



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE JUGO
DE ZANAHORIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN QUIMICA EN ALIMENTOS

PRESENTA

RIVERA CABALLERO DIANA CAROLINA

ASESOR DE TESIS

Dr. JAVIER CASTRO ROSAS



INDICE

	Páginas
<i>Índice de gráficas</i>	4
<i>Índice de tablas</i>	6
I. INTRODUCCION	7
II. ANTECEDENTES	8
2.1 Características de la zanahoria.	8
2.2 Compuestos antimicrobianos naturales.	10
2.2.1 Compuestos antimicrobianos en plantas.	12
2.2.2 Uso de antimicrobianos naturales en alimentos.	14
2.2.3 Estudios preliminares acerca de la actividad antimicrobiana de jugo de zanahoria.	18
2.2.4 Ventajas del uso de antimicrobianos naturales.	20
2.3. Desinfectantes químicos.	21
2.3.1 Desinfectantes a base cloro.	21
2.3.2 Desinfectantes a base plata coloidal.	23
2.3.3 Desinfectantes a base de Yodo.	23
2.4 <i>Salmonella typhimurium</i>	24
2.4.1 Patogenicidad.	24
2.4.2 Comportamiento de <i>Salmonella typhimurium</i> en los alimentos	25
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.5.1 Patogenicidad.	26
2.5.2. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en los alimentos.	27
2.6 <i>Vibrio cholerae</i>	27
2.6.1 Patogenicidad.	27
2.6.2 Comportamiento de <i>Vibrio cholerae</i> en los alimentos.	28
2.7 <i>Escherichia coli</i>	29
2.7.1 Patogenicidad.	29
2.7.2 Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> en los alimentos.	30
2.8 <i>Listeria monocytogenes</i>	31

2.8.1 Patogenicidad.	31
2.8.2 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos.	32
2.9 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	32
2.9.1 Patogenicidad.	32
2.9.2 Comportamiento de <i>Pseudomona</i> en los alimentos.	32
III. OBJETIVOS	35
3.1 General	35
3.2 Específicos	36
IV. METODOLOGÍA	36
4.1 Materiales	36
4.1.1 Medios de cultivo	36
4.1.2 Reactivos	36
4.1.3 Microorganismos	37
4.2. Obtención del jugo de zanahoria.	38
4.3 Comportamiento de <i>V. cholerae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> no patógena y los 4 serotipos de <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria almacenado a 4° y 22°C.	39
4.4 Obtención de los extractos de jugo de zanahoria.	40
4.4.1 Obtención de fracciones de los extractos de jugo	40
4.5 Ensayos de actividad antimicrobiana.	41
4.5.1 Comportamiento de los microorganismos en caldo adicionado de fracciones antimicrobianas de zanahoria (Ensayos en <i>Bioscreen C</i>).	41
4.5.2 Comportamiento, monitoreado con <i>Bioscreen</i> , de microorganismos en extractos de jugos de zanahoria con diferentes días de almacenamiento.	41
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	62
VII. BIBLIOGRAFÍA	63

INDICE DE GRAFICAS

	Páginas
Gráfica 1	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en jugo de zanahoria mantenido a 4 y 22° C. 38
Gráfica 2	Comportamiento de una mezcla de tres cepas de <i>V. cholerae</i> SSI y jugo de zanahoria al 100, 10 y 1 % a 4° C. 38
Gráfica 3	Comportamiento de <i>V. cholerae</i> 87 en SSI y jugo de zanahoria al 100, 10 y 1 % en SSI, a 4° C. 39
Gráfica 4	Comportamiento de <i>V. cholerae</i> 88 en SSI y jugo de zanahoria al 100, 10 y 1 % en SSI, a 4° C. 40
Gráfica 5	Sobrevivencia a 4° C de <i>V. cholerae</i> 87 R+ en jugo de zanahoria fresco al 10 % y en SSI. 41
	Recuento en AST-rif y TCBS al 80 %.
Gráfica 6	Sobrevivencia a 4° C de <i>V. cholerae</i> 88 R+ en jugo de zanahoria al 10 % y en SSI. 41
	Recuento en AST-rif y TCBS al 80 %.
Gráfica 7	Comportamiento de <i>V. cholerae</i> en SSI a pH 5.5 y 7.0 almacenado a 4° C. 43
Gráfica 8	Comportamiento de 4 serotipos de <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria a 22° C 43
Gráfica 9	Comportamiento de 4 cepas de <i>E.coli</i> en jugo de zanahoria a 22° C 44
Gráfica 10	Comportamiento de 4 serotipos de <i>Salmonella</i> en jugo de zanahoria almacenado en refrigeración 44
Gráfica 11	Comportamiento de 4 cepas de <i>E.coli</i> en jugo de zanahoria almacenado en refrigeración 45
Gráfica 12	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> CST con 50 µL de extracto etanólico de jugo de zanahoria. 49
Gráfica 13	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> CST con 50 µL extracto de acetona de jugos 1-2-3 de zanahoria. 49
Gráfica 14	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> CST con 100 µL extracto etanólico de jugos 1-2-3 de zanahoria. 49

Gráfica 15	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> CST con 100 μ L extracto de acetona de jugos 1-2-3 de zanahoria.	50
Gráfica 16	Comportamiento de <i>Vibrio cholerae</i> CST con 50 μ L extracto etanólico de jugos 1-2-3 de zanahoria.	50
Gráfica 17	Comportamiento de <i>Vibrio cholerae</i> CST con 50 μ L extracto de acetona de jugos 1-2-3 de zanahoria.	51
Gráfica 18	Comportamiento de <i>Vibrio cholerae</i> CST con 100 μ L extracto etanólico de jugos 1-2-3 de zanahoria.	51
Gráfica 19	Comportamiento de <i>Vibrio cholerae</i> CST con 100 μ L extracto de acetona de jugos 1-2-3 de zanahoria.	51
Gráfica 20	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en CST adicionado con tres fracciones antimicrobianas diferentes.	53
Gráfica 21	Comportamiento de <i>V. cholerae</i> en CST adicionado con tres fracciones antimicrobianas diferentes.	54
Gráfica 22	Comportamiento de <i>S. aureus</i> en CST adicionado con tres fracciones antimicrobianas diferentes.	54
Gráfica 23	Comportamiento de <i>S. typhimurium</i> en CST adicionado con tres fracciones antimicrobianas diferentes.	55
Gráfica 24	Comportamiento de <i>P. aeruginosa</i> en CST adicionado con tres fracciones antimicrobianas diferentes.	55

INDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1.	Composición nutricional de la zanahoria en base a 100 g de muestra.	3
Tabla 2.	Sustancias antimicrobianas en los alimentos.	6
Tabla 3.	Aplicaciones de aceites esenciales en alimentos.	11
Tabla 4.	Microorganismos utilizados.	31
Tabla 5.	Efecto de extractos polares y no-polares de jugo de zanahoria en la sobrevivencia de 5 microorganismos.	46
Tabla 6.	Efecto de las 4 fracciones obtenidas a partir del extracto acetónico en la sobrevivencia de 5 microorganismos.	52

I. INTRODUCCION

Los microorganismos representan dos problemas de importancia para la industria de alimentos, mientras son causa de descomposición de los mismos también son productores de enfermedades (WHO 2001; Frazier y Westhoff, 1988). Una opción que la industria ha adoptado, es el empleo de compuestos químicos sintéticos con acción antimicrobiana (AM). Éstos se adicionan a los alimentos con la finalidad de inhibir ó destruir a los microorganismos indeseados (Frazier y Westhoff, 1988). Sin embargo, muchos de estos compuestos pueden resultar tóxicos al humano aún en dosis bajas o permitidas. De esta forma, los compuestos antimicrobianos de origen natural, han surgido como una alternativa viable y con mínimo riesgo para los consumidores.

De manera natural, es posible encontrar sustancias con cierta actividad AM en diversos materiales, como vegetales; por ejemplo: eugenol del clavo, alicina del ajo, timol del orégano (Beuchat y Golden, 1989; Conner 1993). Es común entre las plantas de la familia *Umbelliferae* como perejil, apio y zanahorias, y Rutaceae, como toronjas, limas y naranjas, la producción de fitoalexinas (que muestran actividad AM), algunas de ellas del grupo de las furocumarinas (Condor y col., 1963; Chalutz, 1969; Butt y Lamb, 1981). Otros compuestos naturales en los vegetales con actividad AM incluyen las antocianinas, algunos derivados de las clorofilas, glucósidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y la cafeína (Conner, 1993). Así, en la industria de alimentos se emplean actualmente por ejemplo aceites obtenidos de semillas de toronja como desinfectantes con un poder antimicrobiano semejante al cloro o yodo. Recientemente, se ha observado que la zanahoria puede generar sustancias que afectan la viabilidad de *L. monocytogenes* (Beuchat y Brackett, 1990, Beuchat y col., 1994; Beuchat y Doyle, 1995).

Los extractos o componentes específicos de la zanahoria podrían ser una alternativa de antimicrobianos naturales con aplicación en los alimentos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano del jugo de zanahoria y de extractos polares y no-polares del jugo de zanahoria contra 10 microorganismos patógenos e indicadores de importancia en alimentos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características de la zanahoria.

La zanahoria es un tubérculo que pertenece a la familia *Umbelliferae* al género *Daucus*, especie carota (Valadez, 1994; Bianchini y Corbetta, 1974). El tejido exterior de ésta consta de un peridermo, cuya función es reducir la pérdida de humedad y evitar el ataque de microorganismos. La región interna consta de un xilema y una médula. (Edmond y col., 1979).

El principal criterio para clasificar las zanahorias es en función del tamaño de la raíz. Hay más de 50 variedades de zanahoria, aunque básicamente se les distingue por su longitud: cortas - francesas (menos de 10 cm.); semi -largas (10-20 cm.) y largas (20 cm.). En nuestro país, la variedad de zanahoria más aceptada es la Nantes, la cual es de tamaño mediano y de color naranja con puntas redondeadas. Además de esta, en México existen otras variedades como Emperador, Chantenay (Valadez, 1994; Bianchini y Corbetta, 1974). Las mejores son aquellas zanahorias que son duras, con un color naranja brillante, uniformes, suaves y sin grietas. Las zanahorias de raíz corta son variedades de cultivo tempranas que pueden presentar forma redondeada, del tamaño de una pelota de golf, o forma alargada o cilíndrica, del tamaño de un dedo. Las zanahorias de raíz larga son variedades gigantes de forma alargada y acabadas en punta. Sin embargo, las variedades más comunes son las que pertenecen a las zanahorias de raíz intermedia, que suelen ser ejemplares de forma cilíndrica y gruesa, piel lisa y color anaranjado oscuro (Valadez, 1994; Bianchini y Corbetta, 1974). Algunas de las variedades de zanahoria más comunes son:

Ardenta Parade: cilíndrica, uniforme y muy buena coloración.

Iva: variedad cilíndrica, dulce y muy jugosa.

Nantesa: variedad originaria de Francia. Presenta raíces despuntadas, cilíndricas y semilargas.

Preda: una de las más cilíndricas. Es tierna, dulce y jugosa.

Tipo Flakkee: raíces largas y cónicas con hojas vigorosas.

Tipo Chantenay: variedad de fácil cultivo en suelos pesados.

La zanahoria contiene una gran cantidad de carotenoides con actividad pro vitamínica A (una vez en el organismo se transforman en vitamina A, vitamina necesaria para el buen funcionamiento de la retina y especialmente para la visión nocturna o con poca luz y para el buen estado de la piel y mucosas). El jugo de zanahoria es una fuente natural de β -carotenos y agente colorante. Contiene aproximadamente 10% de sólidos solubles, con una acidez titulable de 0.15% y un pH de 6.1 (Pederson, 1971). Al más abundante, el beta-caroteno algunos estudios han atribuido un papel preventivo frente a enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento celular, cataratas y degeneración macular senil, dada su capacidad antioxidante y moduladora de la respuesta inmunitaria. La zanahoria contiene una cantidad apreciable de hidratos de carbono y un alto contenido en fibra, tanto soluble como insoluble, que normaliza el tránsito intestinal, evitando el estreñimiento y protege frente al cáncer de colon y la enfermedad cardiovascular, si bien probablemente el aspecto más destacable de este alimento desde el punto de vista nutricional sea su contenido en vitaminas, minerales y oligoelementos como hierro, fósforo, magnesio, zinc, selenio, sodio, potasio (Tabla 1).

Tabla 1. Composición nutricional porcentual de la zanahoria.

COMPONENTE	CONCENTRACION (%)
Agua	82.2
Proteína	1.1
Carbohidratos	9.7
Calcio	0.037
Fósforo	0.036
Hierro	0.007
Sodio	0.047
Potasio	0.341
Vitamina A	2.000-12.000 según variedades U.I ^a
Vitamina B1	0.013
Vitamina B2	0.006
Vitamina E	0.045
Ac. Ascórbico	0.008

^a Unidades internacionales

Tomado de Valadez, 1994.

Además de los compuestos con aporte nutricional, la zanahoria contiene sustancias bioactivas que son importantes a largo plazo para la salud, ya que intervienen ejerciendo un efecto protector del sistema circulatorio, reductor de la presión sanguínea, regulador de la glucemia y colesterinemia y ayuda a mejorar la respuesta inmune, a la presencia de vitaminas B y C se les atribuye propiedades anticarcinogénicas (Edmond y col., 1979; Snowdon, 1992). Contiene además ácidos caféico y ferúlico, los cuales han demostrado tener una acción antioxidante importante, así como cantidades menores de ácido clorogénico y p-cumárico. Los fitoesteroles formados en ciertas cantidades tienen la capacidad de bloquear la absorción del colesterol, facilitando su excreción, y disminuyendo, por tanto sus niveles en sangre (Anónimo, 2008a). Las fitoalexinas (poli acetilenos y cumarinas), están en el grupo de los compuestos bioactivos. Los poliacetilenos (falcarinol, falcarindiol y falcarindiol-3-acetato) son un grupo de compuestos biológicamente activos debido a que presentan una actividad biológica considerable para un amplio rango de microorganismos (Kidmose y col., 2004).

2.2 Compuestos antimicrobianos naturales.

Los antimicrobianos naturales, compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos sanos y seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento. El uso de metodologías clásicas, como los tratamientos térmicos para garantizar la seguridad de los alimentos, se complementa cada vez más con nuevas tecnologías emergentes. Gran porcentaje de los tratamientos a los que son sometidos los alimentos tienen la finalidad de eliminar o inactivar microorganismos patógenos o deterioradores, incrementando con ello la vida de anaquel y mejorando o manteniendo su inocuidad. Los aditivos naturales recientemente han surgido como una alternativa viable y con mínimo riesgo para los consumidores.

De manera natural existe una diversidad de compuestos con actividad antimicrobiana. Podemos encontrarlas en los animales o en sus productos, en el medio ambiente o en las plantas y vegetales. No es excepcional entonces que en los alimentos se encuentren sustancias que tienen efecto inhibitorio

contra alguna o algunas clases de microorganismos. (Fernández E., 2000). La presencia de sustancias antimicrobianas en los alimentos tiene gran influencia en la selección de los microorganismos. En los vegetales no es raro demostrar la presencia de sustancias con efecto antimicrobiano (Tabla 2).

Pueden localizarse en diferentes partes, incluidas las hojas, tallos, semillas, frutos y raíces. Algunas de las sustancias son constitutivas de los fluidos o tejidos de las plantas. Otras, se generan en respuesta a infecciones y ciertas condiciones de estrés provocadas por diversos factores (Coxon y col., 1973; Butt and Lamb, 1981). Estas sustancias antimicrobianas pueden tener efecto variado sobre los microorganismos, algunas muestran un amplio espectro de inhibición, otras solo afectan a ciertos grupos: gram positivos o negativos.

Diversos estudios han mostrado que las hortalizas como la col, los rábanos, la coliflor, espinacas o col de bruselas, generan sustancias antimicrobianas principalmente derivados del ácido hidroxicinámico (Conner, 1993). En las frutas, los ácidos presentes en el mesocarpio funcionan como un mecanismo protector contra la eventual invasión microbiana a las semillas.

Entre las plantas de la familia *Umbelliferae* como el perejil, el apio y las zanahorias, y *Rutaceae*, como la toronjas, limas y naranjas, es común la producción de fitoalexinas (Condor y col., 1963; Chaluzt, 1969, Butt and Lamb, 1981). La producción de estas sustancias se incrementa, cuando estos vegetales entran en una condición de estrés por efecto de factores ambientales (cambios en la temperatura o exposición a iones metálicos) o microbianos (infección por bacterias u hongos) (Coxon y col., 1973; Butt and Lamb, 1981). Otros compuestos naturales en los vegetales con actividad antimicrobiana incluyen las antocianinas, algunos derivados de las clorofilas, glucósidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y la cafeína (Conner, 1993)

En la industria de alimentos se emplean actualmente aceites obtenidos de semillas de toronja como desinfectantes con un poder antimicrobiano semejante al del cloro o el yodo.

Los antimicrobianos pueden agruparse según su origen como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Sustancias antimicrobianas en los alimentos.	
Naturales	
Constitutivas:	
Terpenos, fenoles	
Generadas durante la fabricación:	
Agua oxigenada, ácido láctico, nisina	
Adicionadas	
Legalmente:	
En forma directa: ácido ascórbico	
En forma indirecta: mezclas de gases	
Fraudulentas:	
Bióxido de carbono	
Residuales	
Desde que se genera en el alimento: penicilina en la leche excretada por la ubre	
Durante la higienización del equipo germicidas	

Fuente: Fernández, 2000.

Diferentes estudios muestran que la zanahoria tiene efecto antimicrobiano contra bacterias de importancia en alimentos. Los componentes de la zanahoria con actividad antimicrobiana podrían ser una alternativa de conservadores naturales con aplicación en los alimentos.

2.2.1 Compuestos antimicrobianos en plantas.

Las plantas producen una gama de productos químicos con actividad antimicrobiana, algunos son componentes naturales de la planta, otros se producen en respuesta a lesiones físicas las cuales permiten un contacto de la enzima con su sustrato, y algunas (fitoalexinas) se producen en respuesta a la invasión microbiana. Los compuestos pueden ser letales a células microbianas o pueden inhibir simplemente la producción de un metabolito (ej. Micotoxina). El papel protector que juegan en la planta viva y su potencial como antimicrobianos en alimentos, ha sido un asunto de interés por varios años por parte de los investigadores (Jongen, 2005).

Las hierbas y especias son usadas ampliamente en la industria de alimentos como saborizantes y fragancias. Sin embargo, ellas exhiben también útiles propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Muchos derivados de plantas con compuestos antimicrobianos tienen un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos y micobacterias. Aunque más de 1300 plantas han sido reportadas como potenciales fuentes de agentes antimicrobianos, hasta la fecha tales compuestos alternativos no han sido suficientemente explotados en alimentos. En los últimos 20 años, cientos de artículos científicos muestran la actividad antimicrobiana de compuestos naturales contra microorganismos patógenos y deterioradores. Sin embargo, pocos de estos han sido trasladados a aplicaciones reales en alimentos (Roller, 2003). La actividad antimicrobiana de compuestos derivados de plantas contra diferentes microorganismos, ensayadas individualmente *in vitro*, está bien documentada en la literatura (Roller, 2003; Jongen, 2005).

