos, a la operación de fuentes no fecales de contaminación y a la presencia de coliformes residuales en el equipo y utensilios mal saneados en servicios de alimentos.

El recuento de coliformes puede efectuarse por la técnica del número más probable (NMP) o por la técnica de vaciado en placa. La de NMP es mucho más sensible que la de vaciado en placa.

Coliformes Fecales

Este grupo se refiere a aquellos coliformes que tienen capacidad para fermentar la lactosa con producción de gas a temperaturas de 44 - 45°C. Excepto este señalamiento, los coliformes fecales se identifican con el resto de los coliformes en lo que se refiere a su resistencia al medio ambiente, agentes químicos y factores que favorecen o impiden su desarrollo.

2.7.4 Enterococos

Las especies en el género de *Enterococcus*, incluyen *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. durans* y *E. gallinarum*. Los dos primeros se consideran en general como los típicos enterococos (Stiles, 1989).

Las bacterias del grupo de enterococos en su conjunto consisten en células esféricas u ovoides notablemente más robustas que los micrococos y estafilococos, de 0.6 a 2.0 x 0.6 a 2.5 mm dispuestos en pares o cadenas cortas. Son inmóviles (aunque *E. casseliflavus* y algunas cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* son móviles) y carecen de cápsula. Catalasa negativos y anaerobios facultativos. El pH final al fermentar carbohidratos es de 4.2 - 4.6. Desarrollan a 10 y a 45°C, a pH de 9.6 y en presencia de bilis al 40%, o de NaCl al 6.5%. De particular interés es su carácter termodúrico, lo que también lo distingue de otros cocos gram positivos. Algunas cepas de *E. faecium* forman bacteriacinas contra patógenos como *L. monocytogenes*. Los enterococos toleran bien márgenes amplios de pH para desarrollar.

El grupo es común en el contenido intestinal del hombre y animales de sangre fría o caliente, pero también en vegetales e insectos. No es extraño, que aunque con baja frecuencia, se aíslen de la tierra.

Su resistencia relativamente alta a condiciones extremas del medio ambiente (pH, temperatura y salinidad), se consideran ventajas aplicables para conocer los antecedentes sanitarios de los alimentos tratados con calor, congelados, salados con respecto a los coliformes.

Los enterococos exhiben una resistencia muy semejante a los virus ante factores físicos como la congelación y la desecación, lo que permite una aplicación potencial como medio indicativo de la eliminación de tales agentes en el agua, alimentos y superficies inertes.

Los enterococos se consideran patógenos oportunistas; se les aísla de casos de endocarditis.

El recuento de los enterococos puede realizarse por la técnica de vaciado en placa utilizando el medio agar Streptococcal KF comercial; las colonias de enterococos aparecen de color rojo o rosado.

Puede concluirse que la presencia de enterococos en los alimentos no guarda relación confiable con su exposición a la materia fecal humana o animal. Sin embargo, sí un posible significado como indicador de prácticas no sanitarias en el manejo de los alimentos.

2.7.5 Hongos

La presencia de hongos y levaduras en los alimentos suele asociarse con una exposición a fuentes de contaminación objetables; cifras elevadas son propias además, de alimentos faltos de frescura. Esto tiene mayor validez en ciertos alimentos, especialmente entre los que han sido sometidos a un proceso industrial.

Las levaduras que desarrollan preferentemente a una baja Aa condicionada por la presencia de azúcares se califican de osmófilos. En el caso de los hongos, se habla de xerófilos. Con frecuencia se utiliza esta última designación para referirse a unos y otros.

Algunos hongos muestran una especial resistencia al calor. Producen ascosporas que les permite sobrevivir en alimentos sometidos a tratamientos térmicos severos (más de 90°C por 15 minutos o más); su posterior desarrollo da lugar a procesos deteriorativos a veces muy pronunciados.

Las infecciones micóticas en el hombre aparentemente no están asociadas con el consumo de alimentos contaminados con hongos. Sin embargo, se han observado que ciertos patógenos son capaces de proliferar en algunos alimentos: *Cryptococcus neoformans* en durazno, *Candida parapsilosis* en productos cárneos y mantequilla y *Sporotrichum schenkii* en salchichas.

Existen medios de cultivo para los hongos según el propósito del estudio (recuento, aislamiento, identificación, producción de toxinas) y algunos específicos para algunos géneros.

El agar papa dextrosa (APD), es un medio simple general para hongos y levaduras con aplicación en la microbiología de los alimentos. La inhibición de las bacterias se logra acidificando con ácido tartárico hasta pH 3.5; si la acidez interfiere con el desarrollo de algunos hongos, se sustituye la acidificación por la incorporación de ampicilina (50 mg/ml).

2.7.6 Levaduras

La expresión del desarrollo de las levaduras en los alimentos se distingue del observado por los hongos. Las levaduras pueden proliferar en la masa interna del alimento (sólido como los quesos, o líquidos como los jugos de frutas). Los hongos se limitan a la superficie, visiblemente distintivos sin necesidad de aumento alguno.

La mayoría de las levaduras desarrollan bien en aerobiosis; los tipos fermentativos prosperan en aerobiosis. Los límites de temperatura para su multiplicación varían desde algo menos de 0°C hasta menos de 47°C. Muestran capacidad para crecer en niveles de pH muy ácidos.

Los efectos de las levaduras en los alimentos incluyen: producción de turbiedad, espuma, película, gasificación, cambios de color, malos olores, mucosidad o formación de sedimentos.

2.7.8 *Staphylococcus aureus*

Es un típico indicador de contaminación humana en aquellos que han sido objeto de tratamiento térmico. Se le reconoce como un patógeno oportunista.

Células esféricas gram positivas de 0.8 a 1.2 micras de diámetro. No esporula ni es móvil. Produce catalasa y otras enzimas algunas relacionadas con la patogenicidad; tienen utilidad para su identificación en el laboratorio o sugieren un potencial enterotoxigénico: lipasa, fibrinolisisina, hemolisina, gelatina, coagulasa, fosfatasa, lecitinasa, termonucleasa, leucocidina, colagenasa, estafiloquinasa, hialuronidasa. La síntesis de estas enzimas es extensiva para todas las cepas de *S. aureus*.

Típicamente *S. aureus* produce la enzima termonucleasa, capacidad no limitada a esta especie. Es práctica aplicarla como un recurso de identificación, especialmente si se acompaña de la prueba de coagulasa

Muestra un metabolismo fermentativo (cuyo producto final es principalmente el lactato) y respiratorio. En este último caso los principales productos finales son acetato, CO₂ y 5 - 10% de lactato. Posee marcado poder proteolítico sobre la hemoglobina, fibrina, clara de huevo, caseína y gelatina (Romero Cabello 2001).

