

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“EVALUACION DE MICROORGANISMOS INDICADORES EN
SUPERFICIES DE CONTACTO CON ALIMENTOS EN PLANTAS DE
EMPAQUE DE MANZANAS DEL ESTADO DE WASHINGTON”**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL
TÍTULO DE INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

BLANCA ELIA RUIZ LLACSAHUANGA

LIMA - PERÚ

2022

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 - Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“EVALUACION DE MICROORGANISMOS INDICADORES EN
SUPERFICIES DE CONTACTO CON ALIMENTOS EN PLANTAS DE
EMPAQUE DE MANZANAS DEL ESTADO DE WASHINGTON”**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Presentada por:

BLANCA ELIA RUIZ LLACSAHUANGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Marcial Ibo Silva Jaimes

PRESIDENTE

Mg.Sc. Carlos Elías Peñafiel

MIEMBRO

Mg.Sc. Beatriz Hatta Sakoda

MIEMBRO

Dra. Patricia Glorio Paulet

ASESORA

Lima-Perú

2022

Dedicatoria

A mi familia: Mamá Maria Julia, Papá Axel G., Hermana Ketty, Hermano Axel D.

Por todo su amor y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Faith Critzer, jefa del laboratorio de Inocuidad de Alimentos de Washington State University, por su excelente mentoría y la oportunidad de realizar esta investigación bajo su dirección.
- A la Dra. Patricia Glorio Paulet, por su apoyo y dirección durante la elaboración y revisión de esta monografía.
- A Washington Tree Fruit Research Commission por financiar económicamente esta investigación, además de colaborar en el reclutamiento de plantas de empaque de manzanas.
- A las cinco plantas de empaque de manzana del estado de Washington que siempre estuvieron dispuestas a colaborar en todos los días de muestreo.
- A mis compañeros de laboratorio y muestreo: Critzer crew! por toda su ayuda durante los días de muestreo y procesamiento de muestras.
- A mi familia y amigos en Perú, por sus continuas muestras de amor y apoyo a la distancia.
- A todos mis amigos de Washington y Georgia por todo su apoyo durante todos estos años de estadía en EE.UU.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Microorganismos indicadores	3
2.1.1.	Aerobios mesófilos totales	4
2.1.2.	<i>Enterobacteriaceae</i>	4
2.1.3.	Coliformes.....	5
2.1.4.	<i>Escherichia coli</i>	6
2.2.	Uso de microorganismos indicadores en la industria de productos agrícolas frescos	6
2.3.	Límites microbiológicos aceptables de microorganismos indicadores según normas nacionales e internacionales en productos agrícolas frescos.....	8
2.4.	Métodos tradicionales para la evaluación de limpieza y desinfección de superficies	8
2.5	Métodos tradicionales para la evaluación de limpieza y desinfección de superficies	11
2.5.1	Placas Petrifilm	11
2.6	Métodos rápidos para la evaluación de limpieza y desinfección de superficies	12
2.6.1	Prueba de Bioluminiscencia.....	12
2.7	Rutas de contaminación microbiana en la industria de empaque de manzanas frescas.....	13
III.	METODOLOGÍA	15
3.1.	Lugar de Ejecución	15
3.2.	Superficies muestreadas	15
3.3.	Materiales, Equipos y Reactivos	15
3.4.	Métodos de Análisis	16
3.5.	Metodología Experimental.....	17
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	30
4.1	Recuentos de microorganismos indicadores	30
4.1.1	Aerobios mesófilos totales	34
4.1.2	<i>Enterobacteriaceae</i>	35

4.1.3	Coliformes.....	36
4.1.4	<i>Escherichia coli</i>	36
4.2	Límites microbiológicos recomendados según regulaciones nacionales e internacionales	37
4.3	Aplicación de las competencias profesionales.....	39
V.	CONCLUSIONES	42
VI.	RECOMENDACIONES	43
VII.	BIBLIOGRAFÍA	44
VIII.	ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límites microbiológicos de microorganismos indicadores aceptables según normas nacionales e internacionales	9
Tabla 2. Número y tipos de superficies de contacto con alimentos seleccionadas en cada operación unitaria del proceso de empaque de manzanas	23
Tabla 3. Ejemplos de superficies de contacto con alimentos muestreados en las plantas de empaque de manzanas	24
Tabla 4. Población promedio de microorganismos indicadores (Promedio \pm desviación estándar) (Log UFC/100 cm ²) en cada operación unitaria del proceso de empaque de manzanas	31
Tabla 5. Población promedio de microorganismos indicadores (Log UFC/100 cm ²) por superficie en el proceso de empaque de manzanas.....	32
Tabla 6. Límites microbiológicos recomendados en superficies de contacto con alimentos en plantas de empaque de manzanas luego de procedimientos de limpieza y desinfección ...	38
Tabla 7. Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en el desempeño laboral.....	40
Tabla 8. Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en la evaluación de microorganismos indicadores	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de empaque de manzanas.....	18
Figura 2. Operación unitaria de lavado	19
Figura 3. Operación unitaria de lavado/enjuague/desinfección.....	19
Figura 4. Operación unitaria de secado por ventiladores	20
Figura 5. Operación unitaria de encerado.....	20
Figura 6. Operación unitaria de secado por túnel.....	21
Figura 7. Operación unitaria de clasificación	21
Figura 8. Operación unitaria de empacado.....	22
Figura 9. Esquema de protocolo de procesamiento de muestras para el recuento de microorganismos indicadores	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. NÚMERO DE SUPERFICIES MUESTREADAS SEGÚN TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE MANZANAS, ESTACIÓN DEL AÑO EN QUE SE REALIZÓ EL MUESTREO Y OPERACIÓN UNITARIA DEL PROCESO DE EMPAQUE DE MANZANAS	53
ANEXO 2. LÍMITE SUPERIOR DE CONTROL (LSC) DE RECuentOS DE AEROBIOS MESÓFILOS TOTALES EN SUPERFICIES DE CONTACTO CON ALIMENTOS DE PLANTAS DE EMPAQUE DE MANZANA LUEGO DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN.....	54
ANEXO 3. LÍMITE SUPERIOR DE CONTROL (LSC) DE RECuentOS DE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> EN SUPERFICIES DE CONTACTO CON ALIMENTOS DE PLANTAS DE EMPAQUE DE MANZANA LUEGO DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN.....	55
ANEXO 4. LÍMITE SUPERIOR DE CONTROL (LSC) DE RECuentOS DE COLIFORMES EN SUPERFICIES DE CONTACTO CON ALIMENTOS DE PLANTAS DE EMPAQUE DE MANZANA LUEGO DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN	56
ANEXO 5. LÍMITE SUPERIOR DE CONTROL (LSC) DE RECuentOS DE <i>E. COLI</i> EN SUPERFICIES DE CONTACTO CON ALIMENTOS DE PLANTAS DE EMPAQUE DE MANZANA LUEGO DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN ...	57
ANEXO 6. EJEMPLO DE CÁLCULO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN PLACAS PETRIFILM	58