Los aceites esenciales (AE) o volátiles de las plantas son un cóctel de compuestos, las cuales juegan un importante rol en el sabor de los alimentos y bebidas y usualmente exhiben apreciable actividad antimicrobiana (Roller, 2003). Los componentes mayoritarios con actividad antimicrobiana que se encuentran en los recursos naturales son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides (Jongen, 2005). Los componentes activos son usualmente terpenoides, con la excepción del cinamaldehído, son fenoles como timol, carvacrol y eugenol. Ellos actúan primariamente en las membranas, con los fenoles actúan como translocadores de protones colapsando la fuerza motriz que impulsa a los protones. Los aceites esenciales dañan las propiedades estructurales y funcionales de las membranas y esta es reflejada en la disipación de dos componentes de la fuerza "proton motive": el gradiente de pH (ΔpH) y el potencial eléctrico ($\Delta\Psi$). Muchos reportes han demostrado que muchos aceites esenciales (en concentración aprox. de 100mg/L) impiden la actividad respiratoria de bacterias y levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*). Los aceites esenciales son capaces de ganar acceso al periplasma de las bacterias gram negativas a través de proteínas porinas de la membrana exterior (Roller, 2003).

Los aceites esenciales del tomillo (género *Thymus*) han sido ensayados sobre diferentes microorganismos. Concentraciones de 200–250 ppm del *T. capitatus* (tomillo mas común) inhibieron completamente el crecimiento de *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, y *Rhizopus stolonifer*. Con los extractos de *Thymus vulgaris*, *B. cinerea* y *R. stolonifer* fueron inhibidos más del 50% (Roller, 2003). El carvacrol ha sido identificado como la sustancia responsable de la actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de *T. capitatus*. El timol, carvacrol y linalool son agentes activos en *T. vulgaris*. Sin embargo, otros componentes minoritarios pueden también contribuir a la actividad sinérgica antimicrobiana de un aceite esencial. Un pronunciado sinergismo entre la nisina y el carvacrol se ha registrado como bactericida y bacteriostático contra *B. cereus* y *L. monocytogenes* (Roller, 2003).

Los ácidos orgánicos como el cítrico, succínico, málico, tartárico, benzoico, láctico y propiónico, se encuentran de manera natural en los alimentos (Wagner y Moberg, 1989). Se acumulan como resultado de la fermentación o se adicionan intencionalmente durante su formulación, estos han sido utilizados durante años para controlar el deterioro microbiano. Algunos ácidos tienen efecto fungicida o fungistático, mientras que otros tienden a ser más efectivos en la inhibición del desarrollo bacteriano. Los ácidos orgánicos pueden inhibir la oxidación de la coenzima NADH afectando el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa (Fresse y col., 1973).

2.2.2 Uso de antimicrobianos naturales en alimentos.

Cada vez más se reconoce la actividad antimicrobiana de algunos tipos de plantas. El papel de la investigación es fundamental en este punto, y es necesario que los consumidores reciban la mayor información posible sobre estas técnicas para evitar recelos. Algunos de los avances conseguidos ha sido el uso combinado de la alta presión con agentes antimicrobianos naturales como la nisina o la lisozima, o incluso la aplicación conjunta con tratamientos térmicos de baja intensidad. Esta combinación de tratamientos ha permitido alcanzar un efecto global superior al logrado mediante el uso de una sola de estas tecnologías.

El apio, la almendra, el café y el arándano son algunos de los alimentos que contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En la mayoría de los casos se trata de sustancias con capacidad de prolongar la vida útil de los alimentos, especialmente en frutas. Según un estudio realizado por expertos del Institute Food Technologist de EEUU (IFT) los arándanos son una nueva manera natural de garantizar la seguridad de la carne, ya que sus propiedades le capacitan para reducir el desarrollo de *Salmonella*, *E.coli* y otros tipos de bacterias. Tras aplicar un concentrado de arándano sobre carne picada cruda con varios tipos de bacterias, los expertos concluyen que se reduce de forma considerable el crecimiento de patógenos.

El arándano constituye una herramienta natural y eficaz en la lucha contra patógenos en alimentos. El responsable de este mecanismo es el compuesto denominado proantocianidina (PAC), que obstaculiza la adherencia de las bacterias, sobre todo las de *E. coli*. Los expertos confían en que el arándano constituya, en un futuro, una manera natural de reducir la contaminación de los alimentos. Por otro lado, la vainillina, componente cristalino de la vaina de la vainilla, se perfila como un sustituto, total o parcial, del ácido sórbico y de los sulfitos en la conservación de alimentos. Este compuesto ha demostrado ser especialmente eficaz en frutas como la manzana, las fresas o el mango (Anónimo 2008b).

En diversos estudios los extractos de plantas se han utilizado para prolongar la vida de anaquel de los alimentos (Jongen, 2005). Los extractos de especies de ajo inhiben el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus* y muchas otras, hongos deterioradores de granos, legumbres y alimentos procesados. El sinergismo entre la nisina y el extracto acuoso del ajo en la inhibición de *L. monocytogenes* ha sido descrita. Generalmente, la actividad de los extractos del ajo disminuyen durante el almacenamiento y al ser calentados; los extractos acuosos de jugos crudos son más activos que los extractos de etil acetato, éter, cloroformo o etanol (Roller, 2003).

El jugo de betabel presenta ligera actividad antimicrobiana contra grupos patógenos de *E. coli*: enteroinvasivo, enteropatógeno, y enterotoxigénico, y *S. typhimurium* (Ramírez, 2008).

Han sido relativamente pocos los estudios de la acción antimicrobiana de los aceites esenciales en sistemas modelo de alimentos y en alimentos verdaderos (Tabla 3). Sin embargo, la eficacia de aceites esenciales *in vitro* es a menudo mucho mejor que *in vivo* o *in situ*, es decir en alimentos. Por ejemplo, el aceite esencial de la menta (*Mentha piperita*) ha demostrado inhibir el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis y *Listeria monocytogenes* en medios de cultivo por 2 días a 30°C. Sin embargo, el efecto del aceite esencial de la menta en aperitivos griegos tzatziki (pH 4.5), taramasalata (pH 5.0) y en paté (pH 6.8) a 4°C y 10°C fue variable (Roller, 2003). *Salmonella* Enteritidis murió en los aperitivos bajo todas las condiciones examinadas pero no cuando estaba inoculado en paté y mantenido a 10°C. En éste mismo estudio, *L. monocytogenes* se comportó de forma semejante, los números declinaron en los aperitivos pero aumentaron en el paté (Roller, 2003).

El crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* fueron inhibidos por el aceite esencial del orégano en caldos de cultivo. Sin embargo, cuando estos aceites se probaron en alimentos como berenjena, taramasalata ó mayonesa donde se observaron reacciones tales como incremento del pH, de temperatura y para el caso de las emulsiones separación del aceite usado (Roller, 2003). En otro estudio *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* fueron inhibidos en carne tratada con aceite esencial de clavo y orégano, respectivamente. Una reducción marcada del *Aeromonas hydrophila* ha sido también reportada en carne de cerdo cocinada que fue tratada con aceites del clavo o cilantro, empaquetada a vacío o con aire y almacenada a 2°C y 10°C (Roller, 2003).

El aceite esencial de orégano mostró efecto bactericida y bacteriostático en pescado crudo inoculado con *S. aureus* y *Salmonella* Enteritidis y almacenada bajo atmósferas modificadas (40% CO₂, 30% O₂ y 30% N₂) o en aireación a 1°C. El crecimiento de organismos deterioradores como *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum* fue también inhibida en carne de lechón, pescado y bacalao tratados con aceites esenciales de orégano (Roller, 2003).

Tabla 3. Aplicaciones de aceites esenciales en alimentos.

<i>Aplicaciones de aceites esenciales en alimentos.</i>		
Alimento	Microorganismo	Aceite esencial
Leche (fresco, desnatado)	<i>S. aureus</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>P. frangi</i>	Goma de lentisco
Productos lácteos: queso suave, mozzarella	<i>L. monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis	Clavo, canela, tomillo
Carne fresca: entero o picado	<i>Salmonella</i> Typhimurium y Enteritidis <i>S. aureus</i> <i>P. frangi</i> <i>L. monocytogenes</i> Bacteria ácido láctica <i>B. thermosphacta</i> Enterobacteriaceae Levaduras Flora nativa	Orégano, clavo, albahaca, salvia
Productos de carne: paté	<i>L. monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis Flora nativa	Menta
Salchicha	<i>B. thermosphacta</i> <i>E. coli</i>	Aceite de mostaza
Pescado: pargo dorado	<i>Salmonella</i> Enteritidis <i>S. aureus</i> Flora nativa	Orégano
Filete de bacalao, salmón	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Albahaca, laurel, canela, clavo, zacate limón, mejorana, orégano, salvia, tomillo
Ensaladas y preparaciones: atún, berenjena, taramasalata, mayonesa, tzatziki	<i>S. aureus</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>P. frangi</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. putrefaciens</i> <i>B. thermosphacta</i> <i>E. coli</i> Flora nativa	Menta, orégano, albahaca, salvia
Salsas: salsa de carne	<i>Salmonella</i> Enteritidis y Typhimurium <i>S. aureus</i> <i>P. frangi</i>	Albahaca, salvia

Fuente: Roller, 2003

Se ha reportado que el aceite esencial y el ácido fenólico de la pimienta (*Denntia tripetala*, G. Barker; Anonaceae) inhibe el crecimiento del hongo causante de la podredumbre del tomate. También la pimienta ha mostrado efecto bactericida contra *S. aureus*, *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus sp.*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis.*, *Serratia sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus flavus* (Ejechi y Akpomedaye, 2005).

2.2.3 Estudios preliminares acerca de la actividad antimicrobiana de jugo de zanahoria.

Los tubérculos así como otras frutas y verduras pueden ser invadidos por microorganismos en cualquier etapa, desde que la planta empieza a crecer en el campo hasta antes de su consumo. Conforme envejecen los tejidos y se va perdiendo la integridad de las membranas celulares, resulta más sencillo para los microorganismos introducirse y establecerse en ellos. La forma más fácil para que se introduzcan en el interior de las estructuras sanas es a través de orificios naturales como los estomas y las lenticelas. Algunas especies pueden atravesar directamente la cutícula. La exposición directa de los tejidos, los cortes practicados durante la recolección o debido a lesiones mecánicas, facilita enormemente la entrada de los microorganismos (Hardenburg, 1986). Las lesiones diminutas y difíciles de detectar producidas por arenillas constituyen una excelente vía para la introducción de éstos (Duckworth, 1968).

A pesar de que el jugo de zanahoria es un buen sustrato para el desarrollo de bacterias, se le ha encontrado que la zanahoria puede presentar propiedades antimicrobianas contra algunos microorganismos. Se ha demostrado que los tejidos de la zanahoria contienen metabolitos que inhiben el desarrollo de hongos. Algunos de estos se detectaron en forma natural en extractos de zanahoria (Garrod y col., 1978), y otros se indujeron y acumularon en respuesta a un daño con desafío de los tejidos hacia varios hongos patógenos (Goodliffe y Heale, 1977) y no patógenos (Jaworski y Williams, 1973). Uno de los metabolitos que se ha identificado con actividad antifúngica es el faltarindiol (cis-heptadeca-1,9-dieno-4,6-dieno-3,8-diol) (Garrod y col., 1978).

Los componentes de la zanahoria con actividad antimicrobiana podrían ser una alternativa de conservadores naturales con aplicación en los alimentos. La demostración y aislamiento de antimicrobianos naturales de la zanahoria, podría traer como consecuencia el desarrollo de toda una industria dedicada a la producción de conservadores de alimentos a partir de esta hortaliza.

El jugo de zanahoria tiene un efecto anti *L. monocytogenes* bien demostrado, la máxima actividad se observa a pH de 5.0 – 6.4 y a 5° C. La concentración del jugo también tiene una influencia importante, la cual sigue en un orden un tanto extraño: 10% > 1% > 100% > 0.1%, diferencias que los autores de la comunicación no comentan (Beuchat y col., 1994). Se sabe que algunos compuestos fenólicos como la 6-metoximelína se acumulan en los tejidos de la zanahoria después de la infección u otro tipo de estrés que sufre esta verdura.

Se han llevado a cabo varios estudios sobre los efectos antimicrobianos de extractos de zanahoria, aceites esenciales de semillas de zanahoria y zanahorias crudas en los que se observado actividad antimicrobiana contra algunos patógenos transmitidos por alimentos (Abdul-Raouf y col., 1993; Babic y col., 1994). Tal es el caso de *L. monocytogenes*, en un estudio realizado por Beuchat y Brackett, (1990), donde se ha observado una disminución en su población, al ser inoculada en zanahorias crudas enteras y desmenuzadas; con un efecto adverso en zanahorias cocinadas (Beuchat y Brackett, 1990).

Beuchat y Brackett (1990) reportaron pérdida del efecto antilisteria en zanahorias expuestas a cocción. Y confirmaron el efecto antilisteria en un macerado de zanahoria. El principio activo termolábil, se inactivó a 4° y 30 °C a valores de pH por debajo de 5; activándose nuevamente en un límite de pH de 5.8-7.0.

En estudios realizados por Beuchat y col., (1994) con *L. monocytogenes* en jugo de zanahoria sin diluir (100%) y diluido al 10, 1 y 0.1% con agua desionizada, a un pH de 4.8-7.4, y almacenados a 5°, 12° y 20° C, la inhibición fue mayor en el jugo al 10% y menor al 0.1%. El efecto antilisteria fue mayor en

un rango de pH de 5 a 6.4. En el jugo de zanahoria sin diluir, el efecto inhibitorio fue menor que en las diluciones descritas. La aplicación de jugo de zanahoria como agente antimicrobiano sobre algunos alimentos como lechuga y queso Brie almacenados a 5°, 12° y 20° C fue propuesta por Beuchat y Doyle (1995), ellos observaron que a 5° C *L. monocytogenes* redujo su población en lechuga introducida en jugo de zanahoria diluido al 50% y 20%, mientras que a 12° C solo se retrasó el desarrollo del germen. En queso, al cual se le adicionó jugo de zanahoria al 2.5, y 10% solo se observó una reducción de menos de 1 log, después de 3 días de almacenamiento a 5 °C y una multiplicación a los 14 días de almacenamiento. En todos los estudios realizados con zanahorias, los niveles de inóculo fueron de 1×10^4 a 1×10^7 cel / mL.

Se sugiere que las fitoalexinas pueden ser las responsables de este efecto antilisteria. Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular que muestran actividad antimicrobiana en muchos alimentos. En la zanahoria las fitoalexinas que se han identificado son la 6-metoximeleína, eugenina, miristicina, y el falcarindiol (Yates and England, 1982). De estas, la 6-metoximeleína es a la que se le atribuye la mayor actividad antimicrobiana. No obstante, hasta el momento no existen estudios disponibles en la literatura que muestren específicamente cual o cuales son las fracciones de la zanahoria con actividad antimicrobiana, o de estudios efectuados con otros microorganismos patógenos o deterioradores de importancia en alimentos. Nos parece de interés investigar el efecto del jugo de zanahoria y de sus fracciones contra diferentes microorganismos patógenos y deterioradores.

2.2.4 Ventajas del uso de antimicrobianos naturales.

Las preferencias del consumidor giran entorno a los productos más naturales. Por esta razón, son cada vez más frecuentes las alternativas naturales frente a las químicas. No sólo las preferencias del consumidor juegan un papel importante a la hora de buscar nuevas alternativas, ya que las modificaciones legislativas o la resistencia de los patógenos a los antibióticos constituyen también factores de igual importancia. El uso de aditivos químicos para retrasar el deterioro de los alimentos o preservar su inocuidad, es un tratamiento universalmente utilizado por los productores. Sin embargo, algunos

de estos antimicrobianos en dosis elevadas pueden resultar tóxicos para el consumidor. Los aditivos naturales recientemente han surgido como una alternativa viable y con mínimo riesgo para los consumidores.

Diferentes estudios muestran que la zanahoria tiene efecto antimicrobiano contra bacterias de importancia en alimentos como *Listeria monocytogenes* o *Vibrio cholerae*. El aislamiento y caracterización de las fracciones con potencial antimicrobiano de la zanahoria permitirá incrementar el número conservadores naturales con aplicación en alimentos. Cabe la posibilidad que con estos antimicrobianos se logre un incremento de vida de anaquel y de la calidad microbiológica del producto terminado tal como la que se obtiene con los conservadores químicos, no obstante, con los de la zanahoria existe mayor probabilidad de que el riesgo al consumidor sea menor.

La investigación sobre actividad antimicrobiana de productos naturales, es limitada en México. El empleo de sustancias naturales como conservadores en alimentos es cada vez mayor. Esto se debe a que son compuestos de origen biológico, que prolongan la vida de anaquel de los alimentos y que carecen de los efectos colaterales producidos por los aditivos químicos.

2.3. Desinfectantes químicos.

La industria de alimentos cuenta con una diversidad de agentes germicidas. Sus virtudes y limitaciones obligan a seleccionar cuidadosamente aquellos que mejor se ajusten a cada necesidad particular (Fernández, E. 2000). La inactivación del germen en las plantas procesadoras de alimentos es un requisito básico para controlarlo e impedir su acceso al producto terminado (Álvarez, 1998). Lo común es que un germicida se considere efectivo cuando demuestra capacidad para inactivar al menos 3 Log₁₀ de una suspensión de microorganismos en 30 segundos (Fernández, E. 2000).

2.3.1 Desinfectantes a base de cloro.

En general los compuestos que liberan cloro son desinfectantes potentes y de amplio espectro de actividad. Son sensibles a estos compuestos tanto bacterias gram positivas como las gram negativas; además estos compuestos

presentan cierta actividad frente a las esporas bacterianas (Forsythe y Hayes, 2000); y no muestran toxicidad al humano en bajas concentraciones. Debido a que son de los más económicos, se emplean ampliamente en la industria de los alimentos (Álvarez, 1998).

Las soluciones de cloro como hipoclorito de sodio o bióxido de cloro, son ampliamente utilizadas por la industria de alimentos como desinfectantes. Los dos son oxidantes fuertes que actúan a nivel de las membranas y otros constituyentes celulares (Harmon y col., 1987). No obstante, el primero presenta la desventaja de reaccionar fácilmente con la materia orgánica, por lo que se inactiva más rápido. En el segundo la interferencia es mínima (Castro-Rosas, 1998).

La principal desventaja del hipoclorito de sodio es que la humedad, el calor, la luz y sobre todo la presencia de materia orgánica, incrementan la tasa de pérdida de cloro libre. La actividad germicida del cloro generalmente ha sido atribuida al ácido hipocloroso (HOCL), el cual es generado en soluciones acuosas de hipoclorito de sodio y otros compuestos que contengan cloro. El HOCL puede disociarse en ion hipoclorito (OCL-) (que es el ion responsable de las propiedades bactericidas de los hipocloritos) y en ion hidrógeno (H+), dependiendo del pH de la solución; la carga eléctrica neutra del HOCL sugiere que esta molécula puede penetrar más fácilmente la pared celular, que el ion OCL-. Después de difundirse al interior de la célula, el HOCL inactiva al organismo a través de la inducción de ciertas especies de oxígeno tóxico, o combinándose con proteínas, lo cual puede inhibir las reacciones enzimáticas y alterar la permeabilidad de la membrana celular (Álvarez, 1998).

Los desinfectantes se pueden incorporar al agua de lavado y de esta forma contribuir a la reducción de la carga microbiana. La efectividad del hipoclorito no solamente es afectada por el tiempo de exposición y la concentración del cloro libre, si no por otros factores como la temperatura, el pH, el tipo de cepa, la presencia de materia orgánica (Álvarez, 1998). Algunos autores señalan que la eficiencia del hipoclorito en la reducción de microorganismos patógenos en verduras es limitada (Adams y col., 1989).