Si bien el estafilococo es una bacteria típicamente parasitaria, su capacidad para sobrevivir a la desecación le permite contaminar los materiales expuestos al medio ambiente.

La fuente de contaminación de los alimentos por *S. aureus* suele ser el hombre, en ocasiones el origen animal es bien definido. La situación más común y peligrosa es la mastitis en el ganado lechero, sea subclínica, crónica o aguda.

S. aureus se comporta como un mesófilo con una temperatura óptima de 37°C.

S. aureus resulta afectado cuando se expone a la acción de diversos agentes físicos y químicos, pero en general es algo más resistente que la *Enterobacteriaceae* en su conjunto. El daño puede alcanzar un nivel subletal, sin embargo con evidente sobrevivencia, pero las células no destruidas mostrarán una hipersensibilidad a la acción de otros agentes ante los cuales (bajo condiciones ordinarias) son manifiestamente tolerantes. No es una bacteria termodúrica; la resistencia a los tratamientos térmicos es más bien precaria.

S. aureus se recupera fácilmente a partir de alimentos crudos de origen animal o cocinado, especialmente entre aquellos que requieren manipulación estrecha por su preparación.

Posee una notable capacidad para proliferar en diversos alimentos. Bajo condiciones propicias la tasa de crecimiento conduce a la concentración de suficiente enterotoxina para provocar brotes de gastroenteritis severos. Algunos productos cárneos, ciertos vegetales, lácteos y alimentos cocinados funcionan como medios excelentes para sostener su multiplicación. Aun que no todos los alimentos constituyen un sustrato favorable para el desarrollo del microorganismo, algunos resultan inhibidores.

El medio de Baird Parker es excelente para el recuento de *S. aureus* incluso si se trata de células que sufrieron algún tipo de daño no letal. Las colonias presentan un aspecto característico, negras y con un halo transparente que revela la actividad lipolítica sobre la yema de huevo. Las colonias deben confirmarse mediante examen de frotis teñido con coloración de gram a partir de un cultivo fresco.

2.8 Manejo poscosecha

El manejo eco-agronómico determina la calidad de la fruta, el momento de la cosecha, el procedimiento de cosecha y el manejo poscosecha son importantes para asegurar que se mantenga la calidad de la fruta.

Las pérdidas poscosecha pueden alcanzar porcentajes altos debido a un inadecuado manejo y almacenamiento, además de las desventajas del clima tropical, que acelera la maduración y el envejecimiento, además del ataque de microorganismos y la proliferación de agentes biodeteriorantes.

2.8.1 Clasificación de la guayaba de acuerdo a la norma del Codex alimentario (1999)

La clasificación y criterios de calidades se determinan por su aspecto, color, tamaño y estado fitosanitario, el peso promedio esta entre 100 y 165 gr.

La guayaba se clasifica en tres categorías:

* Categoría Extra.

Las guayabas deberán ser de calidad superior y características de la variedad y/o tipo comercial. No deberán tener defectos, salvo defectos superficiales muy leves, siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, su calidad, estado de conservación y presentación del envase.

* Categoría I.

Las guayabas deberán ser de buena calidad y características de la variedad y/o tipo comercial. Podrían permitirse, sin embargo, los siguientes defectos leves, siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, su calidad, estado de conservación y presentación en el envase:

- Defectos leves de forma y color
- Defectos leves en la cáscara provocados por rozaduras y otros defectos superficiales, tales como quemaduras producidas por el sol, manchas y costras, que no superen el 5 por ciento de la superficie.

En ningún caso los defectos deberán afectar a la pulpa del fruto.

* Categoría II.

Esta categoría comprende las guayabas que no pueden clasificarse en las categorías superiores, pero satisfacen los requisitos mínimos especificados anteriormente. Podrán permitirse los siguientes defectos, siempre y cuando las guayabas conserven sus características esenciales en lo que respecta a su calidad, estado de conservación y presentación:

- Defectos de forma y color
- Defectos de la piel debidos a rozaduras u otros defectos, tales como quemaduras producidas por el sol, manchas y costras que no superen el 10 por ciento de la superficie total.

En ningún caso los defectos deberán afectar a la pulpa del fruto.

2.8.2 Clasificación por calibres

El calibre se determina por el diámetro de la parte central del fruto, conforme a la tabla siguiente:

Letra de referencia	Diámetro en mm
A	>54mm
B	43-53mm
C	30-42mm
D	<29mm

2.8.3 Clasificación por peso

La fruta también puede ser clasificada de acuerdo a su tamaño en las siguientes calidades: Segunda, Primera y Extra.

Categoría	Peso en g.
Extra	>100g
Primera	75 a 100g
Segunda	50 a 75g

2.9 Cosecha

La Guayaba es cosechada cuando está maduras (cambio de color de verde a verde claro, este cambio ocurre de 90 a 150 días luego de la floración).

Muchos agricultores utilizan el tamaño de la fruta como índice de madurez (este no es un método aconsejable), otros índices pueden ser:

- Determinación del peso ideal mediante flotación, basados en la premisa de que conforme madura la fruta, acumula materiales secos que la vuelven más densa.
- Determinación del grado de suavidad de la fruta.
- Métodos más sofisticados como la determinación de la acidez, la cual es inversamente proporcional a la madurez de la fruta y la determinación del contenido de azúcar o contenido de sólidos solubles, los cuáles se incrementan conforme madura la fruta, esto se determina usando un refractómetro calibrado.

Las frutas son recolectadas manualmente y se les coloca dentro de gavetas de plástico, de bambú o madera, lo más recomendable es usar recipientes plásticos.

2.10 Empaque

El principal objetivo del empaque de alimentos es proteger los productos del daño mecánico, de la contaminación química, microbiana, del oxígeno, el vapor de agua y la luz, en algunos casos. El tipo de empaque utilizado para este fin juega un papel importante en la vida del producto, brindando una barrera simple a la influencia de factores, tanto internos como externos (www.angelfire.com).

Existe una tendencia a culpar al empaque inadecuado de los altos niveles de deterioro, sin antes llevar a cabo un análisis detallado de toda la cadena de la manipulación y mercadeo. Allí donde las pérdidas son demasiado altas es poco probable que el cambio de envase de como resultado alguna disminución significativa, si no se mejoran al mismo tiempo las técnicas de cosecha, la manipulación en el campo, clasificación de calidad y sistema de transporte. Por lo tanto, deben introducirse nuevos tipos de envases para mejorar las técnicas de manipulación a lo largo de toda la cadena de mercadeo (<http://www.fao.org/docrep/x5055S/x5055S01.htm#Prólogo>).