RESUMEN

El estado de Washington es el primer productor de manzanas en los Estados Unidos (EE. UU). El incremento de brotes alimentarios y retiros de producto del mercado causados por contaminación cruzada entre manzanas frescas y superficies de contacto con alimentos han incrementado las medidas de inocuidad alimentaria en la industria de empaque de manzanas. Los microorganismos indicadores son usados para el monitoreo de higiene a través de la validación de procedimientos de limpieza y desinfección de superficies. Sin embargo, actualmente no existen estándares que definan límites microbiológicos para un nivel aceptable de microorganismos indicadores en superficies de contacto con alimentos. Por ello, los objetivos de esta investigación fueron determinar la población promedio y límites microbiológicos de microorganismos indicadores como aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae*, coliformes y *Escherichia coli* en superficies de contacto con alimentos luego de procedimientos de limpieza y desinfección en cinco plantas de empaque de manzanas del estado de Washington, EE. UU. Además, evaluar los recuentos microbiológicos a través de cada operación unitaria y tipo de superficie. Se muestrearon 741 superficies pertenecientes a todo el proceso de empaque de manzanas durante una temporada de empaque (setiembre 2018 – julio 2019). El análisis microbiológico se realizó mediante el recuento en placas Petrifilm 3M™. Se establecieron los rangos de límites microbiológicos (Log UFC/100 cm²) de todos los microorganismos indicadores a través de cada operación unitaria del proceso de empaque de manzanas. Respecto al recuento de aerobios mesófilos totales, las operaciones unitarias de encerado y segundo secado por túnel mostraron valores significativamente mayores a la operación de lavado. En cuanto a las poblaciones de *Enterobacteriaceae* y coliformes, se obtuvieron mayores recuentos en las operaciones de lavado y desinfección. Los recuentos de *E. coli* fueron bajos en todas las operaciones unitarias y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Palabras clave: Aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae*, coliformes, *E. coli*

ABSTRACT

Washington state is the leading producer of apples in the United States (US). The increasing association of foodborne outbreaks and recalls of fresh apples caused by cross-contamination between food contact surfaces of equipment used for packing and fresh apples, have emphasized the focus on food safety interventions within the apple packing industry. Indicator organisms are used for hygiene monitoring of surfaces, through the validation of cleaning and disinfection procedures. However, there are currently no standards that define microbiological limits for an acceptable level of indicator organisms on food contact surfaces. Therefore, the objectives of this research were to determine the average population and microbiological limits of indicator organisms such as aerobic plate count, *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia Coli* on food contact surfaces after cleaning and sanitation procedures in five commercial apple packing facilities located in Washington State, US. In addition, to assess those microbial counts throughout each unit operation of the packing process and by type of surface. Overall, 741 surfaces belonging to all unit operations were sampled during a whole packing season (september 2018 – july 2019). Microbiological analysis was performed using 3M™ Petrifilm plates. Ranges of microbial counts (Log CFU/100 cm²) were established for each indicator organism throughout each unit operation of the apple packing process. In regard to aerobic plate counts, the waxing and second tunnel drying unit-operations showed significantly higher values than the washing operation. Higher *Enterobacteriaceae* and coliforms populations were obtained in the washing and sanitation unit operations. *E. coli* counts were low throughout all unit operations and no statistically significant differences were found between them.

Key words: Aerobic plate count, *Enterobacteriaceae*, coliforms, *E. coli*

I. INTRODUCCIÓN

Desde el año 2014, el incremento de brotes alimentarios (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2015; Marus et al., 2019) y el retiro de productos del mercado (U.S Food and Drug Administration, 2017b, 2017c, 2019, 2020) asociado con manzanas frescas, junto con la implementación de la nueva regulación “Acto de Modernización Seguridad Alimentaria” (por sus siglas en inglés FSMA) en los Estados Unidos (EE. UU) han intensificado las medidas de inocuidad alimentaria en la industria de empaque de manzanas. El brote de listeriosis del año 2014 asociado con el consumo de manzanas acarameladas y manzanas frescas causó siete muertes y 34 hospitalizaciones en los EE. UU, impactando significativamente a la industria de manzanas frescas. La causa principal de este brote alimentario fue una contaminación cruzada entre superficies de contacto con alimentos como cepillos de pulido, cintas transportadoras, y contenedor de manzanas dentro de una planta de empaque de manzanas (Angelo et al., 2017). Desde entonces se puso en evidencia que la deficiencia de procedimientos de limpieza y desinfección pueden causar contaminación cruzada y desencadenar así un brote alimentario. Estas situaciones representan problemas de salud pública y pérdidas económicas que afectan la cadena de suministros en la industria de manzanas. Se ha demostrado que una de las medidas para el efectivo control de patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes* en plantas de procesamiento de alimentos es mantener un estricto programa de higiene y saneamiento (Hoelzer et al., 2012; Wu et al., 2020). Así, de manera preventiva se busca minimizar las condiciones que promuevan el establecimiento y proliferación de este patógeno en superficies de contacto con alimentos (Tortorello, 2003; U.S Food and Drug Administration, 2017a).