2.3.2 Desinfectantes a base de plata coloidal.

Las propiedades desinfectantes de la plata son conocidas desde hace varios siglos (Labusch, 1971). Los iones de plata tienen tres diferentes mecanismos para controlar el crecimiento microbiológico (Gerg, 2005):

- a) Remueve los átomos de hidrógeno desde grupos sulfhidrilos (-SH) sobre bacterias o virus. Los átomos de sulfuro participan en la respiración celular y en la transferencia de electrones de las células microbianas.
- b) Inhiben la replicación del DNA por medio de la interferencia con el desdoblamiento de DNA.
- c) Alteran la membrana bacteriana por medio de mecanismos enzimáticos.

A las concentraciones usadas para destruir bacterias en estado vegetativo, muestra pobre acción germicida contra esporas y casi nulo sobre los virus, quistes y jebecillos de parásitos (Forsythe y Hayes, 2000). La presencia de materia orgánica interfiere con la acción germicida, a mayor contenido de este material (tejidos de animales, alimentos) el efecto rápidamente se desvanece. Tiene sin embargo, marcado efecto residual. Si se deposita sobre la superficie interna de un recipiente, el agua que subsecuentemente se recibe en el recipiente se expone a iones de plata que lentamente se liberan hasta agotar las reservas. En concentraciones eficientes ordinarias no se afectan las características sensoriales del agua. La concentración bactericida es tan baja como 15mg/L, con efecto muy lento. Las ventajas adicionales de la plata sobre el cloro es que no escapa por volatilización, no forma compuestos indeseables como los trihalometanos, ni es corrosivo (Fernández E., 2000).

2.3.3 Desinfectantes a base de Yodo.

El Yodo es uno de los desinfectantes más antiguos y eficaces. Se usa tradicionalmente en las formas más conocidas como tinturas o yodóforos. Las tinturas son soluciones de yodo en alcohol o en agua. Los yodóforos son mezclas de yodo con agentes tensoactivos que actúan como transportador del yodo. Poseen las características germicidas del yodo y la ventaja adicional de producir muy poca irritación y de ser detergente (Fernández, E, 2000). Es un agente que destruye rápidamente un amplio espectro de bacterias; a diferencia del cloro, el yodo o sus compuestos conservan actividad razonable en presencia de materia orgánica con tal que el pH no sea mayor de 4 y la

cantidad de los primeros no sea excesiva; sin embargo, frente a las esporas son menos activos que los hipocloritos (Forsythe y Hayes, 2000).

Además posee propiedades fungicidas y antivirales importantes. El mecanismo antimicrobiano del yodo no ha sido explicado claramente. Se ha sugerido que su acción involucra la halogenación de las unidades de tirosina de las enzimas y otras proteínas celulares que necesitan tirosina para su actividad ((Forsythe y Hayes, 2000). El yodo también es un agente oxidante y esto cuenta en parte para su actividad antimicrobiana. Los yodóforos son ampliamente usados en la industria de alimentos para desinfectar principalmente superficies, maquinaria, equipo, utensilios y en menor grado frutas y verduras. La eficacia de los yodóforos al igual que muchos otros germicidas, está en función de la concentración, la temperatura de tratamiento, el tiempo de contacto y el tipo de alimento o superficie. Son ampliamente utilizados en la industria de alimentos por su poder detergente. Los yodóforos no son corrosivos, ni irritantes, ni tóxicos y tienen un ligero olor. Algunos materiales plásticos absorben el yodo y se colorean al exponerlos a estos compuestos, por lo que deben evitarse los contactos prolongados con los yodóforos para prevenir la posible tinción de los alimentos (Forsythe y Hayes, 2000).

2.4 *Salmonella typhimurium*

2.4.1 Patogenicidad.

Una vez que se han ingerido las salmonelas y pasan a través del estomago, las bacterias comienzan a multiplicarse y se adhieren al borde en cepillo de las células epiteliales que tapizan la porción distal del intestino delgado y del colon. Después las bacterias penetran en las células de la mucosa que resulta dañada, y migran a la lámina propia de la región ileocecal. Tras una posterior multiplicación en los folículos linfoides se desarrolla una respuesta leucocítica, seguida de hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Esta respuesta inflamatoria también induce la liberación de prostaglandinas, que estimulan el cAMP y produce una activa secreción de fluidos que se manifiesta en una profusa diarrea (Eley R.,1992). Tras superar las defensas primarias del tubo digestivo superior, la salmonela ingerida alcanza la mucosa intestinal, e inicia un proceso de colonización del ileum distal.

Toma ventaja de cierto potencial para competir favorablemente con la flora propia del intestino. Quizá sea un hecho extendido entre bacterias enteropatógenas, pero al menos en la salmonela es sobresaliente su capacidad para evadir los mecanismos de defensa que ponen en operación los animales susceptibles.

Aunque el mecanismo de patogenicidad de la *Salmonella* no está del todo claro, se conocen plásmidos de 30-60 MDa que se asocian con la virulencia (Hovi y col., 1988), así como una enterotoxina activa en el asa ligada del conejo (Koupal y Deibel, 1975), y una citotoxina que destruye células de mamíferos en cultivo (Askenazi y col., 1988).

2.4.2 Comportamiento de *Salmonella* en los alimentos.

Aunque teóricamente cualquier tipo de alimento puede convertirse en vehículo de la *Salmonella*, una vez que este se expone a la contaminación fecal en algunos productos, se configuran riesgos mayores si el germen sobrevive o es capaz de proliferar en él ante condiciones propicias para que tal ocurra. La contaminación inicial de los alimentos por salmonelas suele ser, por lo general, pequeña en términos cuantitativos. Son las condiciones que permiten la multiplicación de estos microorganismos (alimento adecuado, temperatura, humedad, etc) las que potencian y hacen más real el riesgo de infección (Mossel y Garcia, 1982). El conocimiento de los factores que modulan este comportamiento es de valor primario en el análisis de riesgos para prevenir brotes de gastroenteritis. La *Salmonella* no requiere componentes especiales en los alimentos para desarrollar. Muestra notable potencial para hacerlo incluso en productos que no suelen reconocerse con alto contenido nutricional para el hombre. Por ejemplo, en trozos asépticamente extraídos de sandía, papaya y jícama y almacenados a 25-27 °C, *S. typhi* eleva su número en pocas horas; la incorporación de jugo de limón retrasa pero no evita la actividad (Fernández E, y col., 1989).

Las salmonelas se multiplican libremente en la leche; esta capacidad se aprovecha para investigar su presencia en el producto simplemente incubándola con la adición de verde brillante, conocido inhibidor de bacterias gram positivas. En los productos lácteos preparados con cultivos lácticos se

propicia un medio que limita no solo el desarrollo de las salmonelas, sino que compromete su sobrevivencia (Marth, 1969).

En los alimentos congelados las salmonelas pueden sobrevivir durante muchos meses (Gunderson y Rose, 1948; Woodburn y Strong, 1960) como ocurre con la mayoría de los microorganismos, pero la composición del alimento en el cual se encuentren influye en la tasa de sobrevivencia. Si la temperatura es muy baja (-30 °C), con el tiempo se encuentra un mayor número de células viables al cabo del tiempo, que con almacenamientos a 21 o -11 °C (Woodburn y Strong, 1960).

La acidez natural de algunas frutas aunada a la presencia de sustancias de naturaleza no definida, ejerce un claro efecto germicida en las salmonelas. En jugo de limón a pH 2.3 el germen muere rápidamente (Bryan, 1968). Las verduras pueden contaminarse con salmonelas a consecuencia de la utilización de abonos orgánicos o del riego con aguas residuales (Mossel y Garcia, 1982).

2.5 *Staphylococcus aureus*

2.5.1 Patogenicidad.

La adquisición puede ser exógena o endógena. La transmisión exógena puede llevarse a cabo a través de la: contaminación de tejido traumatizado (heridas o quemaduras), de la introducción al tejido de material médico contaminado y la ingestión de alimentos o leche contaminados.

Es un agente de gran relevancia intrahospitalaria, donde ha adquirido resistencia a la Oxacilina. La contaminación intrahospitalaria se lleva a cabo a través de las manos del personal a cargo.

La infección endógena se trata de la entrada de microorganismos desde la piel, desde un lugar en donde el microorganismo es huésped. La infección se ve favorecida en cualquier caso, si el paciente es inmunodeprimido, tiene diabetes, malnutrición o cursa una terapia antibiótica de amplio espectro.

2.5.2 Comportamiento de *S. aureus* en los alimentos.

El *S. aureus*, 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 cárnicos y lácteos, ciertos vegetales y alimentos cocinados funcionan como medios excelentes para mantener su proliferación. Claro que no todos los alimentos constituyen un sustrato favorable para el desarrollo del microorganismo, de hecho, algunos resultan inhibitorios.

La información disponible del efecto de temperatura sobre la actividad de *S. aureus* en los alimentos afirma que se trata de una bacteria no termodúrica, y con escaso potencial psicrótofo. Existen reportes de brotes de gastroenteritis debidos al consumo de leche pasteurizada (Caudill y Meyer, 1943; Hackler, 1939), pero no se descarta que el estafilococo hubiera contaminado la leche después de la pasteurización.

La interpretación del hallazgo de *S. aureus* en los alimentos no sigue los criterios que se aplican en el caso de los patógenos intestinales del tipo de la *Salmonella* y la *Shigella*. Se trata de una bacteria enterotoxigénica, es decir, que la toxina que provoca la enfermedad se genera y se libera en el alimento como consecuencia del desarrollo del microorganismo. El carácter parasitario de la bacteria y la susceptibilidad a los tratamientos de cocción o pasterización que se aplican a los alimentos, es indicador muy sugestivo de contaminación humana.

2.6 *Vibrio cholerae*

2.6.1 Patogenicidad.

La patogenicidad del cólera se basa en una variedad de factores de virulencia muy organizados. El principal mecanismo de patogenicidad es la producción de una toxina. La enterotoxina es bastante similar a la toxina de *E.coli* (Filkenstein, 1973) y es la responsable de la diarrea característica de la enfermedad. Es de naturaleza proteica, lábil al calor y de peso molecular cercano a 84 kilodaltones. La información para su síntesis se encuentra codificada en el

genoma de un bacteriófago filamentoso (Mekalanos y col., 1997). La toxina está formada por una subunidad A₁ (12 kDa), una A₂ (7 kDa) y cinco subunidades B (10 kDa). Las subunidades B se fijan al gangliósido GM₁ ubicado en la membrana celular del epitelio del intestino delgado. La subunidad A penetra a la célula y activa el complejo enzimático adenilatociclasa lo cual incrementa los niveles intracelulares de AMPc y la hipersecreción de sales y agua (Oliver y Kaper, 1997).

Esto provoca diarrea secretora dando como resultado una concentración de Na⁺ y Cl⁻ ligeramente inferiores a las del plasma; la concentración del bicarbonato es aproximadamente el doble y la de iones K⁺ es tres a cinco veces mayor que la plasmática (Oliver y Kaper, 1997). En algunos casos un individuo con cólera puede perder hasta 30 litros de agua en un día (Mata, 1992). La administración oral de 5 µg de toxina colérica provoca diarrea en voluntarios humanos (Levine y col., 1983). La pérdida de agua es la alteración más importante, ya que de ella se derivan los demás signos y síntomas. En consecuencia, el tratamiento primario efectivo para el cólera consiste en la rehidratación de los pacientes. Se ha reportado que los tres serotipos de *V. cholerae* producen esta toxina colérica. (Levine y col., 1983).

En general, no se le considera una bacteria invasiva, si bien cierta capacidad se expresa (de acuerdo con algunos reportes), en septicemia por cepas no O1. La presencia del antígeno O1 no se asocia con la virulencia, de manera que no debe considerarse como el indicador directo y suficiente de toxigenicidad. Otros factores de virulencia incluyen la presencia del flagelo, la producción de mucinasa y probablemente de adhesinas (Kueh y chan., 1985).

2.6.2 Comportamiento de *V. cholerae* en los alimentos.

V. cholerae tiene potencial para desarrollar en los alimentos cocinados tales como arroz, pollo, lentejas, leche (Guthrie y col., 1985). Este hecho es muy importante ya que con ello se incrementa el riesgo de infección. En otras palabras, para que ocurra la infección se requiere por lo general de un número elevado del microorganismo (Oliver y Kaper, 1997). En el laboratorio se ha encontrado que *V. cholerae* en caldo soya tripticasa a 35 °C, en tan solo 5 h es capaz de alcanzar 10⁸ UFC/mL (Castro, 1997). Este estudio nos da una idea de

la magnitud del riesgo que representa el abuso de la temperatura durante el almacenamiento o manejo de los alimentos. Cabe mencionar que temperaturas cercanas a 35 °C pueden alcanzarse dentro de una cocina o durante los meses cálidos.

El pH y la temperatura del alimento tienen una influencia notable en el desarrollo del microorganismo. *V. cholerae* es incapaz de multiplicarse en alimentos ácidos como los cítricos donde por el contrario tiende a morir rápidamente (Mata, 1992). A diferencia, en alimentos de acidez intermedia sobrevive al menos 8 h. También crece en algunas verduras crudas como el germinado de alfalfa (Castro y Fernández, 2000). Sin embargo, al parecer este desarrollo está fuertemente influenciado por la flora nativa del alimento. Es de esperar que *V. cholerae* sea un mal competidor de la flora autóctona del alimento y por tanto, se ha antagonizado fácilmente.

V. cholerae es susceptible a los antimicrobianos químicos como el cloro o el yodo, pero estos germicidas no son tan eficientes para eliminar al patógeno cuando se encuentra sobre verduras (Castro y Fernández, 1999) o sobre el equipo en las plantas procesadoras de alimentos. Esta resistencia puede explicarse en parte debido a que en un alimento el microorganismo puede estar adherido y recubierto de un polisacárido (glicocálix) que lo protege contra la acción de los germicidas. De hecho la adherencia confiere protección a los microorganismos en contra de factores antimicrobianos (McCarthy, 1992).

2.7 *Escherichia coli*

2.7.1 Patogenicidad.

La importancia de esta bacteria a la salud humana sobresale por su baja dosis infectante, la severidad del padecimiento que origina, la tolerancia a condiciones de acidez poco común entre los patógenos, y su asociación con rumiantes que aportan alimentos de amplio consumo humano (Buchanan y Doyle, 1997). Parece demostrado que los serovares O157:H7 y el O55:H7 (del grupo entero patógeno, causante de diarrea infantil) provienen de un mismo ancestro (Whittman y col., 1993). La primera evolucionó de la *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) adquiriendo susceptibilidad al fago que codifica para la

síntesis de las toxinas shiga, para un plásmido que codifica para una hemolisina y genes que codifican para el antígeno O157 (Bilge y col., 1996).

Los factores de virulencia de esta bacteria son diferentes de las cepas de *E.coli* enteropatógena, enterotoxigénica o enteroinvasiva. No existen registros de invasividad extensiva con multiplicación intracelular como ocurre con la *Shigella* (Tzipori y col., 1986; Toth y col., 1990). La colonización se observa principalmente en el intestino grueso. *E.coli* enterohemorrágica se adhiere a las células epiteliales del intestino que lo acompaña de pérdida de las microvellosidades.

2.7.2 Comportamiento de *E.coli* en los alimentos.

La contaminación fecal de las redes de abastecimiento de agua y los manipuladores de alimentos contaminados, han sido implicados muy frecuentemente en brotes de enfermedad causados por *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET). Han sido implicados varios alimentos, entre los que se incluyen un sustituto de café en Rumania en 1961, las hortalizas, la ensalada de patatas y el sushi. En los EUA, en 1971, los quesos blandos madurados por mohos han sido responsables de brotes relacionados con EIEC en los que resultaron afectadas más de 387 personas y en 1983 fueron causados por ETEC. No sería de esperar que *E.coli* sobreviviese favorablemente en un producto lácteo fermentado con un pH inferior a 5 pero, aquellos casos en los que la contaminación está asociada con la maduración por mohos, el aumento local del pH como consecuencia de la utilización del lactato y de la producción de aminas por moho permitiría el crecimiento del organismo (Adam y Moss, 1995).

En el agua de mar *E. coli* tiende a morir. Carlucci y Pramer observaron una destrucción progresiva del microorganismo en el agua de mar, desde aproximadamente 1.5 millones/ml. a 710 000, 170 000 y 11 000/ ml después de 1, 2 y 3 días, respectivamente. Al estudiar la influencia de la temperatura en la velocidad de muerte bacteriana, encontraron después de 48 h., 41.4% de sobrevivientes a 5 °C, 11.3% a 20 °C, 2.3% a 30 °C y menos de 0.01% a 40 °C, es decir, un claro efecto protector de la temperatura en la sobrevivencia del

germen. La influencia del pH en la sobrevivencia de *E. coli* la estudiaron estos autores exponiendo al germen a diferentes pH, tanto en aguas de mar como en aguas adicionadas con sal a una concentración equivalente. La muerte fue mayor hacia pH alcalino, con sobrevivencias a pH 5 de 38.9% para el agua salina y 58.3% para el agua de mar. A los diferentes pH probados, el germen sobrevivió más en el agua salina, demostrando un efecto protector de otros componentes.

La presencia de materia orgánica también favorece la sobrevivencia de *E. coli* en el agua de mar. La peptona y la cisteína exhiben este efecto, y una adición de materia orgánica que incluya a estas sustancias, más glucosa y sólidos volátiles de las aguas residuales, pueden incluso permitir su multiplicación (Fernández E., 1983).

2.8 *Listeria monocytogenes*

2.8.1 Patogenicidad.

Aunque el intestino humano es el puerto de entrada de las bacterias *L. monocytogenes* asociadas al alimento, la imagen clínica acostumbrada de las listeriosis es meningitis y/o septicemia. La resistencia del hospedador a la infección por *Listeria* constituye un factor determinante del curso de la enfermedad, de ahí la asociación de la listeriosis con el feto por nacer, con bebés, con mujeres embarazadas y con ancianos: en esencia, con aquellas personas cuya inmunidad mediada celularmente se supone menoscabada. Hoy en día se desconoce la dosis infectiva mínima, aunque probablemente sea mucho más reducida cuando el organismo se comporta como patógeno oportunista. En individuos sensibles es quizá suficiente con 100 bacterias (Eley R., 1992). El mecanismo exacto de patogenicidad por *L. monocytogenes* se desconoce, pero dentro del problema hay que considerar tanto la sobrevivencia y multiplicación del microorganismo dentro del huésped, como el proceso invasivo del tejido implicado. En este contexto la característica más sobresaliente del germen es su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos (Mackaness, 1962). Se admite en lo general que el tubo digestivo es la vía de acceso al individuo.

2.8.2 Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en los alimentos.

El desarrollo de *L. monocytogenes* a niveles suficientes para provocar infecciones en personas hipersensibles, no se acompaña de signos de deterioro del alimento implicado. En el almacenamiento de los alimentos perecederos la temperatura es crítica para controlar su actividad. El cambio de 4 a 8 °C puede ser decisivo para que alcancen niveles considerados de alto riesgo. Rosso y col. (1996), por ejemplo, observaron que en un postre lácteo, la presencia de una célula/g puede llegar teóricamente a 100/g después de 5 días a 8 °C, pero requiere de 2 semanas si la temperatura desciende a 4 °C. Esa diferencia en tiempo resulta considerable y altamente significativa en el comercio y servicio de alimentos.

La temperatura influye de manera decisiva en la tasa de multiplicación del germen. El tiempo de generación se extiende hasta casi dos días en refrigeración a 4 °C; pero a 35 °C se acorta a cerca de 40 min.