En el caso de la guayaba, esta se debe empacar en cajas de madera o de plástico con capacidad de 12Kg para garantizar la calidad del fruto.

2.11 Pre-enfriamiento de productos frescos

Una vez que el producto entra a la bodega con frío, irradiará calor hacia el interior debido al calor que trae del campo y a la respiración. Mientras más pronto el producto alcance su temperatura óptima de almacenamiento, más pronto estará bajo control la respiración, lográndose la máxima vida de almacenamiento del producto.

El tiempo que demora el producto en alcanzar la temperatura óptima de almacenamiento (tiempo de enfriamiento) dependerá de la capacidad total de refrigeración del equipo y de la velocidad del aire que pasa por el evaporador y el producto, asumiendo que existe libre circulación del aire alrededor del mismo.

La reducción de la temperatura bajo estas condiciones será lenta y también se reducirá lentamente el ritmo de la respiración propiciando un deterioro en el fruto. Se han ideado varios métodos de pre-enfriamiento para disminuir rápidamente la temperatura de los frutos antes de introducirlos en una bodega refrigerada para el almacenamiento prolongado, entre ellos se encuentran: enfriamiento mediante circulación forzada de aire, Enfriamiento por agua y Enfriado al vacío,

Una vez que el producto ha sido enfriado a la temperatura requerida debe ser trasladado tan rápidamente como sea posible a una bodega diseñada específicamente para almacenamiento.

2.12 Almacenamiento

Dada la importancia económica del fruto, es de gran interés aumentar su periodo de comercialización garantizando su abastecimiento para su consumo. La prolongación puede lograrse controlando el proceso y los cambios que acompañan al envejecimiento o senectud.

La vida de almacenamiento es el periodo máximo durante el cual el producto permanece apto para su comercialización y no el periodo de envejecimiento total o deterioro.

Los frutos de guayaba pueden ser almacenados bajo distintas tecnologías, entre ellas se encuentran: atmósferas controladas (CA), atmósferas modificadas (MA) y refrigeración.

La respiración de todos los productos vegetales aumenta con la temperatura, razón por la cual, las técnicas de almacenamiento buscan reducir la temperatura del producto. Las bajas temperaturas del almacenamiento además tienen la ventaja que reducen la pérdida de agua del producto y la transpiración. La humedad relativa alta mejora la vida de almacenamiento del producto. Las bodegas deberían mantenerse idealmente a la mayor humedad relativa (H.R.) que el producto pueda tolerar. Aunque el 100% de H.R. impediría totalmente la pérdida de agua, rara vez puede ser mantenida porque los organismos causantes de enfermedades se desarrollan rápidamente a una H.R. del 100%, la condensación que da origen a un mayor deterioro, puede ser causado fácilmente por ligeras fluctuaciones de la temperatura a una H.R. cercana al 100%.

Una de las consecuencias que se provocan por el almacenamiento a bajas temperaturas es el daño por frío, el cual en muchas especies de origen tropical y subtropical sufren daño al ser expuestas a bajas temperaturas (0-15°C). El daño por frío depende de la temperatura de exposición, el tiempo de exposición y la sensibilidad de las especies a las temperaturas de refrigeración (Kays, 1991).

La mayor incidencia de este desorden se presenta cuando la fruta se almacena a temperaturas entre -3 °C y 5 °C por más de un mes. Los síntomas externos del daño por frío incluyen una coloración parda de la piel y "pitting", y un aumento a la susceptibilidad a la descomposición. (<http://agronomia.uchile.cl/centros/USEP/Granado/enfermedadespostcosecha.htm>)

2.12.1 Almacenamiento refrigerado

La conservación de la fruta se basa principalmente en reducir la actividad metabólica del producto; con esto se logran efectos en localidad como el atrasar el proceso solubilización de las pectinas o es decir el ablandamiento del fruto, la degradación de ácidos y clorofila evitando la degradación del color verde, amarillento y los desordenes relacionados con la senescencia del tejido. La refrigeración es fundamental para lograr lo anterior, ya que los procesos metabólicos asociados a la respiración se reducen y el tiempo de conservación se prolonga.

Durante el almacenamiento prolongado es importante que el aire de la bodega circule bien, pero a baja velocidad, de manera que la transpiración y la pérdida de agua del producto se mantenga al mínimo.

La temperatura de la bodega y por lo tanto del producto almacenado debe ser vigilada y mantenida cuidadosamente y lo mismo debe hacerse con la humedad relativa, la cual debe elevarse si fuera necesario. La ventilación es vital para impedir la acumulación de dióxido de carbono y etileno y la disminución del oxígeno hasta niveles perjudiciales.

Los productos deben estibarse de modo que no dificulten la circulación, ya que ello podría permitir la formación de áreas localizadas en donde se acumula el calor (focos de calor) lo que propicia el deterioro prematuro del producto. Además esto permite la inspección periódica durante el almacenamiento y por lo tanto, la eliminación del producto infectado, sobre maduro o deteriorado, y si fuera necesario sacarlo.

Para la guayaba es recomendable almacenar el fruto a una temperatura de 8 a 10 °C para cuando esta verde- maduras y parcialmente maduras y esto conduce a una vida de almacenamiento potencial de 2 a 3 semanas (Cisneros, 2004).

También es recomendable mantener una humedad relativa de entre el 90 y 95% (Kader, 2002).

2.13 Tratamientos Poscosecha

2.13.1 Tratamientos térmicos

El uso de tratamientos térmicos además de evitar el daño por frío se ha usado en los últimos años para el control de plagas, ataque por hongos patógenos y para alterar el proceso de maduración, ocasionando un retraso en el mismo. Su uso se ha incrementado por la creciente demanda de disminuir el uso de químicos contra algunos patógenos e insectos en poscosecha (Laurie, 1998a; Chaplin et al., 1982).

Existen varios métodos los cuales utilizan altas temperaturas para la desinfección de frutas:

- Aire a alta temperatura
- Hidrotermia (inmersión en agua caliente)
- Vapor de agua caliente
- Aire caliente forzado que es una modificación del tratamiento de vapor caliente
- Vapor saturado
- Aire seco
- Radiación infrarroja
- Radiación de microondas

La aplicación de dichos tratamientos también brindan termotolerancia a los frutos o bien inducen tolerancia a temperaturas que pueden provocar daño por frío y como parte a todas estas respuestas se ven involucradas las proteínas de choque térmico conocidas como HSP.