Los microorganismos indicadores se definen como un organismo o grupo de microorganismos, cuya presencia en números que sobrepasen los límites establecidos indican una falla en los procedimientos de limpieza y desinfección (Cordier, 2013). Por ello, los microorganismos indicadores son ampliamente usados en la industria alimentaria para el monitoreo y validación de higiene. Algunos ejemplos de microorganismos indicadores son aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae*, coliformes y *Escherichia coli* (Moberg & Kornacki, 2015). La evaluación de estos microorganismos indicadores es imprescindible como parte de un programa de monitoreo ambiental con el fin de verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza y saneamiento en superficies (De Oliveira Mota et al., 2021;

Magdovitz et al., 2020; Ruiz-Llacsahuanga et al., 2021). No se recomienda la evaluación directa de patógenos como *L. monocytogenes* debido a que los resultados pueden ser engañosos. Los patógenos se encuentran en baja frecuencia y no distribuidos uniformemente. Además, los métodos de detección son más costosos y se requiere de mayor tiempo para obtener resultados (Moberg & Kornacki, 2015; U.S Food and Drug Administration, 2017a). El estado de Washington es el principal productor de manzanas en los EE. UU, con un 79% de su producción destinada al mercado fresco (U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service, 2019). Por ello, es esencial implementar controles preventivos de limpieza y desinfección efectivos y límites microbiológicos a través de todo el proceso de empaque de manzanas, con el fin de prevenir una contaminación cruzada entre superficies y la fruta a empacar. Actualmente, no existen estándares que definan límites microbiológicos para un nivel aceptable de microorganismos indicadores en superficies de contacto con alimentos. En consecuencia, cada tipo de industria o planta de alimentos debe construir sus propios límites microbiológicos para validar sus procedimientos de limpieza y desinfección. Por lo tanto, el objetivo general de esta investigación fue determinar la población promedio y los límites microbiológicos de microorganismos indicadores como aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae*, coliformes y *E. coli* en superficies de contacto con alimentos de equipos utilizados en el empaque de manzanas en cinco plantas de empaque de manzanas del estado de Washington, EE. UU, luego de procedimientos de limpieza y desinfección.

Para ello se tuvo como objetivos específicos:

- Identificar las operaciones unitarias con la mayor población de microorganismos indicadores en el proceso de empaque de manzanas.
- Identificar las superficies de contacto con alimentos con la mayor población de microorganismos indicadores en el proceso de empaque de manzanas

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Microorganismos indicadores

Los microorganismos indicadores se definen como microorganismos, grupos de microorganismos o metabolitos cuya presencia en números por encima de los límites definidos indicaría una falla en el cumplimiento de Buenas Prácticas de Higiene. Los microorganismos indicadores tienen la función de indicar una desviación de las medidas de control de higiene implementadas (Cordier, 2013). A la vez, algunos grupos de microorganismos indicadores pueden ser utilizados como microorganismos índices, es decir, como predictores de la presencia de un patógeno (microorganismos índices e indicadores a la vez) (Cordier, 2013). Algunos ejemplos de microorganismos indicadores son recuentos de aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae*, coliformes, *E. coli*, *Listeria* especies, levaduras y mohos (Moberg & Kornacki, 2015).

Los microorganismos indicadores generalmente se utilizan para evaluar los procesos de limpieza y desinfección debido a que están presentes en poblaciones más altas que los patógenos, se pueden obtener resultados dentro de 24 a 48 h, y los métodos de detección son sencillos (Baylis et al., 2011). Los factores que deben considerarse antes de seleccionar qué microorganismos indicadores se evaluarán son (Moberg & Kornacki, 2015):

- La naturaleza fisicoquímica del producto alimentario
- La microflora nativa del producto
- El grado de procesamiento del alimento
- El efecto que se esperaría que tuviera el procesamiento en uno o más de los microorganismos indicadores evaluados
- La fisiología de los microorganismos indicadores
- La precisión con la que el método de prueba puede identificar los microorganismos indicadores

2.1.1. Aerobios mesófilos totales

El recuento de aerobios mesófilos totales cuantifica todas las bacterias que crecen en condiciones aerobias y a temperaturas mesofílicas (20-45 °C) (Ryser & Schuman, 2015). Dentro del grupo de microorganismos mesofílicos, también se encuentran las bacterias psicotróficas, que se definen como bacterias que pueden crecer a temperaturas refrigeradas (0-7 °C), y que tienen una temperatura de crecimiento óptimo a temperaturas superiores a 20°C (Da Silva et al., 2013).

Los microorganismos aerobios mesófilos totales proveen un estimado total de la población microbiana presente en la superficie y puede ser monitoreado antes y después de los procedimientos de limpieza y desinfección para medir su eficacia (Ginny Moore, 2003). Sin embargo, estos microorganismos indicadores no pueden distinguir los tipos de bacteria que están presentes, además de que no especifican la presencia o ausencia de un patógeno alimentario o toxina por lo tanto no son indicadores de inocuidad alimentaria (Ryser & Schuman, 2015).

2.1.2. *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está conformada por microorganismos Gram-negativos y anaerobios facultativos. Estos microorganismos tienen la habilidad de fermentar glucosa a ácido, y entre otras características bioquímicas posee reacciones de oxidasa – negativa, catalasa-positiva y reducen nitrato. Algunas especies son motiles, mientras que otras poseen flagelos (Kornacki et al., 2015).

Las especies de *Enterobacteriaceae* se pueden encontrar tanto en fuentes intestinales como no intestinales en animales y humanos. Por ello, la presencia de microorganismos de esta familia no está asociados directamente con contaminación fecal (Baylis et al., 2011). La familia *Enterobacteriaceae* incluye a los coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* dentro de éste. Por lo tanto, los recuentos de *Enterobacteriaceae* deben ser mayores que las poblaciones de Coliformes y *E. coli* (Baylis et al., 2011).

Otros géneros incluidos dentro de la familia *Enterobacteriaceae* son *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, etc. (Adeolu et al., 2016). Los patógenos transmitidos por alimentos que están incluidos dentro del grupo *Enterobacteriaceae* son *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, y varias especies patogénicas de *E. coli*, incluyendo *E. coli* O157: H7. Sin embargo, la detección de *Enterobacteriaceae* no significa necesariamente la presencia de ninguno de estos patógenos (Baylis et al., 2011).

El uso de *Enterobacteriaceae* como microorganismos indicadores son útiles debido a que estos tienen la habilidad de establecerse en superficies donde los procedimientos de limpieza y desinfección son inadecuados. Además, los químicos usados para la desinfección pueden fácilmente inactivar estos microorganismos (Kornacki et al., 2015). La ausencia de microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* es también usado como un indicador de buenas prácticas de manufactura. Sin embargo, las especies de *Enterobacteriaceae* están ampliamente distribuidos en el ambiente por lo que se espera que estén presentes en productos agrícolas como parte de la microflora natural (Samish et al., 1963).