Aparentemente el desarrollo del microorganismo encuentra condiciones más favorables (con respecto a la leche cruda) en la leche pasteurizada cuando el tratamiento térmico aplicado es más intenso; en esta última situación la fase lag se acorta. Por otra parte, de acuerdo con Roser y Marth (1991a), el crecimiento es más rápido en leche autoclaveada que en la leche pasteurizada.

Tanto *L. monocytogenes* como bacterias del grupo de las pseudomonas son psicrótrofas y fácilmente coinciden en la leche cruda aunque con menos frecuencia que en la leche pasteurizada cuando ocurre una operación post-procesamiento. Un desarrollo ligeramente mayor del patógeno manifiesto en tales casos, puede explicarse considerando la formación de proteasas por parte de las pseudomonas; su actividad incrementa la disponibilidad de compuestos nitrogenados fácilmente asimilables en el alimento (Roser y Marth, 1991a). La adición de cocoa (1-3%) o azúcar (5.8%) a la leche con 2% de grasa favorece su desarrollo.

2.9 *Pseudomona aeruginosa*

2.9.1 Patogenicidad.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista humano, más comúnmente afecta a los inmunosuprimidos, tales como aquellos con fibrosis quística o SIDA. Estas infecciones pueden afectar a muchas partes del cuerpo, pero típicamente

afectan las vías respiratorias, causando 50 % de las pulmonías bacteriana nosocomiales. El tratamiento de dichas infecciones puede ser difícil debido a la frecuente y repetitiva resistencia antibiótica.

P.aeruginosa presenta tres tipos de antígenos: el antígeno somático O, que le proporciona especificidad, al antígeno flagelar H, de carácter proteico, y que afecta, no solo al flagelo polar de *P.aeruginosa*, sino también a su superficie, y el antígeno mucoide M. También es capaz de formar sustancias tóxicas, como exotoxinas, responsables de cuadros diarreicos (enterotoxina) o, incluso toxinas eritrodermicas, cuyo mecanismo de acción es análogo a *Vibrio cholerae*. A veces puede formar la exotoxina tipo A, que se da en las cepas más patógenas, y cuyo mecanismo de acción es parecido al de la toxina diptérica, que bloquea la síntesis proteica disminuyendo el consumo de oxígeno.

P.aeruginosa, debido al mecanismo de acción de los distintos factores antigénicos que puede presentar, da lugar a distintos cuadros clínicos, cuya gravedad dependerá del tipo de estructura antigénica y características de exotoxina y/o endotoxina que pudiera producir, aprovechándose para ello de la debilidad o bajada de defensas del huésped en el que anida. Aparecerán, pues, cuadros graves o muy graves, pero siempre con carácter oportunista, es decir, dependerá siempre de las características del huésped. Los cuadros patógenos más frecuentes son sinusitis, crónicas, infecciones en el aparato respiratorio, como neumonías, faringitis, bronconeumonías, etc. (Granados y Villaverde, 1997).

2.9.2 Comportamiento de *Pseudomona* en los alimentos.

Que se sepa el organismo *P. cocovenenans*, no causa ninguna enfermedad que no sea la toxicosis de origen alimenticio; el alimento implicado es el bongkrek de tempeh, es un producto derivado del coco, que se produce solamente en algunas regiones de la republica Indonesia. Los aldeanos de esta región elaboran el bongkrek de tempeh en condiciones desfavorables para *Rhizopus oligosporus*. Si el producto esta contaminado con *P. cocovenenans* de un modo masivo que el crecimiento del moho resulta inhibido, las sustancias toxicas pueden ser producidas en cantidades letales (Van Veen, 1967).

Muchas especies psicrótrofas de *Pseudomonas* son microorganismos importantes de alteración, a temperaturas bajas de los huevos frescos, del pescado, la carne y la leche, se encuentran difundidos en el suelo, agua y vegetales. En contraposición *P.aeruginosa*, es un organismo termo trófico que es patógeno y a veces se puede encontrar en alimentos (Mossel, 2003).

En atmósferas modificadas que contienen elevadas concentraciones tanto de CO₂ y de O₂, el crecimiento de las *Pseudomonas* esta limitado por el CO₂ mientras que las concentraciones elevadas de O₂ mantienen el color rojo vivo de la mioglobina oxidada de la carne. Aquí la microflora depende del tipo de carne de su temperatura de almacenamiento y de si fue envasada al vacío o de si anteriormente estuvo almacenada en aerobiosis. En términos generales, no obstante, la microflora y la alteración tienden a seguir una pauta parecida a la carne envasada al vacío.

La alteración de la leche pasteurizada puede ser debido al crecimiento de bacilos psicrotrofos gram negativos, tales como *Pseudomona*, acinetobacter introducidos a la leche, como contaminantes después de la pasteurización. La vida comercial del producto dependerá del número de contaminantes introducidos, pero la leche pasteurizada producida bajo condiciones de una adecuada práctica de elaboración, se debe conservar sin alterarse durante más de 10 días bajo refrigeración (Adam y Moss, 1995).

Las propiedades de algunas especies de *Pseudomonas* que las hacen importantes en los alimentos son: 1) su capacidad para producir diversas sustancias que influyen desfavorablemente en el sabor, 2) su capacidad para utilizar compuestos nitrogenados sencillos, 3) su capacidad para sintetizar sus propios factores de crecimiento o vitaminas, 4) la actividad proteolítica y lipolítica de algunas especies, 5) su tendencia aerobia que les permite un crecimiento rápido y producir productos de oxidación y mucosidad en aquellas superficies de los alimentos en las que es más probable que exista una contaminación masiva, 6) su capacidad para crecer a temperaturas bajas (temperaturas de refrigeración), 7) la producción de pigmentos por algunas especie, 8) su resistencia a algunos desinfectantes y detergentes que se emplean en la industria alimentaria (Frazier y Westhoff, 1988).

III. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Determinar el efecto antimicrobiano del jugo de zanahoria contra *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas*

3.2 ESPECIFICOS

1. Investigar el comportamiento de *V. cholerae*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *L. monocytogenes* y *Pseudomonas* en jugo de zanahoria fresco y almacenado a 4 °C y/o 22°C.
2. Obtener extractos y fracciones del jugo de zanahoria con solventes polares y no polares.
3. Evaluar el efecto de extractos polares y no polares de jugo de zanahoria en la sobrevivencia de *V. cholerae*, *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Pseudomonas*.
4. Investigar el comportamiento de *V. cholerae*, *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Pseudomonas* en caldo de cultivo adicionado de extractos polares y no polares.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron de las marcas comerciales Bioxón (México), Oxoid (Inglaterra) y Merck (Alemania):

- Agar Base Sangre (ABS).
- Agar Citrato de Simmons (Citrato).
- Agar Cuenta Estándar (ACE).
- Agar de Hierro Kliger (KIA).
- Agar de Hierro y Lisina (LIA).
- Agar de Tiosulfato Citrato Sales Biliares y Sacarosa (TCBS).
- Agar Movilidad, Indol y Ornitina (MIO).
- Agar Oxford (OXF).
- Agar Soya Trypticosa (AST).
- Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI).
- Caldo Soya Trypticosa (CST).
- Extracto de levadura.
- Peptona de caseína
- Medio de Rojo de Metilo y Voges Proskauer (RM-VP).

4.1.2 Reactivos

- Alcohol etílico al 95%
- Antisuero polivalente O1 para *V. cholerae*, S.S.A., México
- Cristal violeta, Sigma, México
- Lugol, Sigma, México
- Metanol, Sigma, México
- Oxidasa (N,N,N, N-tetrametil p-feniléndiamina), Sigma, México
- Rifampicina, Sigma, México
- Safranina, Sigma, México
- Solución Salina Isotónica (SSI)

4.1.3 Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Microorganismos utilizados.

Microorganismo	Clave	Origen
<i>Salmonella typhimurium</i>		A
<i>Salmonella typhi</i>		A
<i>Salmonella agona</i>		A
<i>Salmonella gaminara</i>		A
<i>Listeria monocytogenes</i>		A
<i>Vibrio cholerae</i> 01	87151	A
<i>Vibrio cholerae</i> 01	88204	A
<i>Vibrio cholerae</i> 01	90500	A
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		A
<i>Escherichia coli</i>	25922	B
<i>Escherichia coli</i>		B
<i>Escherichia coli</i>		B
<i>Escherichia coli</i>		B
<i>Escherichia coli</i>		B

a Donada por el laboratorio de Microbiología de Alimentos del posgrado en alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

b Donada por el departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, México

Se seleccionaron cepas resistentes al antibiótico Rifampicina (Kaspar and Tamplin, 1993). Estas cepas se mantuvieron de 4-7°C en AST con transferencias quincenales en tubos con AST inclinado y se activaron mediante tres transferencias sucesivas en CST incubando a 35°C/24 h. La resistencia al antibiótico se mantuvo en las 10 cepas a lo largo del estudio. En lo sucesivo las cepas resistentes a Rifampicina serán referidas como el sufijo R+.

Preparación del inóculo. Todas las cepas R+ (tres cepas de cada tipo de microorganismo) fueron desarrolladas en CST a 37°C/18-24 h. Bajo estas condiciones de cultivo, a excepción de *V. cholerae* que alcanza 8 Log₁₀ UFC/mL, las demás cepas alcanzan una concentración de 9 Log₁₀ UFC/mL. Todos los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm/25 min y lavados dos veces con

solución salina isotónica (SSI) al 0.85%. Finalmente, cada cepa se resuspendió en SSI para tener una concentración final de aproximadamente $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$. Cada una de las tres cepas de cada tipo de microorganismo fueron mezcladas en un tubo de ensaye estéril en volúmenes iguales para obtener una mezcla representativa (pool) de cada tipo de microorganismo a evaluar. A partir de cada pool R+ se prepararon diluciones decimales en SSI para obtener el nivel de inóculo deseado.

Se trabajó con mezclas de cepas del mismo tipo de microorganismo debido a que cuando se utiliza una mezcla se obtienen valores más representativos del comportamiento del microorganismo que cuando se utiliza de manera individual o por separado. La alternativa sería realizar los estudios por separado con cada una de las cepas y después graficar los promedios de cada cepa, sin embargo, el trabajo de laboratorio se incrementaría y el resultado promedio muy probablemente sería el mismo que el de la mezcla. No obstante en algunos estudios fue necesario trabajar con cepas individuales.

Se evaluó también el efecto antimicrobiano de extractos y fracciones polares y no polares de jugo de zanahoria que se obtuvieron el proceso experimental. En estos estudios se emplearon cepas de microorganismos R+. Se recurrió al empleo de cepas R+ debido a que los extractos y fracciones obtenidos no eran estériles y contenían números variables de microorganismos contaminantes (psicrótrofos, mesófilos, bacterias lácticas, levaduras, etc.) los cuales eran capaces de crecer en los medios de cultivo selectivos empleados, provocando para evaluar el efecto antimicrobiano e interferían con los ensayos antimicrobianos. Además, como todo medio de cultivo selectivo, los utilizados para los microorganismos ensayados manifiestan un cierto efecto inhibitorio sobre una porción de la población analizada, es decir la recuperación del microorganismo no es completa aun sin tratamiento (Fernández E., 2000). En consecuencia, durante la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos y fracciones existía la posibilidad de subestimar el número de los microorganismos. Intentamos resolver esta limitación práctica haciendo uso de las cepas R+, eliminado la interferencia de la flora asociada y el efecto inhibitorio de los medios de cultivo selectivos. La concentración de rifampicina

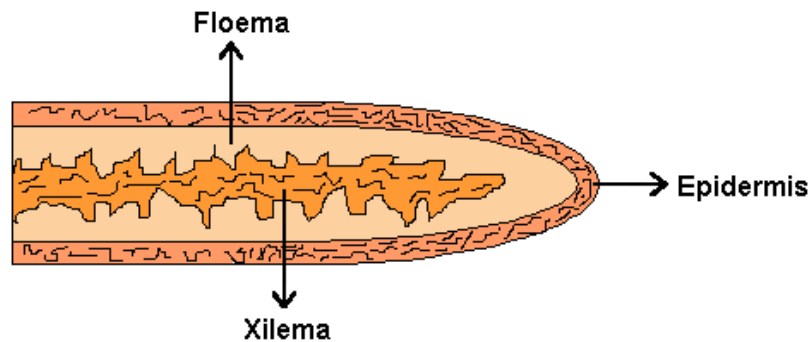
(100 mg/L) adicionada al Agar Soya Trypticaseina (AST) fue suficiente para inhibir por completo la flora interferente. El empleo de cepas resistentes a un antibiótico para monitorear su comportamiento en diversos materiales, es muy utilizado para abatir la int erferencia de la flora asociada.

4.2 Obtención del jugo de zanahoria.

Se adquirieron zanahorias en la central de abastos de la ciudad de Pachuca, Hgo. En el laboratorio las zanahorias se lavaron con agua potable y se frotaron con un cepillo de cerdas suaves, posteriormente, las zanahorias se sumergieron en una solución de alcohol:agua a una proporción de 70:30 durante 10 min para desinfectarlas.

Bajo condiciones asépticas, la zanahoria se separó en las tres diferentes partes que la conforman: epidermis, floema y xilema (Figura 1). De cada uno se obtuvo el jugo correspondiente, jugo de epidermis (JE), jugo de floema (JF) y jugo del xilema (JX). También se obtuvo jugo de la zanahoria completa (JC). Los jugos obtenidos fueron recuperados en tubos de ensaye estériles y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Figura 1. Partes principales de la raíz de la zanahoria



4.3 Comportamiento de *V. cholerae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* no patógena y los 4 serotipos de *Salmonella* en jugo de zanahoria almacenado a 4° y 22°C.

Según fuera el caso, por separado se inoculó 50 mL de jugo de zanahoria completo. Los jugos fueron inoculados con *L. monocytogenes*, *V. cholerae* no resistente (R-) ó *V. cholerae* resistente a rifampicina (R+), *E. coli* no patógena y las 4 serotipos de *Salmonella* a una concentración final de entre 10^3 y 10^7

UFC/mL. Los jugos se almacenaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ / 24 h y/ó $4 \pm 2^\circ\text{C}$ / 1-30 días. Periódicamente se efectuó recuento de los microorganismos inoculados empleando agar soya tripticaseína adicionado de rifampicina (AST-Rif). Para el caso de *V. cholerae* R- el recuento se efectuó mediante la técnica de extensión por superficie empleando tanto agar TCBS como AST-Rif.

4.4 Obtención de los extractos de jugo de zanahoria.

Para obtener una concentración de los agentes microbianos, a partir de cada jugo JE, JF y JX se obtuvieron extractos con diferentes grados de polaridad; para ello, por separado cada tipo de jugo se mezcló con diferentes solventes químicos (50:50): acetona, etanol, metanol, hexano, etanol:agua (50:50) y metanol:agua (50:50), y se dejó reposar durante 24 h, a temperatura ambiente (Estrada, T.M. 20087). Posteriormente, con ayuda de un embudo de separación se retiró el solvente con la parte del jugo que se solubilizó en éste; finalmente, el solvente fue retirado del extracto con un equipo de rota-evaporación (Büchi, rotavapor 205, vacuum controller V-800, heating bath B-490) empleando vacío y 45°C . El extracto sólido o semi-sólido, se colocó en tubos de ensaye estériles y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.4.1 Obtención de fracciones de los extractos de jugo de zanahoria.

A partir de los extractos, se continuó fraccionado los mismos mediante cromatografía sólido-líquido.

Es importante señalar que para la obtención de las fracciones de los extractos recibimos el apoyo del área de Química Analítica de Centro de Investigaciones Químicas de la UAEH. Ahí se realizó la obtención. Y aquí evaluamos el efecto antimicrobiano de estas fracciones. Las fracciones fueron obtenidas de la siguiente manera:

Los extractos fueron fraccionados por cromatografía sólido-líquido utilizando una columna C18 (Alltec, 1g de la fase estacionaria). Se emplearon 14 diferentes solventes como fase móvil: hexano, acetato de etilo, etanol, metanol, hexano:acetato de etilo (90:10; 80:20; 70:30; 60:40 y 50:50), acetato de etilo:etanol (70:30; 40:60 y 10:90), etanol:metanol (70:30 y 40:60).

De esta forma, se obtuvieron 14 diferentes fracciones a partir del extracto acetónico del jugo de zanahoria. Las fracciones se colocaron en tubos de ensayo estériles y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.5 Ensayos de actividad antimicrobiana.

Para estos ensayos, los extractos y fracciones de mayor polaridad fueron hidratados con SSI estéril, y los no-polares fueron solubilizados en Tween 20 al 1 %, ambos a una proporción 1:10. Por separado, tanto los jugos como los extractos y fracciones polares y no-polares, fueron inoculados con cada uno de los 10 pools R+ de los microorganismos bajo estudio a una concentración final de 10,000 UFC/mL. Los jugos inoculados fueron almacenados a $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h, y las fracciones y extractos inoculados a 22°C por 1 h. Después del almacenamiento, el número de microorganismos sobrevivientes en los jugos, extractos y fracciones, fue contado mediante la técnica de vertido en placa (BAM, 2001) empleando agar soya tripticaseina adicionado de 100 mg/L de Rifampicina, y las cajas de cultivo fueron incubadas a $35^{\circ}\text{C}/48$ h.

4.5.1 Comportamiento de los microorganismos en caldo adicionado de fracciones antimicrobianas de zanahoria (Ensayos en Bioscreen C).

Se empleó un incubador automático "Bioscreen C". Los caldos están contenidos en cada una de 100 fosas (con un volumen de 450 μL) presentes en una charola de plástico estéril. El equipo monitorea el comportamiento microbiano que ocurre en cada una de las fosas con base en los cambios de densidad óptica que se presentan cuando el microorganismo se desarrolla. Para los estudios de zanahoria, por separado, se preparó caldo soya tripticaseina (CST) adicionado con cada uno de las fracciones que mostraron la mayor actividad antimicrobiana (CST-Fa) a una proporción de 1:10 (fracción:caldo). Las mezclas CST-Fa se esterilizaron por filtración. 400 μL de caldo CST-Fa de cada fracción se colocó en las fosas de la charola del Bioscreen y cada fosa fue inoculada de forma manual y con 10 μL de cada pool de las suspensiones de los microorganismos una concentración final de 10,000 UFC/mL de CST-Fa.

4.5.2 Comportamiento, monitoreado con Bioscreen, de microorganismos en extractos de jugos de zanahoria con diferentes días de almacenamiento.

Se obtuvo jugo completo de zanahoria fresco en tres momentos: 0, 10 y 20 días con respecto al jugo del tiempo "0". Una vez obtenido el jugo se transfirió a tubos estériles de vidrio y se almacenó inmediatamente a $4 \pm 2^\circ \text{C}$; de tal manera que se obtuvo un primer lote de jugo de zanahoria y se almacenó 20 días (jugo de 20 días). A los 10 días (respecto al primer jugo) se obtuvo nuevamente jugo y se almacenó en refrigeración. Finalmente a los 20 días (con respecto al primer jugo) se obtuvo jugo fresco y se utilizó inmediatamente (jugo 0 días).