2.13.2 Choque Térmico

Las condiciones ambientales tales como la temperatura, la luz, disponibilidad de agua o balance hormonal en las plantas, tienden a modificar la expresión de genes y a nivel molecular, una de las respuestas mejor caracterizada es a las altas temperaturas o choque térmico.

La respuesta del choque térmico es una reacción conservada de las células y organismos a temperaturas elevadas. Las respuestas provocadas por dichos eventos conducen a que los organismo y las células se protejan contra daños mas severos, que se reestablezcan las actividades fisiológicas de la célula en forma normal y se aumenten los niveles de termotolerancia.

La termotolerancia adquirida se define como la capacidad de las células de sobrevivir a un tratamiento mortal con alta temperatura, debido al tratamiento previo con una temperatura alta subletal.

Una alternativa para reducir el daño por frío y la carga microbiana, es la exposición del fruto previo al almacenamiento a tratamientos térmicos con temperaturas de 38°C a 40°C por un tiempo de 30 -240 minutos, induciendo las proteínas de choque térmico (HSP17 y HSP70). Lo anterior le confiere termotolerancia al fruto inhibiendo el daño por frío prolongando así, la vida de anaquel (Fuentes, 2006). Este tratamiento dadas las condiciones de temperatura, puede tener efecto sobre la carga microbiológica del fruto.

2.13.3 Tratamiento con Calcio

La restricción del calcio en las raíces y la falta de movilidad en la planta son las razones porque la aplicación de aspersiones de calcio ha sido más efectiva para combatir trastornos en el fruto por deficiencia de calcio e incrementar su vida de almacenamiento.

Es por esto que el Calcio en fisiología de poscosecha, ha cobrado mayor importancia; siendo el mineral que más influencia tiene sobre el retraso de la senescencia, control de desordenes fisiológicos y efectos sobre diferentes tipos de patógenos en frutos y vegetales. Logrando así un retraso en la maduración y una mayor vida de anaquel (Saborío, 1997).

Estudio previos demuestran que los trastornos que con mayor frecuencia son asociados a la deficiencia de calcio en el fruto de manzano incluyen la podredumbre amarga, el corazón acuoso, el pardamiento interno, el desorden por bajas temperaturas y el desquebrajamiento (Shear, 1975).

Las aspersiones foliares de cloruro de calcio a los manzanos han demostrado ser eficaces para mejorar las características textuales del fruto y preservarlos por más tiempo durante su almacenamiento en frío.

.

2.13.4 Tratamiento con Cloro

Desinfección

La desinfección es un conjunto de medidas dirigidas a eliminar o destruir los agentes infecciosos causantes de enfermedades y que se encuentran diseminados en el medio ambiente. Es una medida de saneamiento y cumple la función de eliminar los agentes patógenos y de modificar las condiciones ambientales, ayudando así a la preservación de la salud.

Los agentes desinfectantes más comunes en el mercado son el cloro y el ozono. El más utilizado es el cloro. El cloro líquido se usa normalmente en concentraciones de 50 a 200 partes por millón (ppm) de cloro total, con un periodo de contacto de uno a dos minutos y un pH de 6.0-7.5.

La eficacia del desinfectante depende de su naturaleza física o química, la temperatura del agua, el pH, el tiempo de contacto, la resistencia de los microorganismos patógenos y la superficie de la fruta.

Es importante supervisar y controlar la concentración del desinfectante, la temperatura del agua y el tiempo de contacto del desinfectante con el producto, durante el lavado y otras operaciones de desinfección, con el objeto de asegurar que se mantenga a niveles efectivos para la eliminación o disminución de microorganismos patógenos.

El cloro tiene acción principalmente sobre bacterias gram positivas (lácticas, clostridios, *Bacillus*, *Staphylococcus*) y bacterias gram negativas (*E. coli*, *Salmonella*, psicotrofas), siendo un poco menos eficaz contra hongos y levaduras.

El tratamiento superficial con agentes antimicrobianos debe ir seguido de un enjuague con agua completamente limpia, para eliminar los residuos de desinfectante en el producto (Martínez Téllez, 2006).

III. OBJETIVO GENERAL

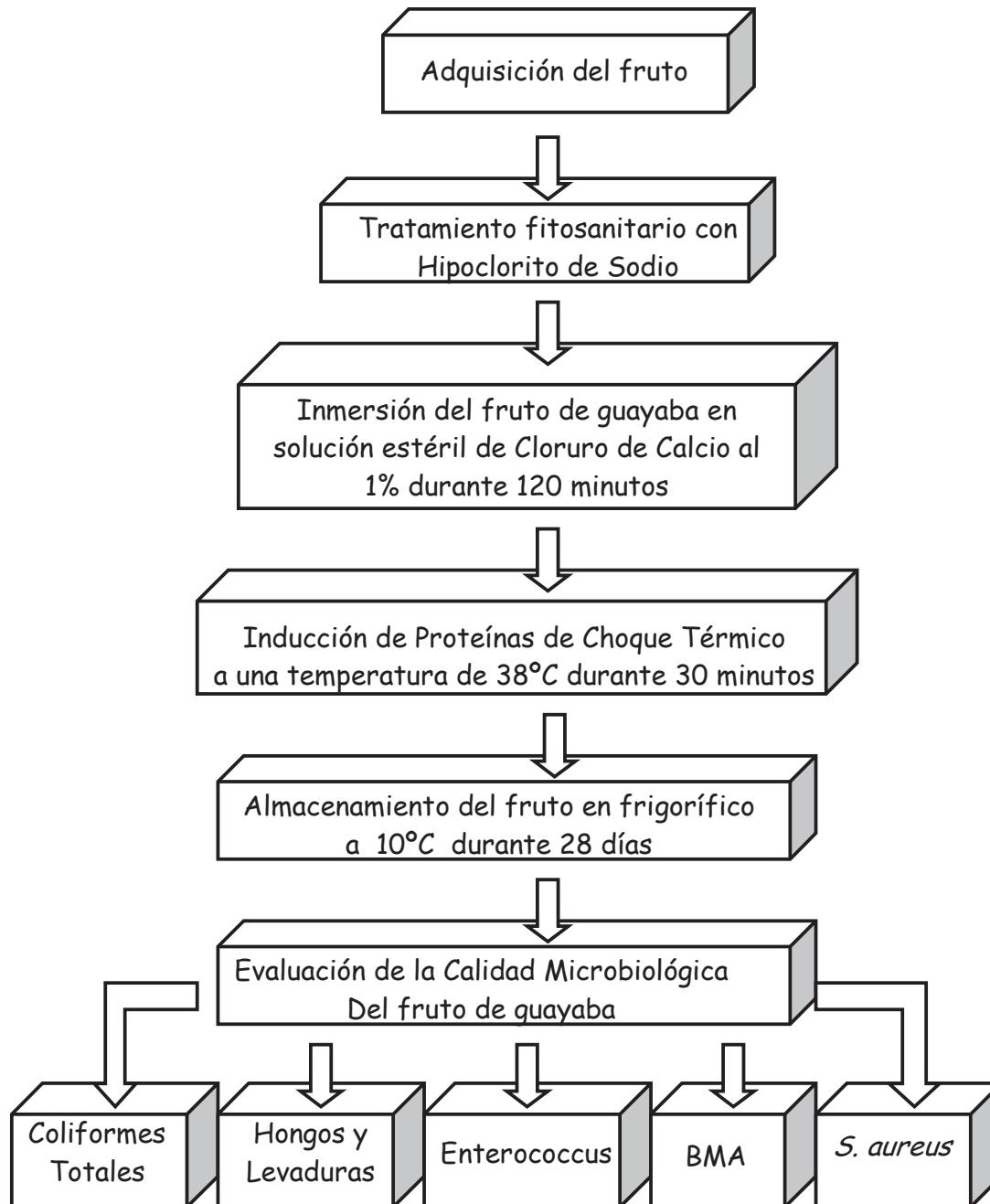
Determinar la calidad microbiológica de guayaba (*Psidium guajava*) verde, bajo los tratamientos de inmersión en solución de cloruro de calcio y la inducción de proteínas de choque térmico.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Inducir las proteínas de choque térmico en frutos de guayaba.
2. Tratar los frutos de guayaba en solución de Cloruro de Calcio.
3. Evaluar el efecto de la inmersión de frutos de guayaba en solución de cloruro de calcio e inducción de proteínas de choque térmico sobre la calidad microbiológica.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Diagrama general de proceso