2.1.3. Coliformes

Los coliformes son microorganismos Gram-negativos, anaerobios facultativos, no esporulados (Kornacki et al., 2015) que fermentan lactosa con producción de ácido y gas dentro de 48 horas de incubación a 35 °C (Kornacki et al., 2015). Estos microorganismos se encuentran en el medio ambiente, suelo, y tracto gastrointestinal de animales y humanos (Baylis et al., 2011).

Los coliformes son usados como microorganismos indicadores en la industria alimentaria para validar la efectividad de procedimientos de limpieza y saneamiento (Ginny Moore, 2003). Dentro de los coliformes se incluyen especies que no son necesariamente asociadas con la presencia de contaminación fecal. Específicamente, los coliformes de tipo fecales son asociados con contaminación fecal y a diferencia de los coliformes, estos fermentan lactosa a una temperatura de 45 °C (Feng et al., 2018).

2.1.4. *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa y posee forma de bastón. Este microorganismo está generalmente presente el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Bell & Kyriakides, 2009; Odonkor & Ampofo, 2013). Por ello, *E. coli* es usado como un indicador de contaminación fecal en la industria de alimentos y agua (Feng et al., 2018).

Algunas especies como *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, *E. coli* verotoxigénica, *E. coli* enteropatógena son patógenos alimentarios. Sin embargo, las pruebas para la evaluación de *E. coli* como un indicador organismo evalúan solo *E. coli* genérico y no un patógeno específico.

En el caso de productos crudos, *E. coli* es considerado como el indicador de contaminación fecal más válido. Aunque debido a la naturaleza ubicua de *E. coli* en el medio ambiente, éste también puede ser encontrado en agua de riego, suelo, y bio aerosoles (Brandl, 2006; Van Elsas et al., 2011), siendo no necesariamente indicadores directos de contaminación fecal. *E. coli* es un buen indicador de la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección y puede ser controlado en el campo mediante el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Agricultura. Además, los programas de limpieza y desinfección deberían ser suficientes para evitar el crecimiento y establecimiento de *E. coli* en las líneas de procesamiento (United Fresh Produce Association, 2018).

2.2. Uso de microorganismos indicadores en la industria de productos agrícolas frescos

En un ambiente de procesamiento de productos agrícolas frescos se sugiere monitorear varios microorganismos indicadores (Heredia et al., 2016). Los productos frescos abarcan una amplia gama de diferentes propiedades biológicas (microbiota natural), propiedades químicas (ej., pH y Aw) (Moberg & Kornacki, 2015) y las propiedades físicas de frutas y verduras, que afectan la forma en que los microorganismos se transfieren a las superficies de los equipos e instalaciones (Heredia et al., 2016). Otro factor que influye en la presencia de un microorganismo indicador en las instalaciones de empaque de productos es la operación unitaria en la que se toma la muestra (Kornacki et al., 2015).

En los productos frescos, las altas poblaciones de estos microorganismos no significan baja calidad del producto. Sin embargo, después de pasos como el lavado o la desinfección, que se llevan a cabo con el fin de disminuir las cargas microbianas, se deben detectar poblaciones más bajas de microorganismos indicadores (Kornacki et al., 2015).

En plantas de procesamiento de alimentos, con fines de monitoreo microbiológico, el área de proceso/empaque se divide en 4 zonas basados en el nivel de riesgo de contaminación (International Commission on Microbiological Specifications for Foods Staff (ICMSF), 2002):

- Zona 1 - Superficies en contacto con alimentos. Superficies que están en contacto directo con los productos alimenticios. Algunos ejemplos son los rodillos, cepillos de lavado, cintas transportadoras y las mesas de clasificación.
- Zona 2 - Superficies que no entran en contacto con alimentos. Superficies adyacentes a superficies en contacto con alimentos. Algunos ejemplos son la estructura del equipo, el exterior de los transportadores y los paneles de control.
- Zona 3 - Superficies que no entran en contacto con alimentos. Superficies en el entorno de procesamiento. Ejemplos: paredes, pisos, techos, puertas, paletas y montacargas.
- Zona 4 - Superficies que no entran en contacto con alimentos. Áreas alejadas del procesamiento de producto. Algunos ejemplos son los baños, las salas de descanso, los vestuarios y las áreas de oficina.

El proceso de zonificación es importante como concepto para una gestión eficaz del riesgo, ya que mitiga la potencial entrada de patógenos transitorios externos al entorno de procesamiento, y asegura que la zona 1 (área de mayor nivel de riesgo de contaminación del producto final) no se convierta en un punto de refugio para patógenos transmitidos por los alimentos (U.S Food and Drug Administration, 2017a). Además, la zonificación higiénica reduce la probabilidad de contaminación cruzada entre zonas y facilita la selección de sitios de muestreo.

Se recomienda realizar las pruebas de microorganismos indicadores en superficies en contacto con alimentos (zona 1) porque los resultados de dichas pruebas proporcionan información valiosa sobre el estado microbiológico general de la superficie (Moberg &

Kornacki, 2015). La prueba directa de un patógeno en la zona 1 puede ser engañosa debido a una mala interpretación de un resultado negativo (Moberg & Kornacki, 2015). Además, la determinación directa de patógenos implica más tiempo y costo en comparación con el organismo indicador (Baylis et al., 2011; G. Moore & Griffith, 2002). Sin embargo, también es importante realizar pruebas de microorganismos indicadores en superficies que no entran en contacto con los alimentos, ya que la contaminación cruzada puede ocurrir indirectamente de las zonas 2, 3 y 4 a la zona 1. Diferentes causas como condensación, aerosoles, ventilación, y el movimiento del producto puede transferir contaminación entre zonas durante la producción (Estrada et al., 2020; Moberg & Kornacki, 2015).

2.3. Límites microbiológicos aceptables de microorganismos indicadores según normas nacionales e internacionales en productos agrícolas frescos

Actualmente no existen normativas o regulaciones que establezcan límites microbiológicos aceptables en superficies de contacto con alimentos específicamente para el sector de productos agrícolas frescos. En la Tabla 1, se realizó una recopilación de normativas nacionales e internacionales vigentes respecto a límites microbiológicos aceptables de microorganismos indicadores. Sin embargo, todas las normas están enfocadas en industrias dedicadas al sector de alimentos listos para el consumo humano que generalmente han pasado por un proceso de tratamiento térmico para la reducción de microorganismos como cocción o pasteurización.