A partir de estos tres tipos de jugos (con diferentes días de almacenamiento) se obtuvieron extractos etanólicos y acetónicos de cada tipo de jugo. Los extractos fueron obtenidos tal como se describió en 4.4. Una vez obtenidos los extractos, estos se mezclaron con CST y las mezclas caldo-extracto fueron colocadas en las fosas de las charolas del Bioscreen C. Cada fosa fue inoculada de manera independiente con una concentración conocida de *L. monocytogenes*, *V. cholerae* o *E. coli* no patógena. El experimento se realizó incubando a $35^\circ \text{C}/24\text{h}$. Todos los estudios se efectuaron por triplicado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente se determinó el comportamiento de *L. monocytogenes* en jugo de zanahoria a 22° C como una forma de repetir los estudios reportados en la literatura, en donde se muestra que el jugo de zanahoria tiene efecto anti-*Listeria* (Beuchat y col., 1994). En el jugo inoculado y conservado a 22° C, a las 4 h se observó una rápida inactivación de *L. monocytogenes*, en cambio a 4° C no se observó efecto inhibitorio del jugo de zanahoria (Gráfica 1). Con este antecedente se procedió a realizar los estudios con los otros microorganismos.

Para el caso de *V. cholerae*, el microorganismo mostró un comportamiento diferente al de *L. monocytogenes*, en el jugo mantenido a 22°C el microorganismo comenzó a multiplicarse a partir de las 4 horas de almacenamiento alcanzando una concentración máxima de 7 log UFC/mL a las 24 h. A diferencia, a 4° C no se observó desarrollo en los 15 días de observación, y la concentración del microorganismo permaneció constante.

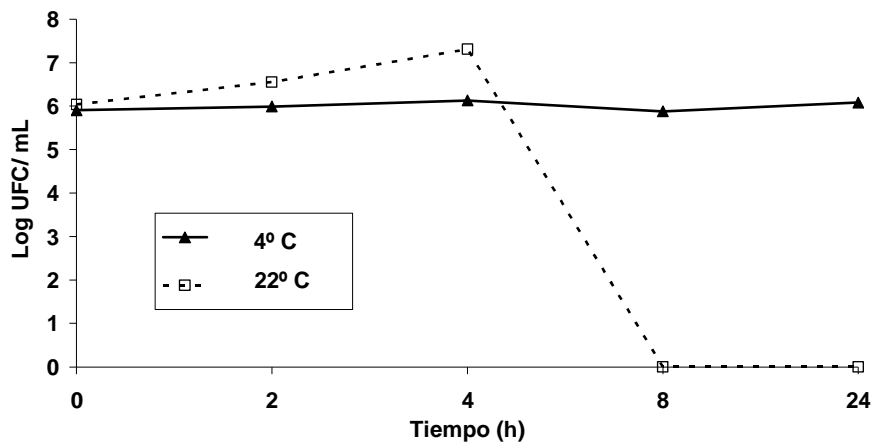
Debido a que no se observó efecto inhibitorio del jugo de zanahoria a las 24 h, se incrementó el tiempo de contacto del patógeno con el jugo hasta 12 días. Para ello se efectuó un estudio en jugo de zanahoria sin diluir (100%) y diluido al 10 y 1% y almacenándolo 12 días a 4° C. Se trabajó con los jugos diluidos ya que se ha reportado que el jugo diluido (90%) muestra mayor efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* que el jugo no diluido (Beuchat y col., 1994).

Se observó que la concentración de *V. cholerae* permaneció prácticamente constante durante 6 días, sin embargo en el 7 día se observó una inactivación repentina que provocó en solo dos días que toda la población se inactivara por completo, en 10 y 100% de jugo probado (Gráfica 2). Este comportamiento atrajo fuertemente la atención ya que no existen antecedentes de un comportamiento semejante de algún microorganismo en algún sustrato.

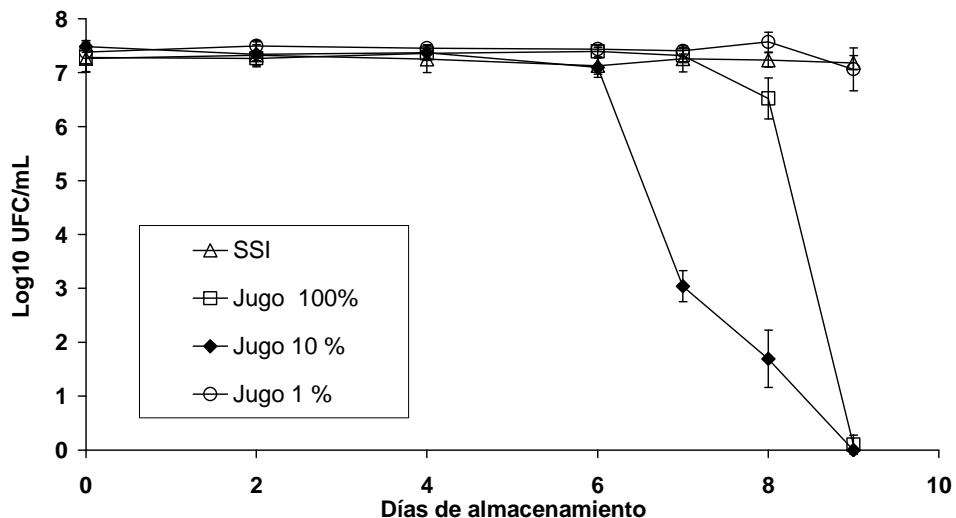
Es posible que el comportamiento de *V. cholerae* pueda ser debido a la presencia de un agente antimicrobiano; podría pensarse también que la disminución en la viabilidad de *V. cholerae* es debido a la refrigeración y no a la

posible presencia de compuestos antimicrobianos que produce la zanahoria. Sin embargo, cabe señalar que en todos estos experimentos se introdujeron controles en SSI almacenándose bajo las mismas condiciones que el jugo y en estos no se observó la reducción que se presentó cuando el microorganismos estaba suspendido en el jugo (Grafica 2). En consecuencia, el efecto observado es muy posible que sea debido a la posible presencia de sustancias antimicrobianas en el jugo. Para corroborar estos resultados se repitió el experimento de manera independiente con 2 cepas individuales de *V. cholerae*.

Gráfica 1. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en jugo de zanahoria mantenido a 4 y 22° C.

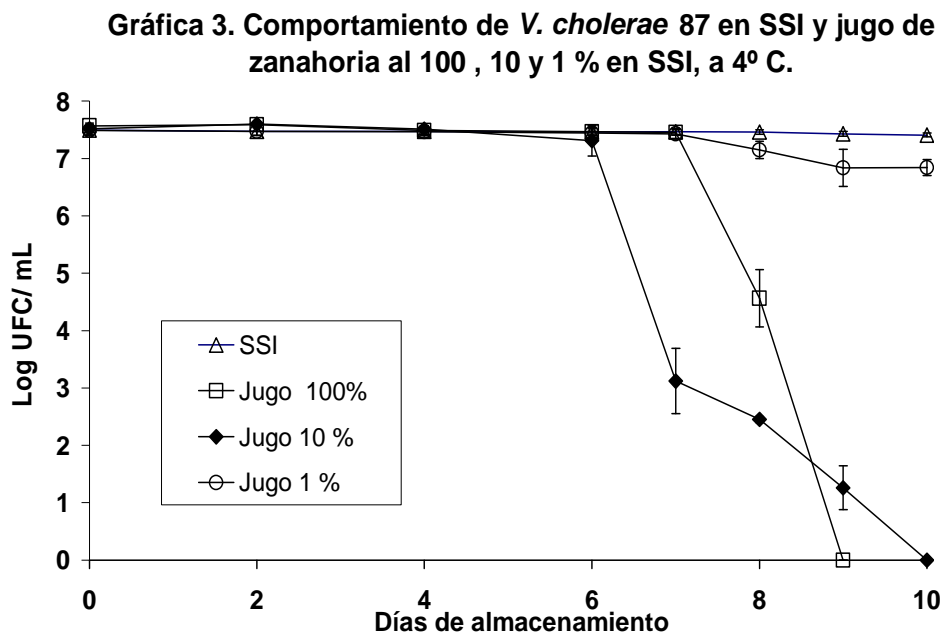


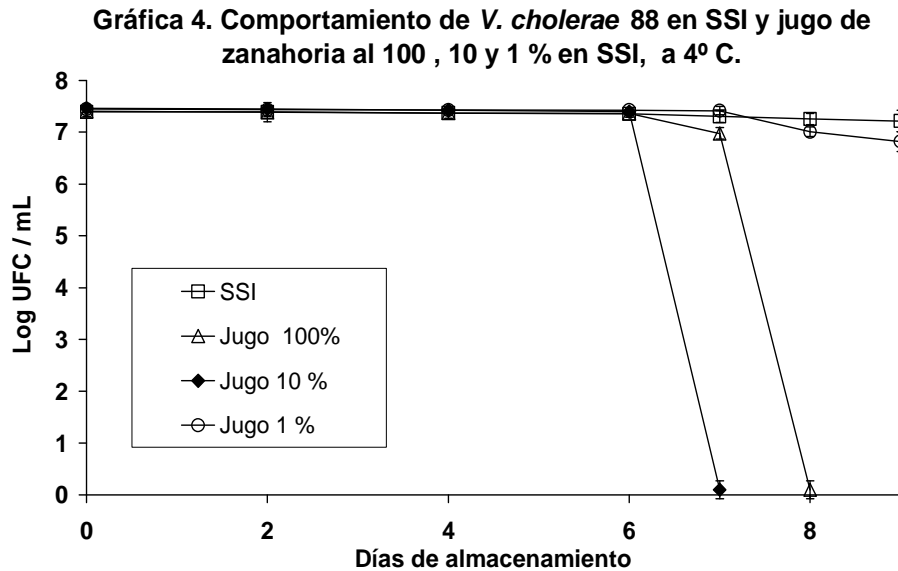
Gráfica 2. Comportamiento de una mezcla de tres cepas de *V. cholerae* y jugo de zanahoria al 100 , 10 y 1 %, a 4° C.



Cabe señalar que en el estudio anterior el jugo de zanahoria se diluyó con agua destilada (a los porcentajes descritos). Otra explicación a este comportamiento de *V. cholerae* podría ser que el agua destilada empleada para diluir el jugo en los estudios anteriores pudiera estar provocando un choque osmótico en la célula, matándola y como consecuencia este efecto podría ser el responsable de la disminución en la viabilidad de *V. cholerae* y no por la posible presencia de sustancias antimicrobianas (Anónimo 2008c). Para evitar esta posible interferencia, en este segundo estudio se empleó SSI para diluir los jugos y evitar el choque osmótico.

En el segundo estudio el resultado fue el mismo que en los jugos de zanahoria diluidos con agua destilada y desionizada. Se observó que ambas cepas de *V. cholerae* sufren una inactivación repentina (Gráficas 3 y 4). En las gráficas se observa la inhibición a partir del sexto día a 4° C, lo que sugiere que los componentes antimicrobianos posiblemente se forman lentamente a partir de la obtención del jugo.



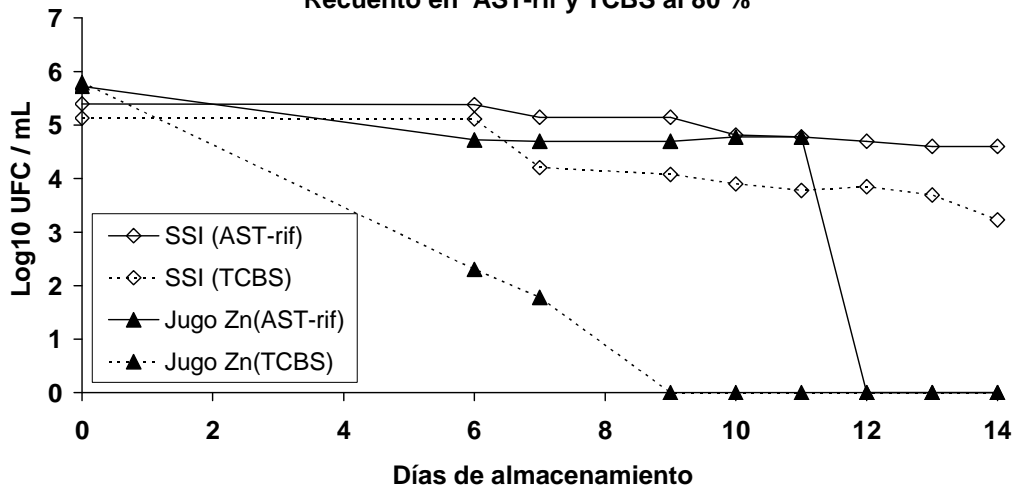


El comportamiento observado en los tres estudios con *V. cholerae* es inusual; durante varios días al parecer no existe efecto en la viabilidad del microorganismo y en un día límite se presenta un efecto letal sobre toda la población del patógeno. Este comportamiento podría ser el resultado de dos eventos independientes o combinados: a) un incremento y acumulación de sustancias antimicrobianas conforme transcurría el almacenamiento alcanzándose la concentración letal al sexto y séptimo día en los jugos sin diluir y diluidos, respectivamente; ó b) la concentración de los componentes inhibitorios permanece constante; al inició esta concentración sólo provoca ligero estrés en la célula de *V. cholerae*, no obstante, conforme transcurre el tiempo de almacenamiento el “estrés” provocado por las sustancias antimicrobianas se intensifica causando un daño irreversible (muerte) al sexto y séptimo día en los jugos no diluidos y diluidos, respectivamente; o c) es posible también la ocurrencia simultanea de ambos eventos.

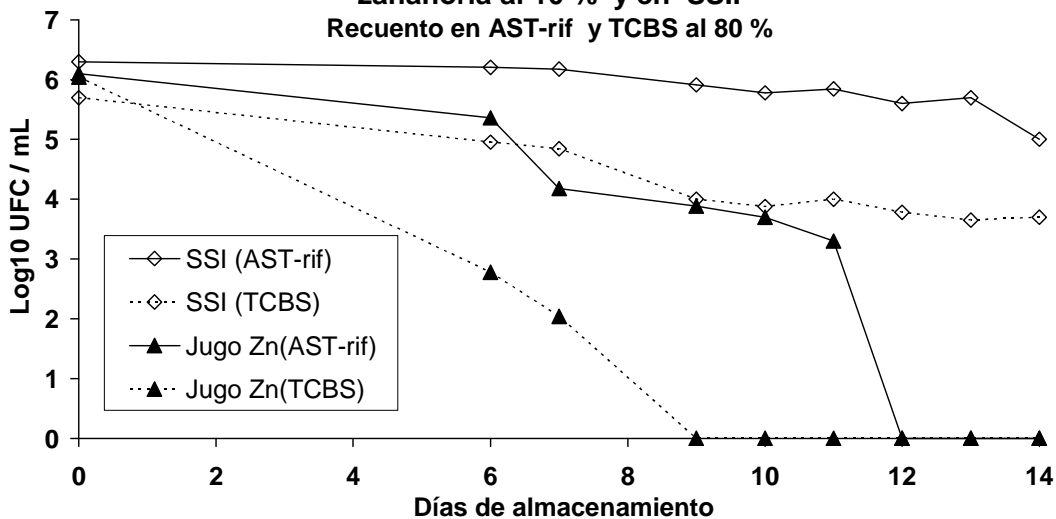
Para tener más evidencia, que contribuyese a conocer lo que pudiera estar ocurriendo, se efectuó un estudio del comportamiento del patógeno en jugo realizando ahora un conteo simultáneo tanto en agar AST-rif y agar TCBS. El agar TCBS es un medio de alta selectividad y es específico para *V. cholerae*. El objetivo era investigar si durante el almacenamiento se presentaba efecto

estresante del jugo sobre el *V. cholerae* previo al efecto letal. Se efectuaron dos estudios independientes con dos cepas de *V. cholerae*.

Grafica 5. Supervivencia a 4° C de *V. cholerae* 87 R+ en jugo de zanahoria fresco al 10 % y en SSI. Recuento en AST-rif y TCBS al 80 %



Gráfica 6. Supervivencia a 4° C de *V. cholerae* 88 R+ en jugo de zanahoria al 10 % y en SSI. Recuento en AST-rif y TCBS al 80 %



En estos estudios observamos un comportamiento semejante al anterior: la concentración de las dos cepas se mantuvo casi constante por unos días y en un día límite se presenta una caída muy evidente en la concentración de células viables. Éste comportamiento se apreció cuando el recuento se efectuó en AST-rif; cuando el recuento se efectuó en TCBS se observó una disminución en la concentración del patógeno desde el primer día. Por el

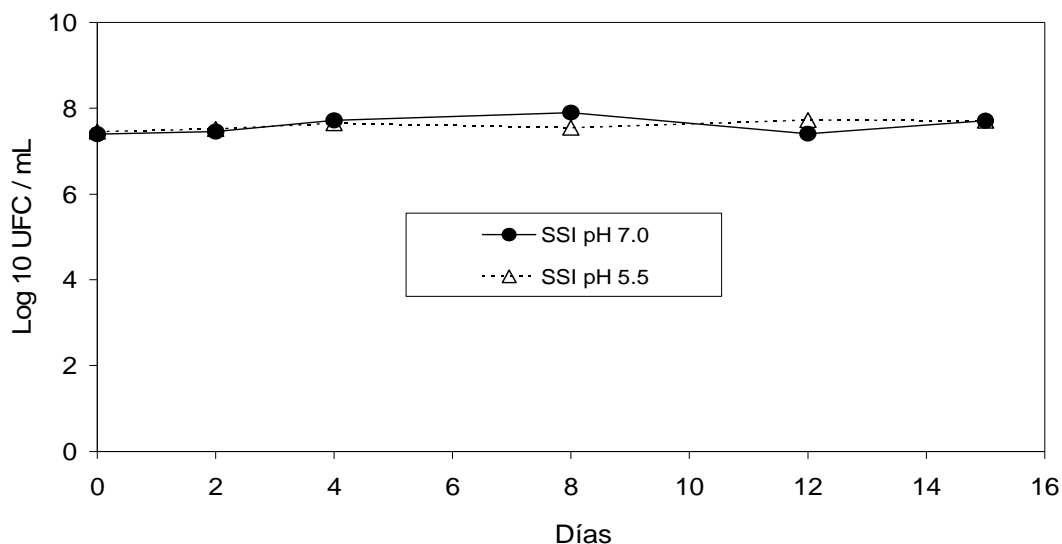
contrario, este comportamiento en general no se observó cuando el patógeno estaba suspendido en SSI (Gráficas 5 y 6).

Los resultados sugieren la existencia de sustancias antimicrobianas en jugo fresco los cuales provocan un efecto estresante sobre *V. cholerae* desde el primer día; el estrés se intensifica conforme transcurre el tiempo. Este señalamiento se basa en la diferencia observada en los recuentos que se obtienen en el medio no selectivo y selectivo. Es sabido que el estrés celular es un daño subletal que ocurre en una parte de la población microbiana (tanto patógenos como deterioradores) cuando la población es sometida al efecto de algún factor que afecta su viabilidad (como los antimicrobianos), bajo esta situación de estrés el microorganismos se torna más sensible al efecto de factores ecológicos (pH, temperatura, etc); se ha visto que bajo esta situación de estrés son incapaces de proliferar en medios de cultivo adicionados de sustancias antimicrobianas a concentraciones que son toleradas por el microorganismo cuando éste se encuentra libre de estrés (Fernández E., 2000).

A pesar de los resultados observados hasta el momento todavía quedaba por explorar si el efecto antimicrobiano no era debido al pH del jugo. Es sabido que *V. cholerae* es muy susceptible al pH. Para ello se efectuó un estudio para determinar la influencia del pH del jugo en la viabilidad de *V. cholerae*. De esta manera, al ajustarse el pH de la SSI al del jugo (pH 5.5), si el pH era el responsable del efecto anti-Vibrio el patógeno se inactivaría en la SSI de forma semejante a lo observado en el jugo. De lo contrario, no se afectaría la concentración del microorganismo.