5.2 Material biológico

Guayaba (*Psidium guajava* L.). Para evaluar la calidad microbiológica de frutos tratados con cloruro de calcio e inducción de proteínas de choque térmico las guayabas se obtuvieron en la central de abastos, en un estado verde de maduración.

Cepas de *Staphylococcus aureus*.

No. de muestras

Una muestra al azar cuyo peso es de 10g obtenido de 3 guayabas diferentes

5.3 Tratamiento fitosanitario con Hipoclorito de Sodio

Los frutos de Guayaba fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de Sodio al 1% por 1 minuto, al término, se frotaron manualmente con la misma y posteriormente se sacaron de la solución y se pasaron a una solución de Cloruro de Calcio al 1%.

5.4 Tratamiento con solución de Cloruro de Calcio

Consistió en la inmersión de los fruto en una solución de cloruro de calcio al 1%, por 120 minutos. (Urueta 2004). Posteriormente se inducirán las proteínas de choque térmico.

5.5 Tratamiento de inducción de las proteínas de choque térmico

Una vez tratados los frutos con Cloruro de Calcio al 1% se introdujeron estos en una cámara climática Biotronette Mark III Lab-Line, a una temperatura de 38°C por 30 minutos.

5.6 Almacenamiento del fruto de Guayaba

Los frutos tratados se almacenaron en frigorífico marca Mabe a una temperatura de 10°C, con una humedad relativa (H.R.) de 85-95%; durante 28 días, con revisiones diarias de temperatura y humedad.

5.7 Evaluación de la calidad Microbiológica

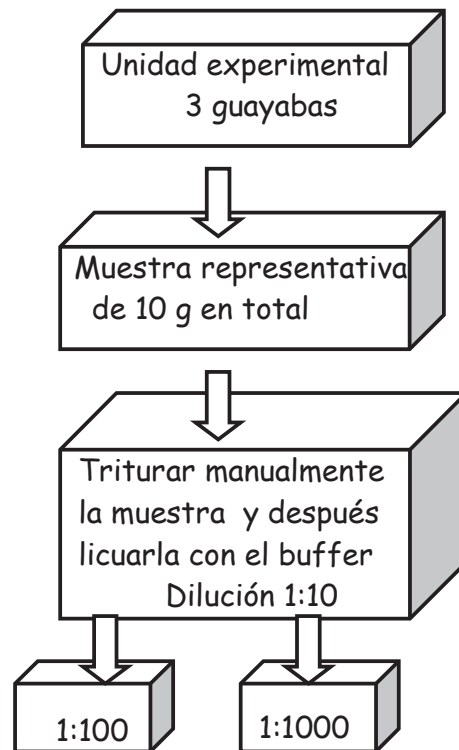
De acuerdo al procedimiento del producto de Guayaba tratado con Cloruro de Calcio y Choque térmico se considera que exista un cambio en la población microbiana del fruto, por eso es conveniente hacer una comparación con conocimiento de dicha población antes del tratamiento, así como durante el tratamiento físico químico que se le da y en la etapa de almacenamiento.

La evaluación microbiológica también debe de abarcar un análisis de este con las personas que se encargan del manejo del fruto.

La unidad experimental consistió de 3 guayabas seleccionadas al azar, de estas se tomó una muestra representativa de 10g en total. Una vez obtenida la muestra se trituró de manera manual y posteriormente se homogenizó en una licuadora marca Hamilton Beach con 90 ml de buffer de peptona y con una solución de NaOH estéril 0.1N como neutralizante. A partir de esta primera dilución (1:10), se realizaron diluciones 1:100, 1:1000. A un pH de 7.0 +/-0.2.

5.8 Diagrama de evaluación microbiológica

DIAGRAMA DE LA EVALUACION



5.8.1**Técnica 1****Bacterias Mesofilas Aerobias**

Técnica empleada: vaciado en placa

Preparación de las diluciones:

1ª dilución:

10g de muestra + 90ml de buffer de peptona homogenizar en licuadora, y posteriormente a la homogenización se mide el pH y este se ajusta a un pH de 7.00 con NaOH 0.1N gota a gota. El pH debe de ser de 7 ± 0.2 (dilución 1:10).

2ª dilución:

Transferir 10ml de la primera dilución al siguiente frasco dilutor con 90ml de buffer de peptona para obtener una dilución 1:100.