2.4. Métodos tradicionales para la evaluación de limpieza y desinfección de superficies

Los métodos tradicionales para evaluar los procedimientos de limpieza y desinfección en superficies proveen información cuantitativa (cantidad de carga microbiana) o cualitativa (presencia/ausencia) de los microorganismos presentes en las superficies (Davidson et al., 1999). Estos métodos están basados en el cultivo de microorganismos indicadores en medios de cultivo requiriendo periodos de incubación de entre 18 a 48 horas para obtener resultados (Ginny Moore & Griffith, 2002). Los métodos tradicionales incluyen, hisopados de superficies, métodos de contacto con agar, y plaqueado de agar directo en superficies (Davidson, 2001).

Tabla 1. Límites microbiológicos de microorganismos indicadores aceptables según normas nacionales e internacionales

Norma	Tipo de industria	Tipo de superficie	Aerobios mesófilos totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
RM 461-2007 (Perú) (2007)	Alimentos y bebidas destinadas para el consumo humano	Superficies inertes irregulares	NA*	NA	<25 UFC/superficie (100 cm ²) (1.4 Log UFC/100 cm ²)	NA
		Superficies inertes regulares	NA	NA	<100 UFC/100cm ² (2 Log UFC/100 cm ²)	NA
NOM-093-SSA1-1994 (México) (1994)	Alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos (ej. Comedores)	NA	<400 UFC/cm ² (4.6 Log UFC/100 cm ²)	NA	<200 UFC/ cm ² (4.3 Log UFC/100 cm ²)	NA
BC Centre for Disease Control– (Canadá) (2010)	Alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos (ej. Comedores)	NA	<5 UFC/ cm ² (2.7 Log/100 cm ²)	NA	NA	NA

*NA: Información no disponible

«Continuación»

Norma	Tipo de industria	Tipo de superficie	Aerobios mesófilos totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
Public Health services (EE.UU) (1984)	Servicios de comedores de alimentos	NA	<10/cm ² (3 Log UFC/100 cm ²)	NA	NA	NA

*NA: Información no disponible

2.5 Métodos tradicionales para la evaluación de limpieza y desinfección de superficies

Los métodos tradicionales para evaluar los procedimientos de limpieza y desinfección en superficies proveen información cuantitativa (cantidad de carga microbiana) o cualitativa (presencia/ausencia) de los microorganismos presentes en las superficies (Davidson et al., 1999). Estos métodos están basados en el cultivo de microorganismos indicadores en medios de cultivo requiriendo periodos de incubación de entre 18 a 48 horas para obtener resultados (Ginny Moore & Griffith, 2002). Los métodos tradicionales incluyen, hisopados de superficies, métodos de contacto con agar, y plaqueado de agar directo en superficies (Davidson, 2001).

El hisopado de superficies convencional implica tomar muestras sobre un área de superficie designada utilizando esponjas o hisopos estériles, seguido del cultivo de los microorganismos objetivos en los medios de cultivo.

Los métodos de contacto con agar consisten en presionar un medio de cultivo de agar estéril contra el área de superficie a muestrear y luego incubar [ej. placas de contacto RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contact) y placas de deslizamiento (dip-slides)]. El plaqueado de agar directo en superficies consiste en verter agar estéril en la superficie a muestrear, dejar solidificar el medio protegido por una cubierta estéril, y luego incubar (Davidson, 2001).

2.5.1 Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm constituyen una forma de método tradicional de cultivo de microorganismos indicadores. Estas placas son sistemas de medios de cultivo listos para usar que constan de dos películas de plástico recubiertos con nutrientes de métodos estándar basados en el microorganismo a cultivar, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita el recuento de colonias (Ryser & Schuman, 2015).

Una muestra diluida obtenida después de muestrear una superficie se inocula en la película de fondo, mientras que la película superior se presiona contra la inferior para distribuir

uniformemente la muestra sobre un área de crecimiento de aproximadamente 20 cm² (Ginny Moore, 2003). A diferencia de los métodos de agar convencionales, no se requiere preparación de medios, y se necesita menos espacio de incubadora y almacenamiento (3M Food Safety, 2020).

2.6 Métodos rápidos para la evaluación de limpieza y desinfección de superficies

Los métodos microbiológicos convencionales resultan tediosos y requieren mucho tiempo; por lo tanto, surgieron métodos de prueba rápidos para reducir el lapso de tiempo entre el muestreo de superficie y obtención de resultados (Ginny Moore, 2003).

2.6.1 Prueba de Bioluminiscencia

Las pruebas rápidas de ATP se basan en la detección de una molécula llamada adenosín trifosfato (ATP). El ATP forma parte de todas las células vivas (como bacterias y residuos de alimentos), siendo un elemento fundamental componente en reacciones bioquímicas para la síntesis de material celular (Betts & Blackburn, 2009).

Esta prueba rápida bioluminiscente de ATP cuantifica la emisión de luz después de que el ATP presente en una superficie reacciona con un complejo enzima-sustrato llamado luciferina-luciferasa (Griffiths, 1997). La producción de luz se mide en unidades relativas de luz (RLU), y esta prueba requiere un dispositivo adicional, un luminómetro, para leer los resultados (Ginny Moore & Griffith, 2002).

Actualmente, las pruebas de ATP son ampliamente utilizadas dentro de la industria alimentaria, ya que se consideran una herramienta rápida para el monitoreo de la higiene y evaluar la eficacia de los procedimientos de limpieza y saneamiento in-situ, obteniendo resultados en menos de cinco minutos (Ginny Moore, 2003). Además, las pruebas de ATP pueden detectar alérgenos alimentarios, que de otro modo no podrían detectarse con los métodos microbiológicos tradicionales (Griffith, 2016).

La mayoría de las pruebas de ATP disponibles en la industria contienen como parte de la formulación el enzima-sustrato luciferina/luciferasa, iones de magnesio, amortiguadores,

sustratos, estabilizadores y extractantes (utilizados para extraer ATP de células vivas) (Griffith, 2005).

Las pruebas de ATP ocurren regularmente después de la limpieza y antes de los procedimientos de saneamiento, para asegurar de que la superficie esté limpia antes de aplicar los desinfectantes. Esto solo es factible debido a la rapidez del ensayo en la evaluación de resultados en tiempo real para tomar medidas correctivas (Griffith, 2016).

2.7 Rutas de contaminación microbiana en la industria de empaque de manzanas frescas

La contaminación de los productos agrícolas y superficies puede ocurrir debido a la contaminación en cualquier punto de la cadena de suministros. Es decir, puede ocurrir durante la precosecha, cosecha o post- cosecha.