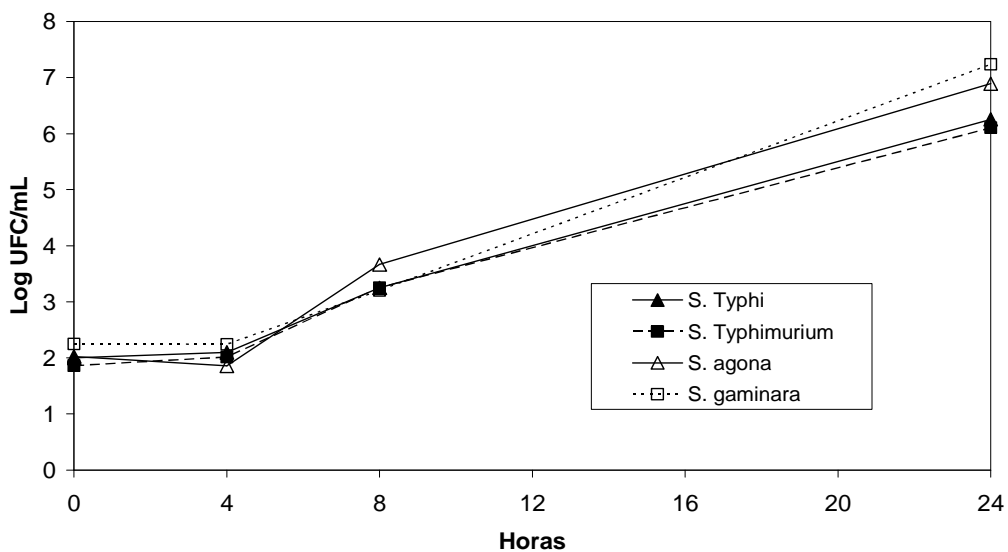
Se observó que la concentración de *V. cholerae* se mantuvo constante en SSI tanto a pH 5.5 como a 7.0 durante al menos 15 días de almacenamiento en refrigeración (Gráfica 7). Este estudio proporciona mas evidencia que refuerzan la hipótesis de la presencia de sustancias anti-vibrio en el jugo de zanahoria las cuales se incrementan durante el almacenamiento del jugo en refrigeración.

**Gráfica 7. Comportamiento de *V. cholerae* en SSI a pH 5.5 y 7.0
almacenado a 4° C**

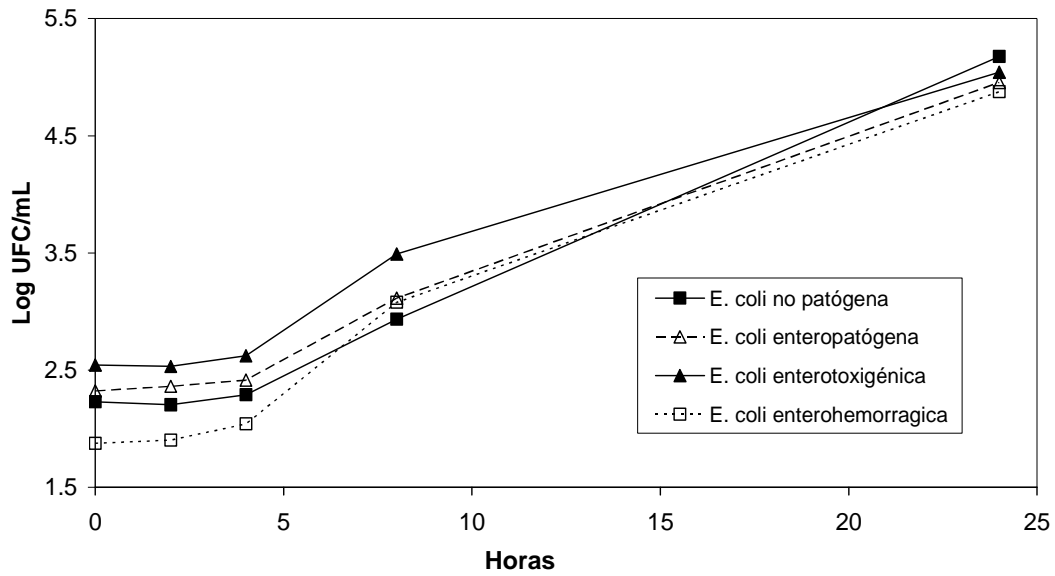


A continuación se investigó el efecto del jugo de zanahoria en el comportamiento de *E. coli* y *Salmonella*. Se observó que a temperatura ambiente ambos microorganismos se multiplicaron alcanzando una concentración máxima de alrededor de 6 y 7 Log UFC/mL a las 24 h para *Salmonella* y *E. coli*, respectivamente (Gráficas 8 y 9). A diferencia, en refrigeración las cepas de los microorganismos no se multiplicaron y su concentración se mantuvo constante (Gráfica 10 y 11).

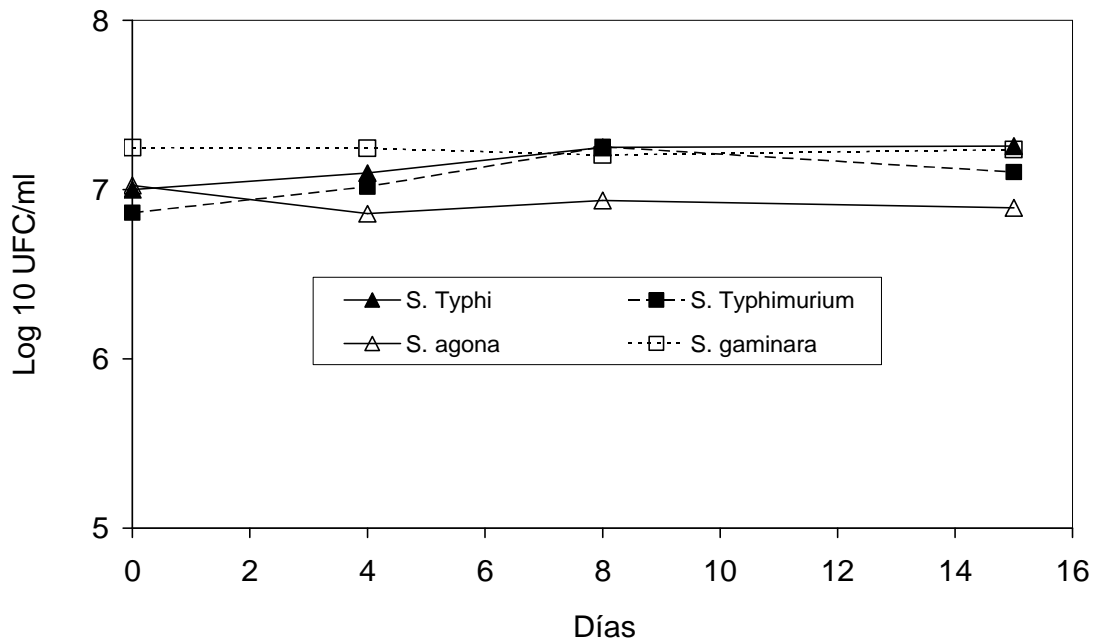
Gráfica 8. Comportamiento de 4 serotipos de *Salmonella* en jugo de zanahoria a 22° C



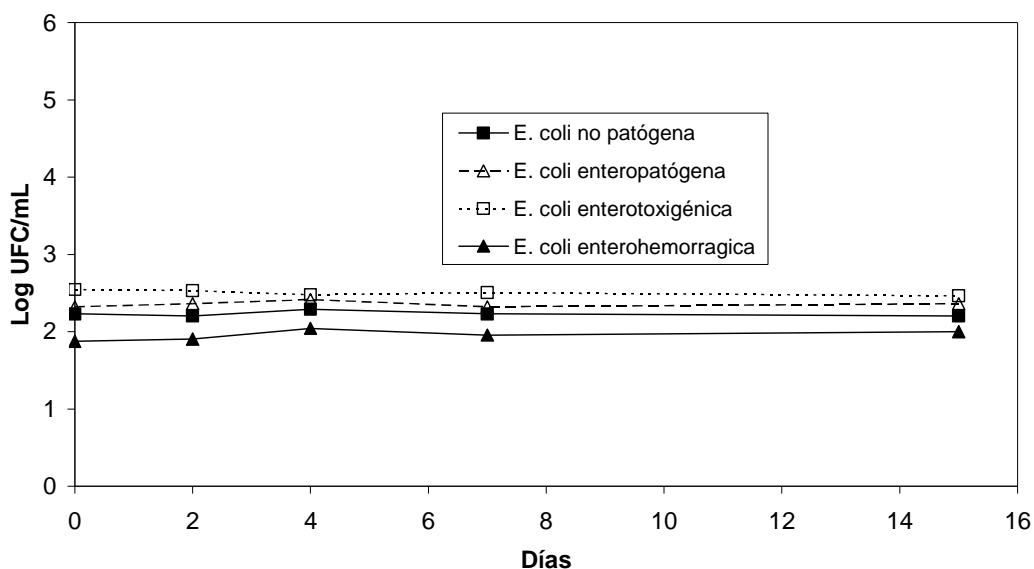
Gráfica 9. Comportamiento de 4 cepas de *E. coli* en jugo de zanahoria a 22° C



Gráfica 10. Comportamiento de 4 serotipos de *Salmonella* en jugo de zanahoria almacenado en refrigeración



Gráfica 11. Comportamiento de 4 cepas de *E. coli* en jugo de zanahoria almacenado en refrigeración



El comportamiento exhibido por *Salmonella* y *E. coli* en el jugo de zanahoria sugiere que las posibles sustancias antimicrobianas no tengan efecto sobre estos microorganismos o bien a la concentración en la que se encuentran en el jugo el efecto es bajo. En consecuencia, es posible que si las sustancias antimicrobianas se concentrasen el efecto se haría evidente.

Se ha reportado que en una fruta o verdura los antimicrobianos pueden encontrarse en mayor concentración en alguna determinada región del fruto, por ejemplo, en la cutícula, floema, xilema o en las semillas. Es posible que en la zanahoria los antimicrobianos se encuentren concentrados en alguna estructura en particular como por ejemplo la epidermis.

Por lo tanto se procedió a concentrar las posibles sustancias antimicrobianas potencialmente presentes en el jugo. La forma que se seleccionó para concentrar las posibles sustancias antimicrobianas de la zanahoria fue realizando extractos con solventes de diferentes polaridades como se menciona en 4.4. En estos estudios, se prepararon extractos obtenidos de tres partes distintas de la zanahoria: epidermis, floema y xilema. Obtenidos los diferentes extractos, se procedió a la ejecución de los ensayos antimicrobianos contra diferentes microorganismos de importancia en alimentos.

No se observó efecto antimicrobiano (EFA) de los extractos de zanahoria contra *Escherichia coli* genérica ni contra los 4 grupos patógenos de *E. coli* examinados (enteropatógeno, enteroinvasivo, enterotoxigénico y enterohemorrágico). En la tabla 5 se presentan los microorganismos que fueron sensibles al efecto antimicrobiano de los extractos evaluados. Por el contrario, un EFA de estos extractos fue observado sobre *L. monocytogenes*, *V. cholerae* O1, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Tabla 5). Se observó que los extractos acetónicos, los de etanol y los de etanol:agua, presentaron el mayor EFA. No obstante, en general los acetónicos mostraron la mayor potencia inhibitoria. Por otro lado, los extractos obtenidos a partir de la epidermis exhibieron mayor poder inhibitorio contra los 5 microorganismos sensibles (Tabla 5). *L. monocytogenes* fue el microorganismo más sensible al efecto de los extractos.

Tabla 5. Efecto de extractos polares y no-polares de jugo de zanahoria en la sobrevivencia de 5 microorganismos

Microorganismo	Origen del extracto	Acetona (A)	Etanol (ET)	Metanol (MT)	Hexano (E)	ET:agua (50:50)	MT:agua (50:50)
<i>L. monocytogenes</i>	Epidermis	99*	50	0	0	50	0
	Floema	50	40	0	0	50	0
	Xilema	30	10	0	0	20	0
<i>V. cholerae</i> O1	Epidermis	80	50	0	0	30	0
	Floema	20	40	0	0	20	0
	Xilema	20	20	20	0	20	0
<i>S. typhimurium</i>	Epidermis	50	50	0	0	50	0
	Floema	20	20	0	0	0	0
	Xilema	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	Epidermis	90	50	0	0	50	0
	Floema	50	20	0	0	20	0
	Xilema	20	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	Epidermis	50	50	0	0	20	0
	Floema	20	0	0	0	0	0
	Xilema	0	0	0	0	0	0

* Porcentaje de UFC inhibidas

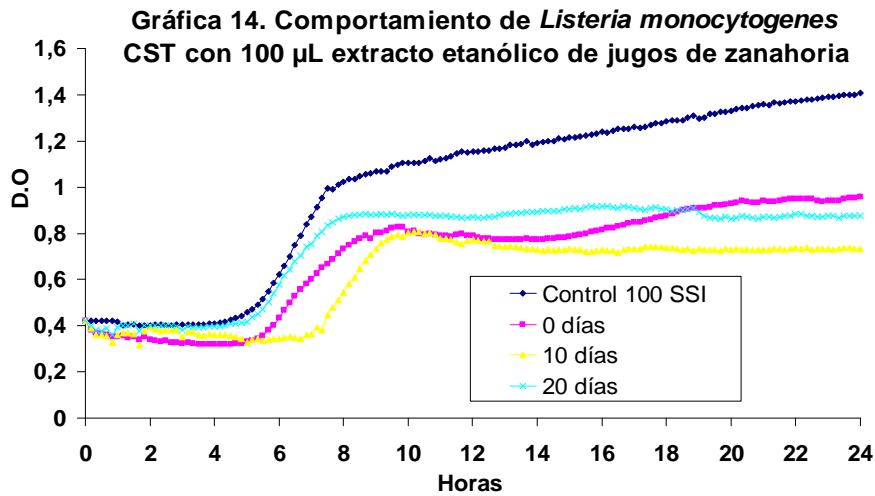
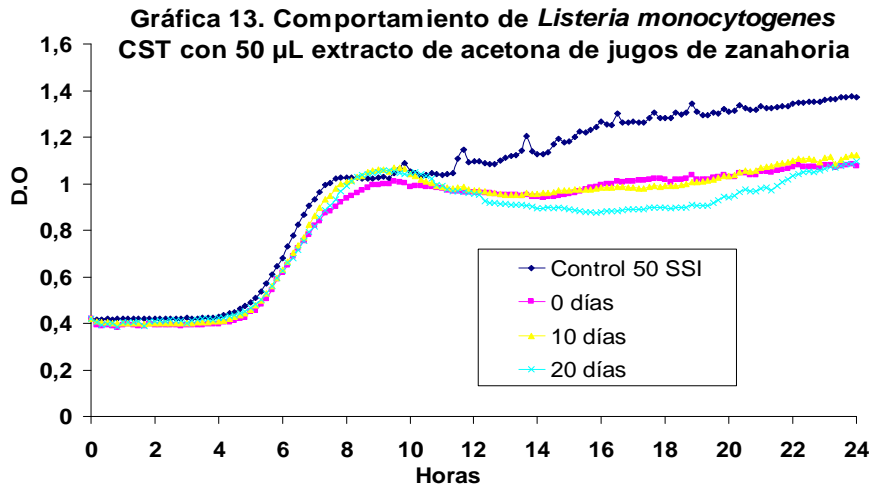
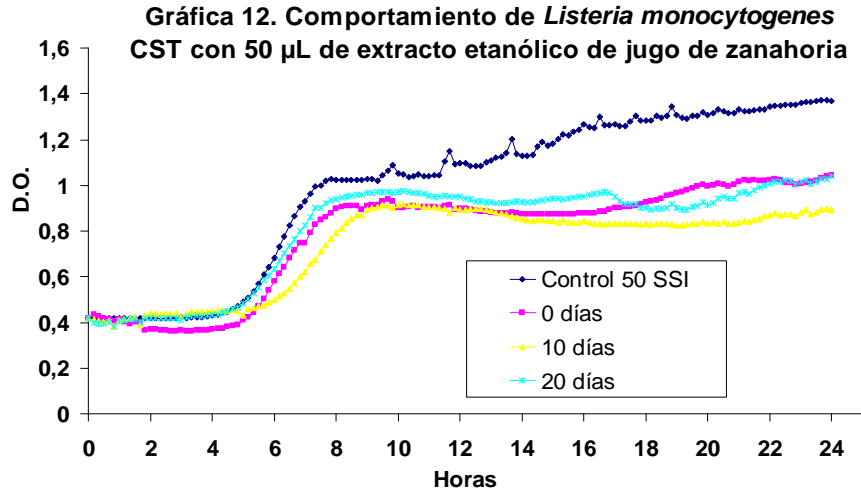
El nulo efecto antimicrobiano observado en *E. coli*, podría considerarse como “normal”; es sabido que generalmente las sustancias antimicrobianas que se encuentran en las plantas tiene un efecto selectivo, es decir, un cierto microorganismo resulta inhibido con diferente magnitud con respecto a otros (Conner,1993). Las zanahorias, como muchos otros vegetales, forman compuestos antimicrobianos, los cuales se encuentran distribuidos en los tallos, hojas, flores frutos y tubérculos. Algunos de ellos como las isocumarinas, se acumulan en la epidermis de la zanahoria y otros como los fenoles en el tallo (Yates, 1982). En el floema y xilema de las zanahorias el contenido fenólico es bajo. El falcarindiol, falcarinol y miristina, también forman parte de los compuestos acetilénicos presentes en la zanahoria; y como se mencionó, estos compuestos han mostrado actividad anti-fúngica o anti-microbiana (Yates, 1982). La fitoalexina 6-metoximeleína (otra sustancia antimicrobiana) es la que se encuentra en mayor cantidad en la cutícula de las zanahorias (Coxon y col., 1973; Goodlife y Heale, 1977).

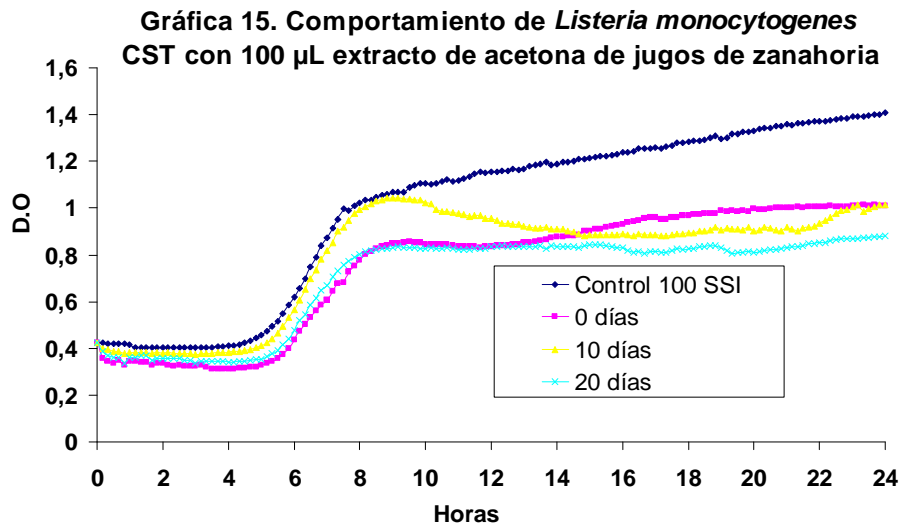
Con estos resultados se efectuó un estudio para conocer el efecto de los extractos acetónicos y etanólicos, obtenidos a partir de jugo de zanahoria con diferentes días de almacenamiento, sobre la cinética de desarrollo de *L. monocytogenes* y *V. cholerae*, debido a que fueron los microorganismos más sensibles.