3ª dilución:

Tomar 10ml de la segunda dilución y transferir al último frasco dilutor, teniendo una dilución de 1:1000.

Inoculación:

Transferir 1ml de cada dilución a una placa de petri estéril vacía, adicionar con micropipeta 0.1ml a cada placa de petri una solución de Cloruro Trifenil Tetrazolio al 0.1%; posteriormente adicionar un tubo licuado de Agar Cuenta Estándar (ACE) a 45°C y homogenizar con 10 movimientos circulares a la izquierda, después 10 a la derecha, 10 movimientos verticales hacia un extremo y 10 movimientos verticales hacia el otro extremo.

Incubar a 37°C durante 72 horas, realizar recuento en cuenta colonias, reportar en UFC /ml y hacer la interpretación de resultados.

5.8.2

Técnica 2

Hongos y Levaduras

Técnica empleada: vaciado en placa

Preparación de las diluciones:

1ª dilución:

10g de muestra + 90 ml de buffer de peptona homogenizar en licuadora, y posteriormente a la homogenización se mide el pH y este se ajusta a un pH de 7.00 con NaOH 0.1N gota a gota. El pH debe de ser de 7 ± 0.2 (dilución 1:10).

2ª dilución:

Transferir 10ml de la primera dilución al siguiente frasco dilutor con 90 ml de buffer de peptona para obtener una dilución 1:100.

3ª dilución:

Tomar 10ml de la segunda dilución y transferir al último frasco dilutor, teniendo así una dilución de 1:1000.

Inoculación:

Transferir 1ml de cada dilución a una placa estéril vacía, posteriormente adicionar un tubo licuado de Agar Papa Dextrosa con Rosa de Bengala, Ácido Tartarico y Ampicilina y homogenizar.

Realizar dos series, una que se incubara a 37°C durante 48 horas y la otra a 25°C durante 5 días.

Realizar recuento, reportar en UFC/ml y realizar interpretación de resultados.

5.8.3**Técnica 3****Coliformes Totales**

Técnica empleada: vaciado e placa

Preparación de las diluciones:

1ª dilución:

10g de muestra + 90 ml de buffer de peptona homogenizar en licuadora, y posteriormente a la homogenización se mide el pH y este se ajusta a un pH de 7.00 con NaOH 0.1N gota a gota. El pH debe de ser de 7 ± 0.2 .

(Dilución 1:10).

2ª dilución:

Transferir 10ml de la primera dilución al siguiente frasco dilutor con 90 ml de buffer de peptona para obtener una dilución 1:100.

3ª dilución:

Tomar 10ml de la segunda dilución y transferir al último frasco dilutor, teniendo así una dilución de 1:1000.

Inoculación;

Transferir 1ml de cada dilución a una placa estéril vacía, posteriormente adicionar un tubo licuado de Agar Bilis Rojo Violeta y homogenizar.

Incubar a 37°C durante 48 horas, realizar recuento, reportar en UFC/ml, e interpretación de resultados.

5.8.4**Técnica 4****Enterococos**

Técnica empleada: extensión con varilla

Preparación de las diluciones:

1ª dilución:

10g de muestra + 90 ml de buffer de peptona homogenizar en licuadora, y posteriormente a la homogenización se mide el pH y este se ajusta a un pH de 7.00 con NaOH 0.1N gota a gota. El pH debe de ser de 7 ± 0.2 (dilución 1:10).

2ª dilución:

Transferir 10ml de la primera dilución al siguiente frasco dilutor con 90 ml de buffer de peptona para obtener una dilución 1:10.

3ª dilución:

Tomar 10ml de la segunda dilución y transferir al último frasco dilutor, teniendo una dilución de 1:1000.

Inoculación:

Transferir 0.1ml de cada dilución a placas con Base de Agar Sangre con Azida y extender con la varilla de manera circular por toda la superficie hasta que el inculó seque.

Realizar recuento, reportar en UFC/ml, para posteriormente realizar la identificación de las especies de Enterococos.

5.8.5**Técnica 5*****Staphylococcus aureus***

Técnica empleada: extensión por varilla

Preparación de las diluciones:

1ª dilución:

10g de muestra + 90 ml de buffer de peptona homogenizar en licuadora, y posteriormente a la homogenización se mide el pH y este se ajusta a un pH de 7.00 con NaOH 0.1N gota a gota. El pH debe de ser de 7 ± 0.2 (dilución 1:10).

2ª dilución:

Transferir 10ml de la primera dilución al siguiente frasco dilutor con 90 ml de buffer de peptona para obtener la dilución 1:100.

3ª dilución:

Tomar 10ml de la segunda dilución y transferir al ultimo frasco dilutor, teniendo una dilución de 1:1000.

Inoculación:

Transferir 0.1ml de cada dilución a placas con Agar Baird Parker y extender con varilla de manera circular por toda la superficie hasta que el inculó seque.

Realizar recuento, reportar en UFC/ml, para posteriormente realizar la identificación de las especies de Enterococos.

Identificación:

Identificación presuntiva: seleccionar colonias de color negro sugestivas de *S. aureus* y tomar 2 ó 3 colonias para realizar el siguiente protocolo de identificación:

1.- Gram.

2.- Catalasa.

3.- identificación Confirmativa: realización de la prueba de Coagulasa en tubo:

De las colonias seleccionadas del Baird Parker se resiembran por estría simple en agar nutritivo, de allí se toma una asada para suspenderlo en un tubo que contenga aproximadamente 0.5ml de plasma (Humana o de conejo), incubar a 37°C/24 horas, la cual se espera observar la presencia de un coagulo que confirma la especie de este genero.

4.- Determinación indirecta de cepas toxigenitas:

Las cepas identificadas como *S. aureus* son sometidas a la prueba de de producción de Termonucleasa, ya que se ha determinado que las cepas Termonucleasas positivas son enteroxigenicas.