Durante la precosecha y cosecha, ejemplos de fuentes de contaminación incluyen agua de irrigación, suelo, animales silvestres y domésticos, fertilizantes, bio aerosoles, herramientas y envases de cosechas, y manipulación del hombre (Alegbeleye et al., 2018; Brandl, 2006; Brooks & Gerba, 2014).

Antes de la cosecha, la presencia y poblaciones de diferentes microorganismos como bacterias, levaduras, mohos, parásitos y virus se ven afectados por el tipo de cultivo, prácticas agrícolas, ubicación geográfica y condiciones climáticas (Beuchat, 2002; Critzer & Doyle, 2010). El tipo del cultivo influye en la ecología de las bacterias debido a la morfología única de la superficie del producto, interacciones del microbiota vegetal, composición interna, presencia de antimicrobianos naturales y el contenido de nutrientes de los diferentes productos (Beuchat, 2002; Critzer & Doyle, 2010).

En el caso específico de las manzanas, la morfología de la superficie de la manzana juega un papel clave en el refugio y crecimiento de patógenos. Estudios de adhesión de bacterias como *Listeria innocua* y *E. coli* O157: H7 en la superficie de manzanas mostraron que las áreas del tallo y el cáliz son los sitios más probables de refugio de bacterias (Burnett et al., 2000;

Pietrysiak & Ganjyal, 2018), probablemente debido a la protección física proporcionada en estas regiones (Burnett et al., 2000).

En las superficies de las manzanas, *L. innocua* se adhiere a microestructuras como microfisuras, lenticelas, y tricomas (Pietrysiak & Ganjyal, 2018). Las microestructuras influyen en la adhesión de *Listeria* actuando como nichos de refugio a través del atrapamiento físico causado por la motilidad flagelar de *Listeria* (Pietrysiak & Ganjyal, 2018). Además, se ha reportado que *E. coli* se adhiere a la cutícula de cera y lenticelas (Burnett et al., 2000). Internamente, se encontró que *E. coli* se adhiere al tubo floral, semillas, pericarpio cartilaginoso y tricomas internos mediante infiltración. La internalización de patógenos en las manzanas puede ocurrir por la acción capilar del agua desde el tallo o cáliz hacia el núcleo (Burnett et al., 2000).

En la post-cosecha, las posibles fuentes de contaminación incluyen el agua de lavado de los productos (Lynch et al., 2009), contaminación cruzada por superficies de equipos, contenedores, montacargas y manipuladores en todo el proceso de empaque, almacenamiento y distribución (Beuchat, 2002; Harris et al., 2003).

En las plantas de empaque, el entorno de procesamiento se compone de muchos factores que pueden ser fuentes o vectores potenciales de contaminación, incluyendo: áreas que acumulan agua, flujo de producto, flujo de aire, trabajadores o equipos que atraviesan áreas de productos crudos y procesados/empacados; diseño de equipos; el programa de mantenimiento y reparación de instalaciones/equipos, etc. (United Fresh Produce Association, 2018).

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de Ejecución

El presente trabajo se llevó a cabo en cinco plantas de empaque de manzanas ubicadas en el valle Columbia, estado de Washington, Estados Unidos. El periodo de ejecución fue desde setiembre 2018 hasta julio 2019.

3.2. Superficies muestreadas

Se muestrearon superficies de contacto con alimentos pertenecientes a los equipos empleados en el proceso de empaque de manzanas, luego de procesos de limpieza y desinfección.

3.3. Materiales, Equipos y Reactivos

3.3.1. Materiales

- Placas petrifilm Aerobios mesófilos totales (3M™, Estados Unidos)
- Placas petrifilm *Enterobacteriaceae* (3M™, Estados Unidos)
- Placas petrifilm coliformes/ *E. coli* (3M™, Estados Unidos)
- Muestrador de esponja estéril conteniendo 10 ml de caldo neutralizante Dey/Engley EZ- Reach (World Bioproducts, Estados Unidos)
- Mango de extensión adaptador para toma de muestras con esponja (World Bioproducts, Estados Unidos)
- Pipeteador electrónico de 5 ml (3M™, Estados Unidos)
- Pipetas descartables de 5 ml (3M™, Estados Unidos)
- Guantes descartables de nitrilo libres de polvo (ThermoFisher, Estados Unidos)
- Caja cooler con ruedas para transporte de muestras (Igloo 52 QT, Estados Unidos)

- Materiales de escritorio: lapicero, plumón indeleble, regla
- Software estadístico JMP® Pro 12.2.0

3.3.2. Equipos

- Equipo de recuento de placas Petrifilm automatizado modelo 6499 (3M™, Estados Unidos)
- Incubadora microbiológica de aire forzado modelo 89511-430 (VWR International, Estados Unidos)
- Cámara fotográfica Nikon D5600
- Laptop Lenovo yoga C940
- Impresora HP Color laser jet pro M281fdw
- Laminadora de papel Fellowes Saturn 3i 125

3.3.3. Guías/normativas

- Guía para el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (U.S Food and Drug Administration, 2017a)
- Guía de estrategias para el control de *Listeria* en plantas de empaque de frutos de árbol (United Fresh Produce Association, 2018)

3.3.4. Reactivos

- Agua desionizada esterilizada
- Etanol al 70% (ThermoFisher, Estados Unidos) para desinfección de materiales usados durante el muestreo

3.4. Métodos de Análisis

- Método AOAC 990.12 Recuento de aerobios mesófilos totales en alimentos
- Método AOAC 2003.01 Recuento de *Enterobacteriaceae* en alimentos seleccionados
- Método AOAC 991.14 Recuento de coliformes en alimentos
- Método AOAC 991.14 Recuento de *Escherichia coli* en alimentos

3.5. Metodología Experimental

3.5.1. Etapa 1: Reclutamiento de plantas de empaque de manzana

Se reclutaron plantas de empaque de manzana a través de la Washington Tree Fruit Research Commission, entidad que desarrolla diversos proyectos de investigación con productores y plantas de empaque de manzanas en el estado de Washington, EE. UU. Se explicó el proceso de investigación a la gerencia de distintas plantas de empaque, de las cuales cinco aceptaron colaborar con el proyecto. Las plantas de empaque seleccionadas cuentan con un plan de inocuidad alimentaria, como lo estipula la regulación “Acto de Modernización de Seguridad Alimentaria” (FSMA). Asimismo, se acordó mantener la confidencialidad sobre la identidad de las plantas de empaque de manzanas.