Es pertinente señalar que hasta el momento los estudios se han realizado inoculando los microorganismos en un medio en donde la cantidad de materia orgánica presente (proteínas, carbohidratos, lípidos) es casi nula, por lo que prácticamente no hay interferentes y por tanto existe un contacto “directo” entre los componentes de la zanahoria con los microorganismos. Es sabido que la materia orgánica afecta negativamente la actividad de los antimicrobianos (Conner, 1993). En tal situación, es posible que en presencia de materia orgánica el efecto antimicrobiano observado con estas fracciones del jugo de zanahoria disminuya ó incluso se cancele. Lo anterior no sería adecuado para el objetivo que se persigue, ya que se pretende obtener antimicrobianos que al adicionarlos al alimento por lo menos retarden de manera significativa el desarrollo ó actividad de los microorganismos. Por tal motivo, se efectuó una

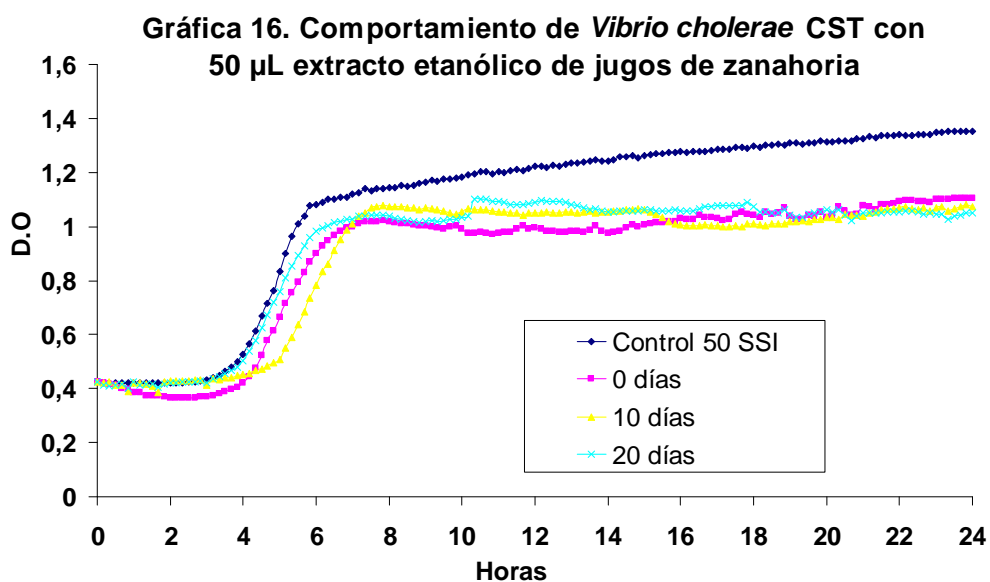
serie de estudios para determinar la influencia de la materia orgánica en el efecto antimicrobiano de los extractos. Para esto, caldo de cultivo [Caldo Soya Trypticaseína (CST)] fue adicionado de extractos acetónicos y etanólicos de la zanahoria, y esta mezcla fue inoculada con los microorganismos de prueba como se describe en la metodología **4.5.2**. Además, se comparó el efecto de extractos obtenidos de jugo fresco de zanahoria y extractos a partir de jugo con diferentes días de almacenamiento debido al comportamiento de *V. cholerae* en los jugos almacenados por 12 días. Se partió del posible, que los extractos obtenidos a partir de jugos con mayor tiempo de almacenamiento tendrían mayor potencial antimicrobiano que los obtenidos del jugo fresco, y por ende afectarían mayormente la cinética de desarrollo de los microorganismos. Para estos estudios, se evaluaron dos concentraciones de extracto 50 y 100 $\mu\text{L}/400$ μL de caldo.

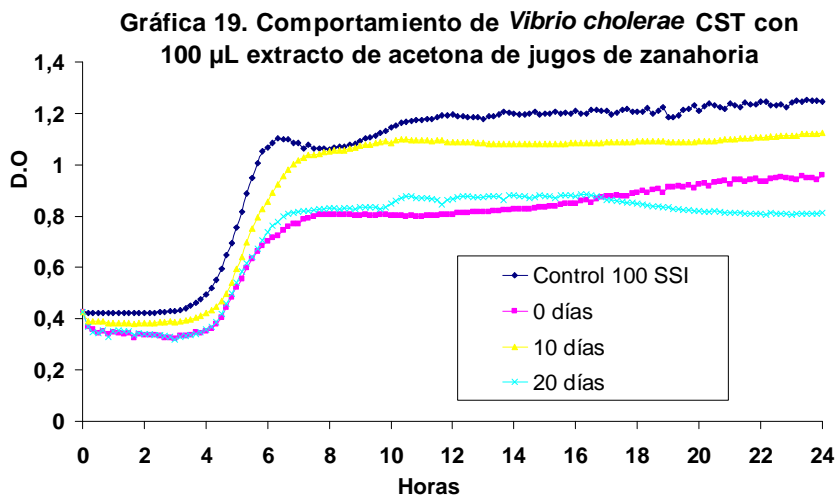
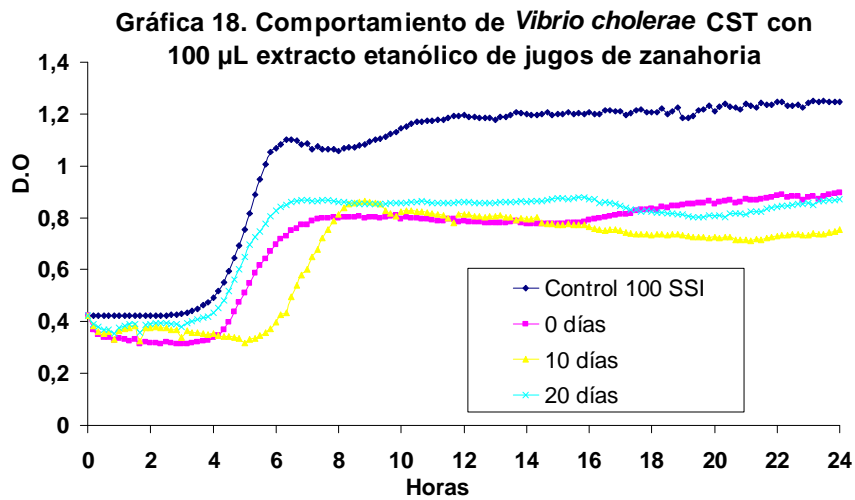
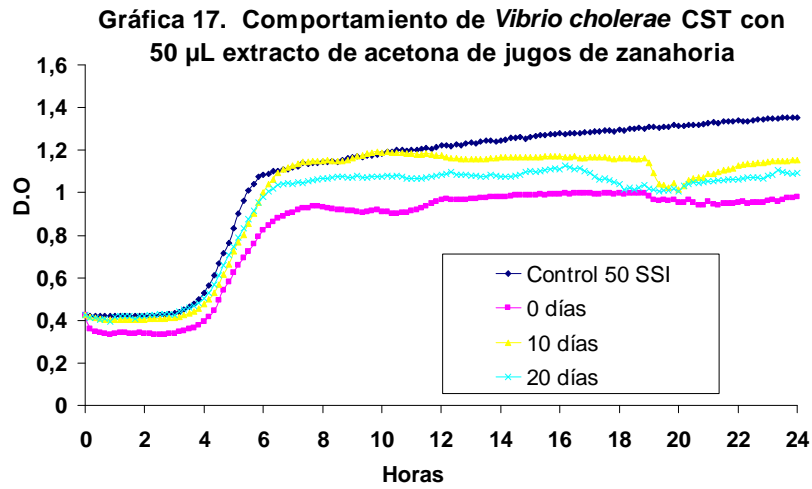
Se observó que los extractos obtenidos con los diferentes solventes a partir de jugo con 10 días de almacenamiento en 4°C , presentaron mayor actividad antimicrobiana como muestran las gráficas 12-19, donde se puede ver el efecto de los extractos sobre la cinética de desarrollo de *L. monocytogenes* y *V. cholerae* en comparación con la su control respectivamente. Se evaluó a dos concentraciones 50 y 100 μL , para observar alguna variación en sus cinéticas de crecimiento. El efecto se manifestó en un incremento en la duración de la fase Lag de los microorganismos y en la concentración final de células que se alcanzó al finalizar la fase logarítmica de desarrollo en comparación del control. En general los extractos etanólicos afectaron en mayor medida el comportamiento de los microorganismos.





Se observó también que a mayor concentración del extracto (100 μ L) en el medio, mayor efecto inhibitorio sobre la cinética microbiana. También se observó que a ésta mayor concentración todavía los extractos etanólicos presentaron mayor actividad antimicrobiana que los acetónicos tanto para *V. cholerae* como para *L. monocytogenes*. Por último, también se denota que los extractos presentaron mayor efecto en la cinética de desarrollo de *L. monocytogenes* que en la de *V. cholerae*.





A pesar del efecto antimicrobiano observado sobre la cinética de desarrollo de los microorganismos, este fue menor al esperado. En consecuencia, se continuó fraccionando los extractos para obtener fracciones con mayor concentración de los agentes antimicrobianos. Para esto, se tomo como base los resultados reportados en la tabla 5. En ese estudio, el mayor efecto antimicrobiano se observó con el extracto acetónico obtenidos de la epidermis. En consecuencia, se fraccionó sólo los extractos acetónicos de la epidermis para obtener una fracción que contuviera los antimicrobianos en mayor concentración.

En este nuevo estudio se obtuvieron 14 fracciones, como se describe en la metodología. Solo 4 fracciones presentaron actividad antimicrobiana contra al menos 1 microorganismo (Tabla 6). La fracción obtenida con la mezcla de acetato de etilo:etanol a una proporción de 70:30, afecto la viabilidad de los 5 microorganismos. Esta fracción inactivó a toda la población de *L. monocytogenes*. El *S. aureus* fue afectado por las 4 fracciones y *P. aeruginosa* solo fue afectado por una fracción (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de las 4 fracciones obtenidas a partir del extracto acetónico en la sobrevivencia de 5 microorganismos.

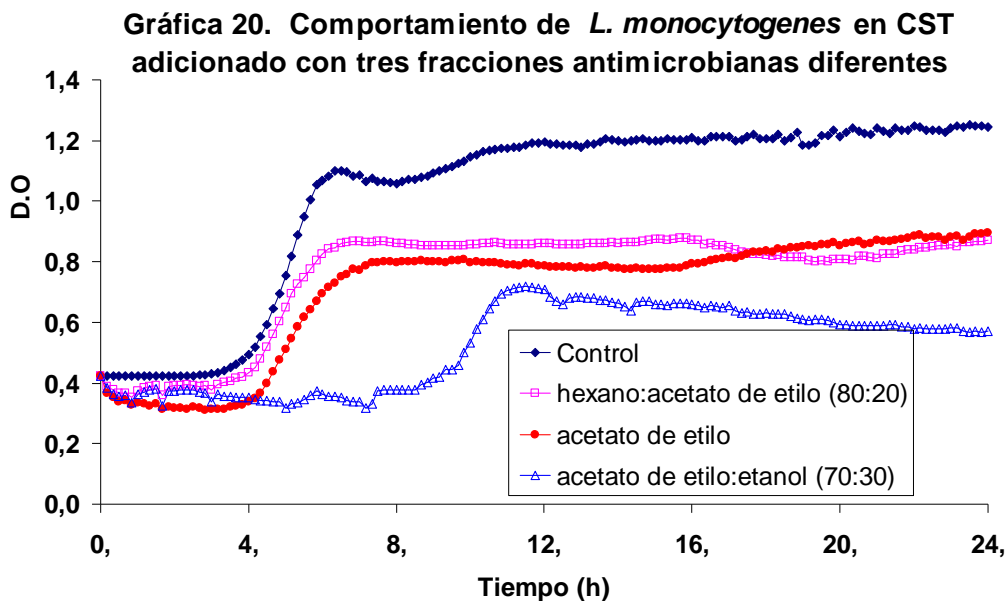
Fracción	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
Acetato de etilo	20*	50	0	0	50
Hexano:Acetato de etilo (80:20)	10	0	30	0	40
Hexano:Acetato de etilo (70:30)	0	0	0	0	10
Acetato de etilo: etanol (70:30)	100	99	50	50	70

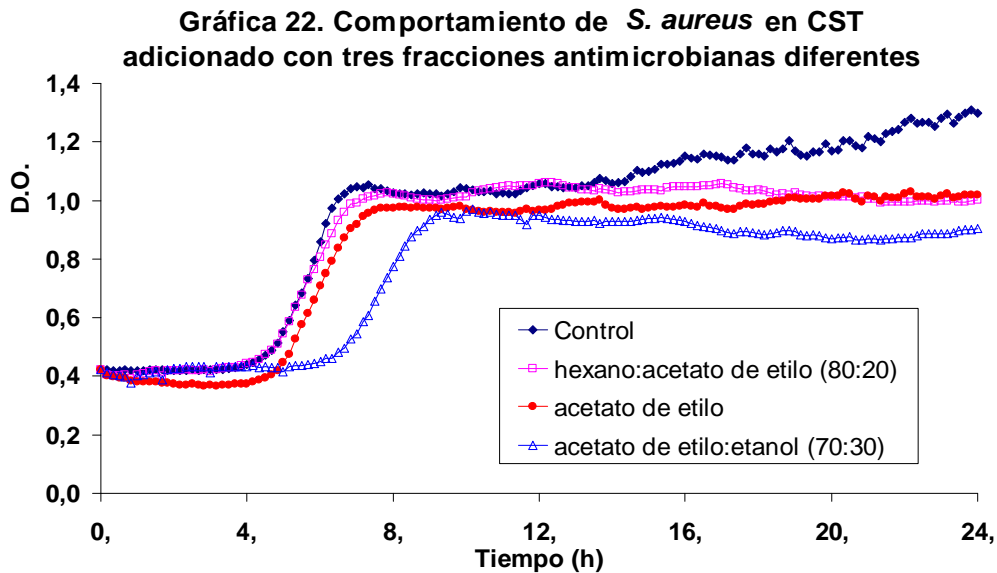
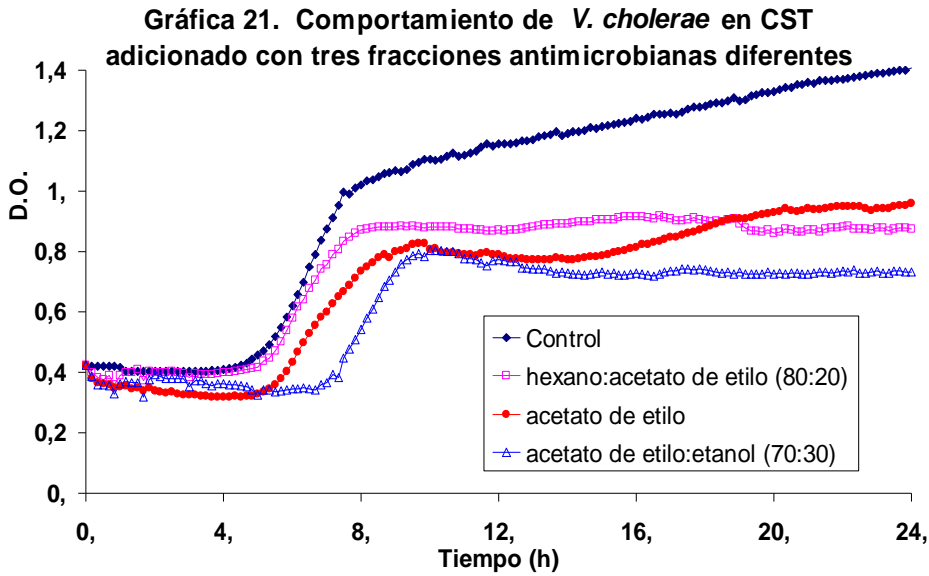
* Porcentaje de UFC inhibidas

Los estudios muestran que en algunas de las fracciones de jugo de zanahoria examinadas existen compuestos capaces de afectar la viabilidad de los microorganismos.

Con estos resultados se procedió a realizar un experimento para determinar el efecto antimicrobiano de las fracciones, sobre la cinética de desarrollo de los 5 microorganismos que resultaron sensibles a las fracciones (Tabla 6). El estudio se realizó como se indica 4.5.1. En este estudio solo se incluyeron 3 fracciones; no se incluyó la obtenida con hexano:acetato de etilo (70:30) debido al limitado efecto antimicrobiano observado (Tabla 6).

En general, a la concentración examinada, las fracciones afectaron significativamente la cinética de desarrollo microbiano (Gráficas 20-24). En todos los casos, al menos una fracción retrasó por lo menos 1 hora el desarrollo microbiano con respecto al control. El mayor efecto se observó con *L. monocytogenes* en donde el desarrollo se retrasó casi 6 horas para la fracción obtenida de acetato de etilo:etanol 70:30 (Gráfica 20).

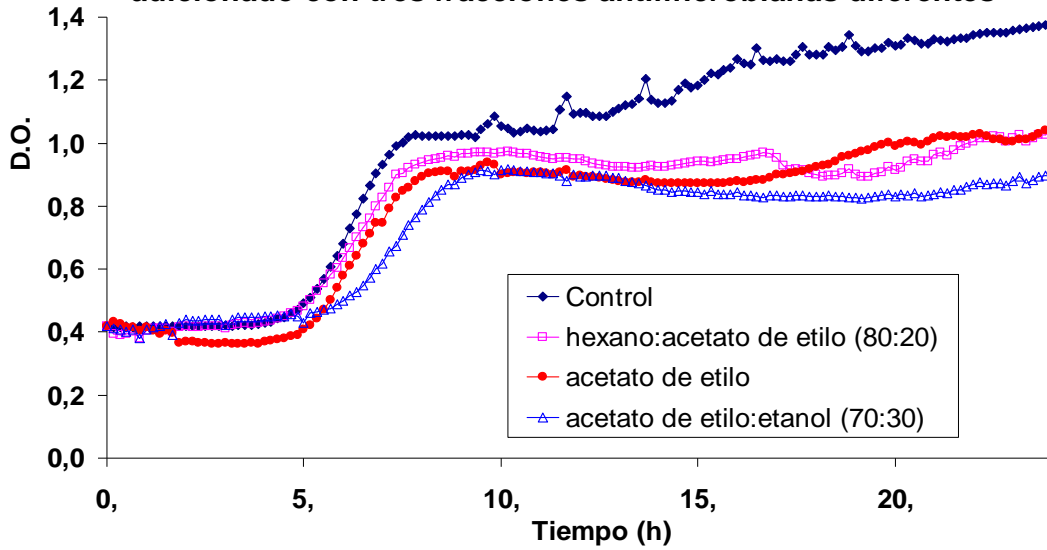




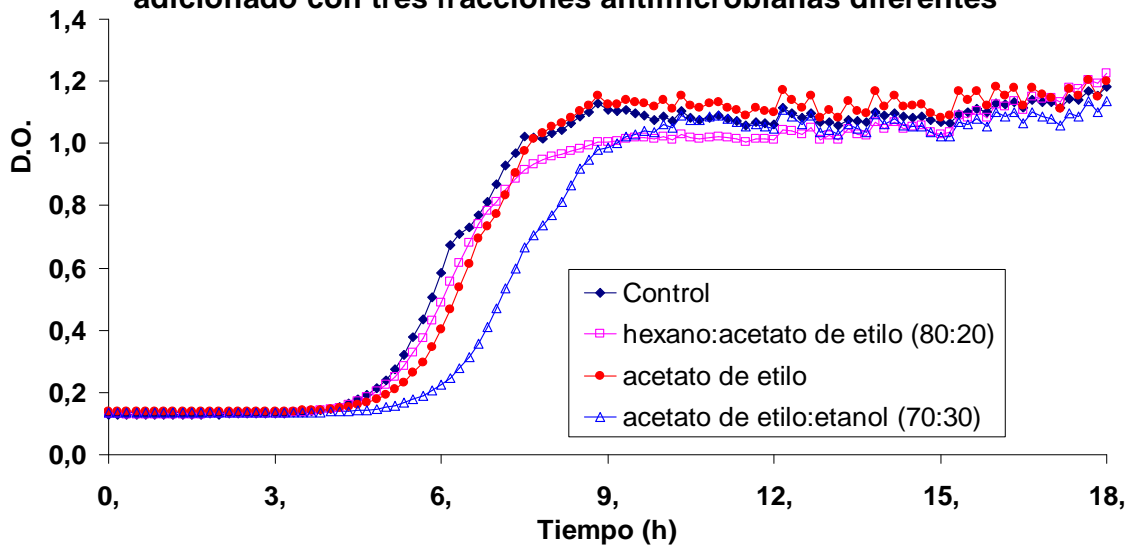
Estos resultados tienen repercusiones importantes, ya que muestran que aun en condiciones óptimas para el desarrollo microbiano, al menos una fracción retrasa de manera considerable el desarrollo microbiano. En las condiciones en las que normalmente los alimentos se producen, transportan, comercializan o almacenan, los microorganismos patógenos ó los deterioradores por lo general no están en un ambiente óptimo para su desarrollo, en consecuencia, aun sin la presencia de antimicrobianos (como los de la zanahoria) su desarrollo se retrasa o limita con respecto al que presentan en condiciones óptimas. En tal situación, se sabe que la presencia de un antimicrobiano en el alimento aun en baja concentración, afecta de sobremanera la actividad de los microorganismos

susceptibles, pudiendo incluso provocarle la muerte; efecto que no se observaría en condiciones óptimas (Frazier y Westhoff, 1988).