5.8.6 Equipo y materiales

VIDRIO	PLASTICO	EQUIPOS	OTROS
Tubos con tapón de rosca	Cajas de Petri	Balanza granataria	Gasas esteriles
Frascos dilutores	Pizetas	Balanza analítica	Algodón
Campanas de Durham	Bolsas de polipapel	autoclaves	Papel de estraza
Matraces		Refrigeradores	Cinta testigo
Probetas		Licuada con vaso	Papel aluminio
Pipetas estériles		Campana de flujo	Espátula
Varillas		Incubadora	Clean pack
		Baño de agua de 45 y 50°C	Guantes de látex y de asbesto
		Microscopio	Cubre bocas
		Cámara climática	tabla de lectura para el número más probable
		Mecheros	Ampolletas de esterilización
		Cuenta Colonias	

5.8.7 Medios de Cultivo (Bioxon)

Nombre	Abreviatura	Función	Observaciones de preparación
Agar Cuenta Estándar	ACE	Detección de Bacterias Mesofilas Aerobias	* Esterilización a 121°C/15'.
Agar Bilis Rojo Violeta	ABRV	Determinar contaminación por Coliformes.	Enfriar de 42 a 44°C aprox. y usar inmediatamente. * Esterilizar a 121°C/15'. * pH final 7.4 +- 0.2
Agar Papa Dextrosa	APD	Cultivo e identificación de Hongos y recuento de levaduras.	* En placa debe ajustarse el medio a un pH de 3.5 +- 0.1 al momento de verter sobre las placas. * agregar 14ml de Ácido Tartarico esterilizado al 10% a cada litro de medio. fundido y enfriado a 45°C * Esterilizar a 121°C/15'

Agar KF- Base de agar Sangre con Ázida		Aislamiento de Estreptococos y Estafilococos.	* Esterilización a 121°C/15'. * pH final de 7.2 +- 0.2
Agar Base Baird Parker		Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> .	* Esterilización a 121°C/15'.
Caldo Infusión Cerebro Corazón	BHI	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> .	* Esterilización a 121°C/15'.
Caldo Sabouraud		Cultivo y aislamiento de Hongos y Levaduras.	* Esterilización a 121°C/15'. * pH final de 5.7 +- 0.2

5.8.8 Reactivos, Soluciones y Colorantes

- Cloruro Trifenil Tetrazolio (TTC)
- Ácido Tartárico
- Ampicilina
- Rosa de Bengala
- Telurito de Potasio (KTe_2O_3)
- Emulsión de yema de huevo
- Agua destilada
- Buffer de peptonas
- Hidróxido de Sodio 0.1N (NaOH 0.1N)
- Ácido Clorhídrico 0.1N
- Fenol del 1 al 3%
- Hipoclorito de Sodio al 1%
- Benzal

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Promedio de crecimiento en los tratamientos

En la siguiente tabla se muestran los promedios de los crecimientos obtenidos en los diferentes tratamientos realizados a la Guayaba.

Microorganismo	Dilución	Sin tratamiento	Cloro	Calcio	Choque termico
Coliformes Totales (CT)	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0.166
	3	0	0	0	0.166
Enterococos (E)	1	0	0	0.166	0.333
	2	0	0	0.833	0
	3	0	0	0.666	0
Bacterias Mesofilas Aerobias (BMA)	1	0.166	0	1.166	0.166
	2	0	0	1.5	0.333
	3	0	0	0.833	0.333
Hongos y Levaduras (HL)	1	0	0	0	0
	2	0.5	0	0	0
	3	0	0.166	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	1	0	0	0	0
	2	0.166	0	0	0
	3	0	0	0	0.166

6.2 Promedio de crecimiento en los diferentes tiempos de almacenamiento

En la siguiente tabla se muestran los promedios de los crecimientos obtenidos en los diferentes tiempos de almacenamiento (T_0 a T_4) y su correspondiente dilución.

Microorganismo	Dilución	T_0	T_1	T_2	T_3	T_4
Coliformes Totales (CT)	1	0	0	0	3.833	0
	2	0	0	0	2.833	0
	3	0	0	0	1	0
Enterococos (E)	1	0.5	0.166	0	0	0
	2	0.5	0.333	0	0	0
	3	0.5	0	0	0	0
Bacterias Mesofilas Aerobias (BMA)	1	0.166	0	0.166	0	0.333
	2	0	0	0	0	0.166
	3	0	0	0	0	0.166
Hongos y Levaduras (HL)	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	1	0.166	1	0.5	0	0.166
	2	0.166	6.166	4	0	0.166
	3	0.5	0.833	1.833	0	0.1666

En el Ensayo 1

Coliformes Totales

Es efectivo el tratamiento con Cloro y Calcio, aunque el choque térmico da la posibilidad de que sobrevivan 500 UFC/g.

Enterococos

La presencia de 10 UFC/g sobreviven al tratamiento, sin embargo los otros tratamientos son adecuados para la eliminación de este grupo.

Bacterias Mesofilas Aerobias

-La sobrevivencia de este grupo es mínima en tratamiento con Calcio y el tratamiento de Choque Térmico.

-Los tratamientos con Cloro es adecuado a la concentración específica.

La recuperación de Hongos y Levaduras y la posible contaminación por *S. aureus* por manejo de los manipuladores no se logra por la eficiencia de los mismos tratamientos. Aun siendo un fruto muy ácido se eliminan los hongos y levaduras, y da la posibilidad de que el fruto presente una prolongada vida media.

Como no son tratamientos de esterilización; los presentes tratamientos físicos (choque térmico) y químicos (Calcio, Cloro) se puede esperar que comience a manifestarse la sobrevivencia.

En el último periodo de almacenamiento se puede decir que la presencia de un bajo número de *S. aureus* y Bacterias Mesofilas Aerobias, concluye que la manipulación fue adecuada y que el almacenamiento fue garantizado con previo tratamiento fisicoquímico.

Ensayo 2 y 3

Aun existiendo manipulación, la proliferación de *S. aureus*, es aceptada, aunque haya habido crecimiento, los tratamientos con Cloro , Calcio y Choque Termico garantizan que el recuento no sea muy elevado y que nos pueda significar una mala manipulación.

VII Conclusión

Los tratamientos físicos y químicos quedan adecuadamente bien validados para garantizar que en 4 semanas quedan intactas las propiedades organolépticas del fruto con la baja o ausencia de la presencia de microorganismos indicadores.

Se puede apreciar en los 3 ensayos que durante el manejo de las diluciones para aquellos que presentaron crecimiento no fue descendiente la proporción más bien se manifestaba el mismo numero de UFC o había un ligero aumento no significativo.

Nos hace pensar que esta manifestación de crecimiento en los medios de cultivo de recuperación desestruza a los microorganismos de acuerdo a como provienen del fruto que de cierta manera es muy ácida. Durante todos los ensayos del T_0 a T_4 se puede decir que el bajo número de UFC nos indica que los tratamientos antes ensayados son efectivos.