3.5.2. Etapa 2: Visita a plantas de empaque y descripción del proceso de empaque de manzanas

Se visitaron las plantas de empaque con el fin de observar el proceso de empaque de manzanas y se desarrolló el diagrama de flujo y descripción de las distintas operaciones unitarias en cada planta de empaque.

En el proceso de empaque de manzanas se identificaron siete operaciones unitarias. Además, en base a la presencia o ausencia de agua durante la operación, se establecieron áreas húmedas y secas. Las cinco primeras operaciones unitarias se llevan a cabo en el área húmeda, mientras que las dos últimas en el área seca.

A continuación, en la Figura 1 se describe el diagrama de flujo del proceso de empaque de manzanas. Además, se realizó la descripción de cada operación unitaria como se observa en las figuras 2-8.

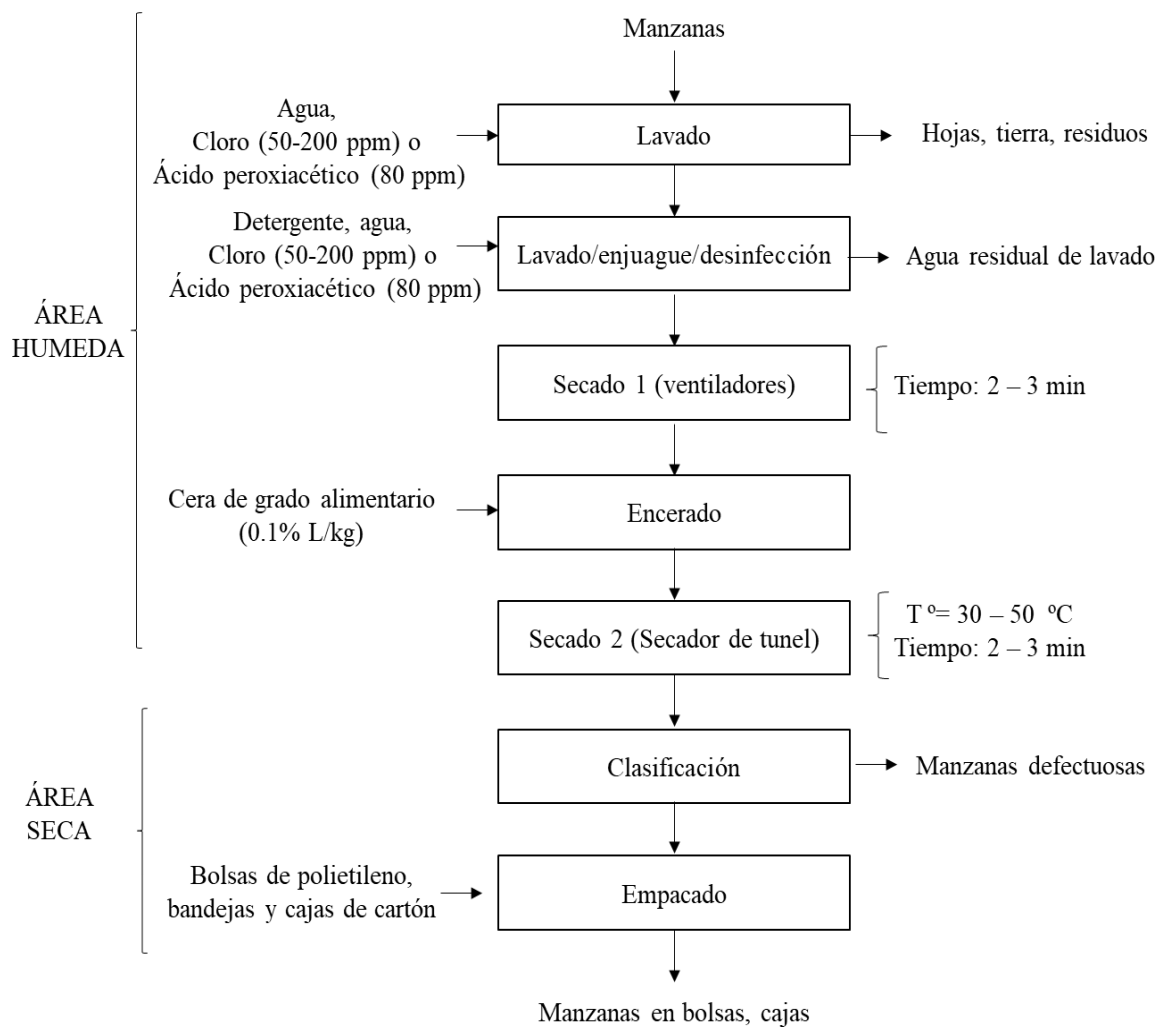


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de empaque de manzanas

a. Lavado

Los contenedores de manzana son vertidos en un tanque de lavado que contiene agua recirculada con desinfectantes como cloro (50-200 ppm) o ácido peroxiacético (máx. nivel permisible 80 ppm) para mantener la calidad del agua. El objetivo de este paso es remover hojas, suciedad y materia orgánica de las manzanas, además del primer descarte de fruta podrida manualmente.



Figura 2. Operación unitaria de lavado

b. Lavado/enjuague/desinfección

La segunda operación unitaria se lleva a cabo en camas de cepillos en el que, jabón, agua, y desinfectantes como cloro o ácido peroxiacético son aplicados mediante aplicadores de spray. El objetivo de este paso es remover residuos restantes de la fruta y reducir la carga microbiana.



Figura 3. Operación unitaria de lavado/enjuague/desinfección

c. Primer secado

En esta operación se realiza un primer secado por dos a tres minutos mediante el uso de ventiladores con el fin de preparar a las manzanas para el encerado.



Figura 4. Operación unitaria de secado por ventiladores

d. Encerado

Se aplica cera de grado alimentario como carnauba o shellac mediante aplicadores de spray. Generalmente se emplea 0.1% de cera (L cera/ kg fruta). La cera se utiliza para retener humedad de la manzana, y mejorar la apariencia al incrementar el brillo de las manzanas, junto con el uso de cepillos de pulido.