Gráfica 23. Comportamiento de *S. Typhimurium* en CST adicionado con tres fracciones antimicrobianas diferentes



Gráfica 24. Comportamiento de *P. aeruginosa* en CST adicionado con tres fracciones antimicrobianas diferentes



VI. CONCLUSIONES

1. El jugo de zanahoria fresco mostró notable efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* tanto en refrigeración como a temperatura ambiente.
2. A excepción de *L. monocytogenes*, todos los demás microorganismos estudiados se multiplicaron en jugo de zanahoria mantenido a 22 °C/24 horas.
3. En jugo almacenado en refrigeración se observó efecto antimicrobiano contra *V. cholerae* O1.
4. *Vibrio cholerae* exhibió una notable inactivación en el jugo de zanahoria a partir del séptimo día de contacto del microorganismo con el jugo almacenado en refrigeración.
5. El efecto anti-vibrio del jugo de zanahoria se mantuvo aún en jugo diluido con solución salina isotónica. El orden de inhibición del *V. cholerae* en jugo diluido fue 10>100>1% de dilución.
6. Se observó que el pH del jugo no fue el responsable del efecto antimicrobiano del jugo.
7. El efecto antimicrobiano del jugo sobre *V. cholerae* se presenta desde los primeros minutos de contacto del microorganismo con el jugo, sin embargo, en las primeras horas éste efecto solo se traduce en un estrés sobre el microorganismo.
8. Extractos obtenidos de la epidermis de la zanahoria mostraron la mayor actividad antibacteriana y los extractos de xilema la menor.
9. Las fracciones de jugo obtenidas a partir del acetato de etilo: etanol mostraron el mayor efecto anti-vibrio.
10. En general, todo el estudio desarrollado sugiere que la zanahoria posee compuestos que afectan la viabilidad y el desarrollo de al menos 5 microorganismos de importancia en alimentos. Los compuestos de la zanahoria podrían ser una alternativa para el desarrollo de antimicrobianos de origen natural (desinfectantes o conservadores) con aplicación en la industria de alimentos o bien en la industria farmacéutica.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abdul-Raouf, U.M., L.R. Beuchat, and M.S. Ammar. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1999–2006.
2. Adam, M.R. Moss, M.G. 1995. *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia. México.
3. Adams M.R., Hartley A.D. and Cox L.J. 1989. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol.*, 6:69-77.
4. Álvarez M.B.L. 1998. Contaminación, sobrevivencia y desarrollo de *Listeria monocytogenes* durante el procesamiento de brócoli precocido y congelado. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
5. Anónimo 2008a. Disponible en http://www.alcentral.com.ar/fh_zanahoria.html.
6. Anónimo 2008b. Disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/sociedad-y-consumo/2006/10/19/25370.php>
7. Askenazi S.T., Cleary, T.G., Murria, B.E., 1988. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. *Infect. Immun.* 56:3089-3094
8. Babic, I.C., C. Nguyen –the, M. J. Amiot and S. Aubert. 1994 .Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on foodborne bacteria and yeast. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 135-141.
9. BAM (Bacteriological Analytical Manual Online). 2001. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
10. Baumann, P. and Shubert, H.W. 1984. Family II. Vibrionaceae Veron 1965, 5245 (AL), En: Krieg NR (de.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volumen 1, William and Wilkins, Baltimore. 516-550.
11. Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1990. Inhibitory effect of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1734-1742.
12. Beuchat, L.R. and Doyle M.P. 1995. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in foods treated or supplemented with carrot juice. *Food Microbiol.* 12: 73-80
13. Beuchat, L.R. and Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology.* 43: 134-142.

-
14. Beuchat, L.R. Brackett, R.E. and Doyle, P.M 1994. Lethality of carrot juice to *Listeria monocytogenes* as affected by pH, Sodium Chloride and Temperature. *J. Food Prot.* 57: 470-474.
 15. Bianchini, F. y Corbetta, F. 1974. Frutos de la Tierra, en: Atlas de las plantas alimenticias., ed. Aedos Barcelona, pp.104.
 16. Bilge, S.S., Vary, J.C. Dowell, S.F. and Tarr, P.i 1996. Role of *Escherichia coli* O157:H7 side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. Immun.* 64:4795-4801
 17. Bourque, A., Cossins, Y. and Gray, B. 1986. Investigation of cholera acquired from de riverine environment in Queensland *Med. J. Austr.* 144: 229-234.
 18. Bryan, F.L 1968. What the sanitarian should know about staphylococci and salmonellae in non dairy products. I. Staphylococci. *J. Milk Food Technol.* 31:110-116
 19. Bryan, F.L 1968b. What the sanitarian should know about staphylococci and salmonellae in non dairy products. II. Salmonellae. *J. Milk Food Technol.* 31:131-140
 20. Bryan, F.L. 1969. Infections due to miscellaneous microorganisms. In food borne infections and intoxications. Ed. H.Riemann,pp223. New York. Acedemic Press.
 21. Buchanan, R.L. and Doyle, M.P. 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E.coli* *Food Technol* 51(10):69-76
 22. Butt, V.S. and Lamb, C.J. 1981. Secondary plant products. In: *The Biochemistry of plants.* Ed.by (Stumpt, P.K. and Conn, E.E.). Academic Press, New York. 7: 656-661.
 23. Callahan, 1974. Purification and characterization of *Pseudomana aeruginosa* exotoxin. *Infect. Immun,* 9:113
 24. Casman, E.P., McCoy, D.W and Brandly, P.J. 1963. Staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. *Appl. Microbiol.* 11:498-450
 25. Castro, R. J. 1997. Factores que afectan la viabilidad de *Vibrio cholerae* O1 en algunos materiales plásticos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

-
26. Castro, R.J. and Fernández, E. 2000. Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprout. *J. Food Sci.* 65: 162-165
 27. Castro-Rosas J. 1998. Algunos factores que afectan la inocuidad microbiana del germinado de alfalfa. Tesis de Maestría. Departamento de Investigación y posgrado en alimentos, Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.
 28. Caudill, F.W. and Meyer, M.A. 1943. An epidemic of food poisoning due to pasteurized milk. *J. Milk Technol.* 6:73-76
 29. Chalutz E, Devay JE, Maxie EC. 1969. Ethylene induced isocoumarin formation in carrot root tissue. *Plant Physiology* 44:235-241.
 30. Clark, W.S. and Nelson, F.E. 1961. Multiplication of coagulase-positive staphylococci in grate A milk samples. *J. Dairy Sci.* 44:232-236
 31. Condor P, Kuc J, Draudt. 1963. Production of 3-methyl-6-methoxy-8-hidroxi-3,4-dehidroisocoumarin by carrot root tissue. *Phytopathology* 53:1244-1250
 32. Conner DE. 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidison PM, Branen AL. *Antimicrobials in foods*. New York : Marcel Dekker. pp. 441-468.
 33. Coxon, D.T. Curtis, R.F. Price, K.R. and Levett, G. 1973. Abnormal metabolites produced by *Daucus carota* roots under conditions of stress. *Phytochemistry* 12: 1881-1885.
 34. Duckworth, R. B. 1968. *Frutas y Verduras*. Ed. Acribia, España. pp. 30-31, 107-131.
 35. Edmond J.B., Senn T.L., Andrews F.S. 1979. *Principios de Horticultura*. C.E.C.S.A. 3 Ed. 476 -478.
 36. Ejechi B.O. and Akpomedaye D.E. 2005. Activity of essential oil and phenolic acid extracts of pepperfruit (*Dennetia tripetala* G. Barker; Anonaceae) against some food-borne microorganisms. *Afr. J. Biotechnol.*, 4 (3): 258-261.
 37. Eley. R. 1992. *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana*. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia.
 38. Estrada, T.M. 2008. Aislamiento, evaluación y caracterización de fracciones antimicrobianas de las diversas partes de la zanahoria. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

-
39. Fernández Escartín, E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Queretaro (ed). México
 40. Fernández Escartín, E., Ayala Castillo and Saldaña Lozano, J. 1989. Survival and growth of Salmonella and Shigella on sliced fresh fruit. *J. Food Prot.* 52:471-473
 41. Fernández Escartín, E., Ayala, A. y Torres Vitela, R. 1983. Destino de Staphylococcus aureus y de Salmonella artificialmente inoculada en la leche cruda durante I elaboración y almacenamiento de quesos frescos no pasteurizados. II. Influencia del pH, de la flora asociada y de nivel original de contaminación del patógeno. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 21:79-86
 42. Filkenstein, R.A. 1973. Cholera. *CRC. Crit. Rev. Microbiol.* 2: 553-623.
 43. Forsythe S.J. and Hayes P.R. 2000. Higiene de los Alimentos, microbiología y HACCP 2da edición. Ed. Acribia. pp. 62, 63, 374, 375, 379.
 44. Frazier W.C, Westhoff D.C. 1988. *Food Microbiology.* 4th Ed. McGraw-Hill Book Co.
 45. Freese, E., Sheu, C.W., and Galliers, E. 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241: 321.
 46. Garrod, B, Lewis, BG and Coxon, DT. 1978 cis-heptadeca-1, 9-diene-4, 6-diyne-3, 8- diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. *Physiol Plant Pathol* 13: 241-246.
 47. Gerh R. 2005. Investigation of Silver Electrochemistry Water Disinfection Applications. McGill University. p. 4, 5.
 48. Goodliffe, J.P. and Heale, J.B. 1977. Factors affecting the resistance of cold-stored carrots to Botrytis cinerea. *Annals of Applied Biology* 87: 17–28. 36: 225–227.
 49. Granados, R.P, y Villaverde, Ma. C.P. 1997. Bacteriología, características y clasificación bacteriana. Virologia, Características y técnicas bioquímicas. Microbiología. Ed. Thomson.
 50. Grün, L. 1974. Pseudomonad-Hospitalism. *Zentralb. Bakteriол. Parasitenk. Infektionkr. Hyg. Abt. 1:Orig Reihe B159:277*
 51. Gunderson, M.F. and Rose, K.D. 1948. Survival of bacteria in a precooked fresh frozen food. *Food Res.* 13:254-263
 52. Guthrie, R.K., Makukutu, C.A. and Gibson, R.W. 1985. Recovery of Vibrio cholerae O1 after heating and/or cooling. *Dairy Food Sanit.* 5: 427-430.
-

-
53. Hackler, J.F. 1939. Outbreak of staphylococcal milk poisoning in pasteurized milk. *Am. J. Pub. Health.* 29:1247-1249
 54. Hardenburg, R.E. 1986. The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. In. *Agriculture Handbook U.S.A.* 66: 55-56.
 55. Harmon S.M., Kautter D.A. and Solomon H.M. 1987. *Bacillus cereus* contamination of seeds and vegetables sprouts grown in home sprouting kit. *J. Food Prot.*, 50:62-65.
 56. Heckly, R.J. 1970. Toxins of *Pseudomona*. In *Microbial Toxins. Vol. III. Bacterial protein toxins.* Ed. T.C. Montie, S.Kadis, and S.J. New York. Acedemic Press. *Ajl.* pp473
 57. Hoadley, A.W., and Butka, B.J. 1976. *Bacterials Indicators. I Health Hazards Associated with water.* American Society For testing and materials. Philadelphia.63:517-527
 58. Hovi, M.S., Sukupolvi, S., Edwards, M.F and Rhen, M. 1988. Plasmid-associated virulence of *Salmonella enteritidis*. *Microlob. Pathogen.* 4:385-391
 59. Jaworski, J.G. Kuc, J. and Williams E.B. 1973. Effect of *Ethrel* and *Ceratocystis fimbriata* on the accumulation of chlorogenic acid and 6-methoxymellein in carrot root. *Phytopathology* 63: 408-413.
 60. Jongen, W.M.F. 2005. *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables.* Publication: Cambridge Woodhead Publishing. <http://www.netlibrary.com/>.
 61. Kaspar, C.W. and Tamplin, M.L. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *App. Environ.*
 62. Kidmose, U., Hansen, S.L., Christensen, L.P., Edelenbos, M., Larsen, E and Norbaek, R. 2004. Effects of Genotype, Root Size, Storage, and Processing on Bioactive Compounds in Organically Grown Carrots (*Daucus carota L.*), Sensory and Nutritive Qualities of Food. 69: 388-394.
 63. Kominos, A.D., Copeland, C.E. Gosiak, B, and Positic, B. 1972. Introduction os *Pseudomonas aeruginosa* in to hospital via vegetables. *Appl. Microbiol.* 24:567.
 64. Koupal, L.R. and Deibel, R.H. 1975. Assay, characterization and localization o fan enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect Immun.* 11:14-22
 65. Kueh, C.S.W. and Chan, K.Y. 1985. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the osyter. *J. Appl. Bacteriol.*59:41-47
-

-
66. Kumate, J., Sepúlveda, J. y Gutiérrez, G. 1993. El Cólera. Epidemias, Endemias y Pandemias. México. Ed. Interamericana, Mc Graw-Hill. 93-111.
67. Laubusch E.J. 1971. Water Quality and Treatment (3rd Ed.). New York: McGraw-Hill Book Company.
68. Levine, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E. and Clements, M.L. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. Microbiol. Rev. 47: 510-550.
69. Mackaness, G.B. 1962. Cellular resistance to infection. J. Exp. Med. 116:381-406
70. Marth, E.H. 1969. Salmonella and salmonellosis associated with milk and milk products. A review. J. Dairy Sci. 52:283-315
71. Mata, L. 1992. El Cólera: Historia, Prevención y Control. Ed. Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
72. McCarthy, S.A, 1992. Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides. Food Technol. 84-87.
73. Mekalanos, J. J., Rubin, J.E., Waldor, K. M. 1997. Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. FEMS Imm. Med. Microbiol.
74. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. ICMSI. 2000. Microbiología de los alimentos Ed. Acribia..
75. Michener, H.D. and Elliot, R.P. 1964. Minimum growth temperatures for food-poisoning, fecal-indicator, and psychrotrophic microorganisms: 349-396. Advances in Food Reserch. Vol 13. Acad. Press Inc.
76. Mossel, D.A.A., García, B.M y Struijk C.B. 2003. Microbiología de los alimentos. 2ª ed. Ed. Acribia.
77. Mossel, D.A.A., García, B.M. 1982. Infecciones alimentarias producidas por bacterias. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia.
78. Oliver, J.D. and Kaper, J.B. 1997. *Vibrio* species: 228-264. In Food microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds). ASM Press, Washington, DC.
79. Panero, C., Grasso, A., La Canza C., Rguzzini, R., and Bosco, G. 1970. Pollution of drinking water and infections caused by *Pseudomona aeruginosa* in a paediatric ward for immature babies. Giornale di Bacteriología Virología, Inmunología.
-

-
80. Pederson, C.S. 1971. Vegetable juices. In: Fruit and Vegetable Juice Processing Technology, ed. Tressler, D.K. and Joslyn, M.A. AVI Publishing Westport, Connecticut, 461-481.
81. Ramírez T.L.A. 2008. Frecuencia y comportamiento de organismos indicadores de higiene y Salmonella en jugo de betabel. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
82. Ravel, J., Knight, T.I., Monahan, E.C. Hill, T.R. Colwell, R.R. 1995. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microb.* 141: 337-343.
83. Roller S. 2003. Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Woodhead Publishing. Cambridge, England.
84. Roser, E.M. and Marth, E.H. 1991a. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 21, and 35°C. *J. Food Prot.* 50:452-559.
85. Roser, E.T. and Marth, E.H. 1991b. *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Marcel Dekker, Inc. N.Y.
86. Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, Jp., 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J. Food Prot.* 59:944-949
87. Shooter, R.A; Cooke, E.M; Gaya, H. Kumar, P; Patel, N; Parker, M.I.; Thom, B.T; and Fance, D.R. 1969. Food and medicaments as possible sources of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 1:1227.
88. Snowdon, A. L. 1992. Carrots and parsnips. In: Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. 2: 268-271.
89. Thatcher, F.C. and Ross, D. 1960. Multiplication of staphylococci during cheese making. The influence of milk storage temperatures and of antimicrobials. Canada. *J. Pub. Health.* 51:226-234
90. Toth, I., Cohen, M.L., Rumschlag, H.S., 1990. Influence of the 60-megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. *Infect. Immun.* 58:1223-1231
91. Tzipori, S., Wachsmuth, I.K., Champman, C., et al. 1986. The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J. Inf. Dis.* 154:712-716
-

-
92. Valadez, López A. 1994. Producción de Hortalizas. Ed. Limusa, México, 109-125.
 93. Van Veen, A.G. 1967. "The bongkrek toxins in mateles. R.I and Wogan, G.N. Biochemistry of foodborne. Microbial Toxins. Cambridge. MA:MIT Press.43-56
 94. Wagner, M.K. and Moberg, L.J. 1989. Present and Future Use of Traditional Antimicrobials. Food Technol. 143.147.
 95. White, P.B. 1938. The rugose variant of vibrios. J. Pathol. Bacteriol. 46:1-6
 96. Whittman, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. Infect. Immun. 61:1619-1629
 97. WHO (World Health Organization). 2001. Food safety and foodborne illness. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>
 98. Woodburn, M.J. and Strong, D.H. 1960. Survival of *Salmonella thiphymurium*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* frozen in simplified food substrates. Appl. Microbiol. 8:109-113
 99. Yates, S.G., and England, R.E. 1982. Isolation and Analysis of Carrot Constituents: Myristicin, Falcarinol, and Falcarindiol. J. Agric. Food Chem. 30: 317-320.
 100. Young, V.M. 1977. *Pseudomonas aeruginosa*: Ecological Aspects and Patient Colonization. Raven Press, New York.