De igual forma que durante la evaluación físico química existe cierta manipulación y que aún así la baja recuperación de *S. aureus* que nos habla del buen manejo del producto no es significativo y que de cierta forma la

aplicación físico química elimina o se desarrolla en lo más mínimo a este microorganismo

BIBLIOGRAFÍA

1. Ali, Z. M. Y Lazan, H. 1997. Guava. En: Mitra, S (Ed). Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits CAB. Internacional. Pág. 145-160.
2. Barkai-Golan, R. Y Phillips, D. J. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruit and vegetables for decay control. Plant. Capítulo 75. Pág. 1085-1089.
3. <http://www.infoasercar.gob.mx/claridades/revistas/059/ca059.pdf> Barreiro Perera Mario, 1993. La guayaba en México un largo camino que recorrer.
4. Cisneros Valdez Ofelia E. 2004. Efecto de la temperatura sobre la Tesis en licenciatura de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
5. http://www.cci.org.co/Manual%20del%20Exportador/Conservac_empaque_transp/transpack09.htm
6. Kader A. A., 2002. Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha. Postharvest Technology.
7. López Lagunes E., 2004. Efecto del choque térmico sobre el contenido de ácidos grasos y la calidad microbiológica del aguacate cv. 'Hass'. UMSNH. Esc. De Químico Farmacobiología.
8. Navarrete O. A. E, 2003. Tesis de Licenciatura. "Efecto del choque térmico sobre la calidad. La inhibición del daño por frío y evolución en almacenamiento del aguacate cv. 'Hass'". UMSNH. Esc. De Químico Farmacobiología, México.
9. Sagarpa, (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2004 y 2005. Estadísticas de producción de Guayaba en el estado de Michoacán, Secretaría Técnica.
10. Normas Oficiales Mexicanas.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
11. Urueta Parra R.M. (2004). "Calidad de frutos de guayaba (*Psidium guajava*) en estado verde de maduración almacenados en frigorífico: efecto del choque térmico y calcio en poscosecha". Tesis de lic. QFB
12. Fernandez Escartin E. Microbiología e inoculación de los alimentos 2000
13. James M. Jay. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia

14. Adams Moss. Microbiología de los alimentos. Editorial acribia. 1990
15. Pascual Anderson M. Microbiología Alimentaria, editorial Diaz de Santos
16. <http://www.proamazonia.gob>
17. http://web.uniovi.es/QFAnalitica/trans/ExpquimDimas/PRACT_4_Dureza_del_Agua.pdf
Universidad de Oviedo. Experimentación en Química. Ingeniero Técnico en Química Industrial. Practica No. 4.
18. <http://www.unesur.edu.ve/genetica/informacion.html>
Universidad Nacional Experimental Sur Del Lago “Jesús María Semprum”
Proyecto de investigación: Variabilidad Genética En Materiales De Guayaba.
19. Vázquez-Ochoa, R.I. and M.T. Colina-León. 1990. Changes in guavas of three maturity stages in response to temperatura and relative humidity. Hort Science Capítulo 25. Pág. 86-87.
20. Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. Annual Review of plant physiology and Plant Molecular Biology. Capitulo 42. Pág. 579-620.
21. Weis, S. A. Drake, M., Bramlage, N. J. And Baker, J. H. 1980. A sensitive method for measuring changes in calcium concentration in ‘McIntosh’ apples demostrated in determinind effects of foliar calcium sprays. J. Amer. Soc. Hot. Sci. Capitulo 105. Pág. 346-349.
22. Westwood, M. N., 1993. Temperate zone Pomology. Timber Press, Inc 3rd ed. U.S. A., Pág. 523.
23. Woolf A. B., Bowen J. H. And Ferguson I. B. 1999. Preharvest exposure to the sun influences postharvest responses of ‘Has’avocado fruit. Postharvest Biol. & Technol. Capítulo 15. Pág. 143-153.
24. Yahia M. Elhadi, 1997. Manejo Postcosecha.
25. Zambrano Judith y Manzano Juan, 1994. Efecto de la aplicación de sales de calcio sobre la maduración de frutos de mango.
26. Zoffoli Juan P., 2002. Una novedosa alternativa para prolongar la conservación de frutas. II Seminario El Árbol Urbano.
27. <http://www.cci.org.co/Manual%20del%20Exportador/Frutas/Guayaba/Calidad01.htm>
Manual Del Exportador de Frutas, Hortalizas y Tubérculos; Codex Alimentarius, Colombia 1995.
28. Manual de Prácticas Análisis III, 1999. Análisis Volumétrico. Universidad Michoacana De San Nicolás de Hidalgo, Escuela de Químico Farmacobiología.
29. Marín Francisco y Rodríguez José J. 1999. Caracterización Postcosecha de guayabas (Psidium guajava) para uso industrial en pacayitas de turrialba.

30. Mata B.I., Rodríguez M.A. 2000. En: Cultivo y Producción del Guayabo. Segunda Edición, Ed.Trillas, México.
31. McCollum, T. G., Dáquino, S. Y McDonald, R. E. 1993. Heat treatment inhibits chilling injury. Hortscience. Capítulo 28. Pág. 197-198.
32. Medline Plus; Biblioteca Nacional De Medicina De EE.UU. y Los Institutos Nacionales De Salud.
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/vitaminsandminerals.html>.
33. Mercado S. E., S. Pérez G., P. B. Bautista y U. M .A. García, 1995. Evolución de color y factores de madurez. Memorias del VI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Horticultura- Hermosillo Son. Méx. Pág. 99.
34. Mercado S. E.; Regalado C.; Bautista B. P.; Juárez C., 1999. Avances en el tratamiento del daño por frío en frutos de guayaba (*Psidium guajava*).
35. Navarrete O. A. E, 2003. Tesis de Licenciatura. “Efecto del choque térmico sobre la calidad. La inhibición del daño por frío y evolución en almacenamiento del aguacate cv. ‘Hass’”. UMSNH. Esc. De Químico Farmacobiología, México.
36. http://www.ipfsaph.org/cds_upload%5Ckopool_data%5Ccodex_0%5Ces_cxs_215s.pdf
Norma Del Codex Para La Guayaba. Codex Stan 215-1999.
37. Nussinovitch, A. y S. Curie, 1995. Edible Coatings For Fruits And Vegetables. Postharvers News And Anformation 6:53N-57N.
38. Pantastico, E.B., 1975. Postharvers Physiology, Handling And Utilization Of Tropical And Subtropical Fruits And Vegetables, CT, AVI. Wesport, Conn.
- 39.
40. http://www.inifap.gob.mx/publicaciones/guayaba_cultivo_mexico.htm Perales de la Cruz Miguel A, y Esquivel Villagrana Francisco. Mayo 2002. Guayaba. Su cultivo en México