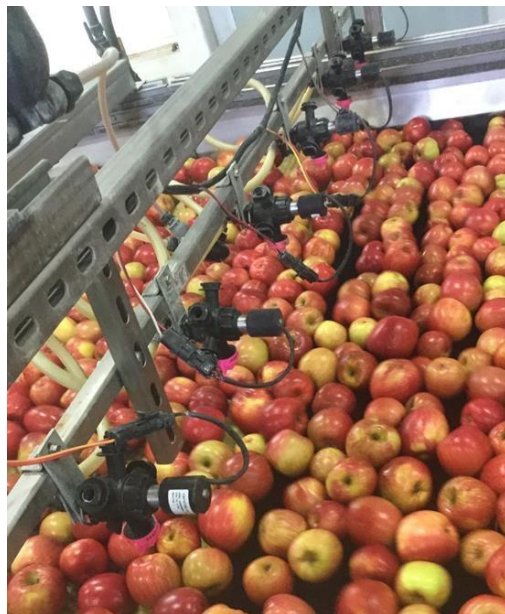


Figura 5. Operación unitaria de encerado

e. Segundo secado

El segundo secado se realiza en un secador de túnel que generalmente opera a una temperatura entre 30-50 °C por aproximadamente dos minutos, dependiendo de la variedad de manzana. Esta operación se considera como el punto de transferencia entre el área húmeda y área seca.



Figura 6. Operación unitaria de secado por túnel

f. Clasificación

En esta operación las manzanas son clasificadas según su tamaño, grado, desordenes internos o externos, utilizando un equipo automático de imagen óptica e infrarrojo. Asimismo, los stickers de identificación de lote son colocados en cada manzana de forma automatizada con el fin de asegurar la trazabilidad.

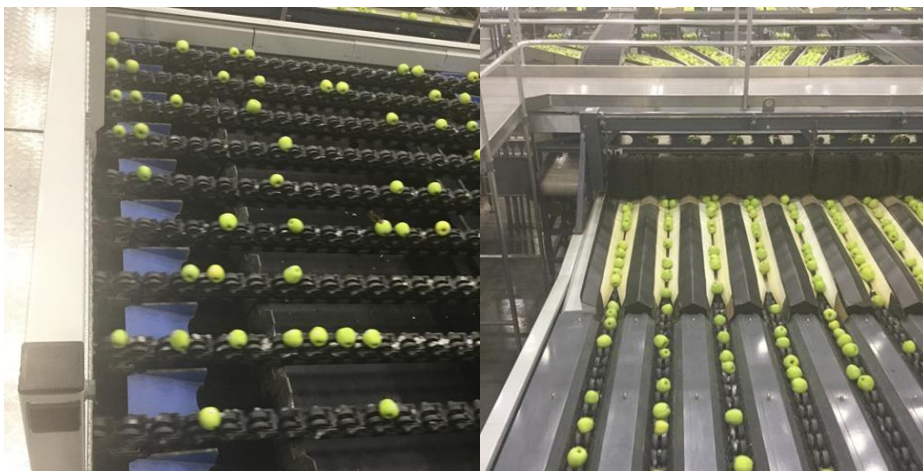


Figura 7. Operación unitaria de clasificación

g Empacado

Finalmente, las manzanas son empacadas de acuerdo con el calibre y tamaño, en cajas o bolsas para distribución. Este paso se realiza manualmente o con máquinas embolsadoras dependiendo de la presentación.



Figura 8. Operación unitaria de empacado

3.5.3. Etapa 3: Selección de superficies a muestrear







Un promedio de 27 a 50 superficies de contacto con alimentos se seleccionó en cada planta de empaque. La selección de las superficies de muestreo se realizó en base al número de equipos pertenecientes a cada operación unitaria, tipo de material de la superficie, configuración de diseño y ubicación de equipos en cada planta de empaque, requerimientos y necesidades de la planta de empaque y recomendaciones de la guía para la industria “Control de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo” (U.S Food and Drug Administration, 2017) y la guía de estrategias para el control de *Listeria* en plantas de empaque de frutos de árbol (United Fresh Produce Association, 2018). De acuerdo con esto, como se observa en la Tabla 2 y Anexo 1, se seleccionó un mayor número de superficies a muestrear en la operación unitaria de clasificación. Esto debido a que, en todas las plantas de empaque de manzanas, esta operación unitaria consta de una mayor cantidad de equipos y diversos tipos de materiales de superficies que están en contacto con las manzanas.

Las superficies a muestrear se fotografiaron y describieron a detalle con el fin de asegurar consistencia durante todos los muestreos. En la Tabla 3 se detallan ejemplos de superficies de contacto con alimentos muestreados en las distintas plantas de empaque de manzana.

Tabla 2. Número y tipos de superficies de contacto con alimentos seleccionadas en cada operación unitaria del proceso de empaque de manzanas

Operación unitaria	Número de superficies	Superficie de contacto con alimentos
1. Lavado	70	Tanque de lavado, Rodillos de PVC
2. Lavado/enjuague/desinfección	79	Cepillos, divisores
3. Primer secado (Ventiladores)	75	Cepillos, divisores
4. Encerado	50	Cepillos de pulido
5. Segundo secado (Secador de túnel)	85	Rodillos de secador, puntos de transferencia
6. Clasificación	302	Cintas transportadoras lisas y entrelazadas, rodillos de cerdas, rieles, cintas de teflón, puntos de transferencia de teflón y plástico, contenedores de clasificación, etc.
7. Empacado	80	Mesas de empaque, Cintas transportadoras
Total de superficies muestreadas	741	

Tabla 3. Ejemplos de superficies de contacto con alimentos muestreados en las plantas de empaque de manzana

1. Cepillos	2. Cepillos de pulido
	
3. Rodillos de cerdas	4. Rodillos de cloruro de polivinilo (PVC)
	
5. Rodillos de secador de túnel	6. Cepillos de clasificación
	

«Continuación»

7. Cintas transportadoras entrelazadas



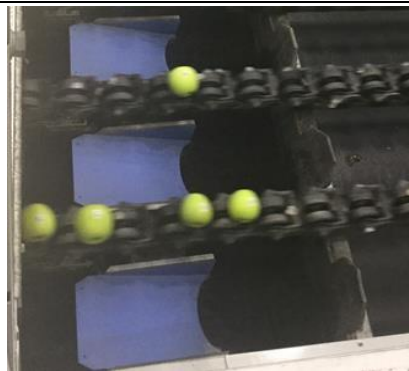
8. Cintas transportadoras lisas



9. Rieles guía de plástico



10. Contenedores de clasificación



11. Tanque de lavado

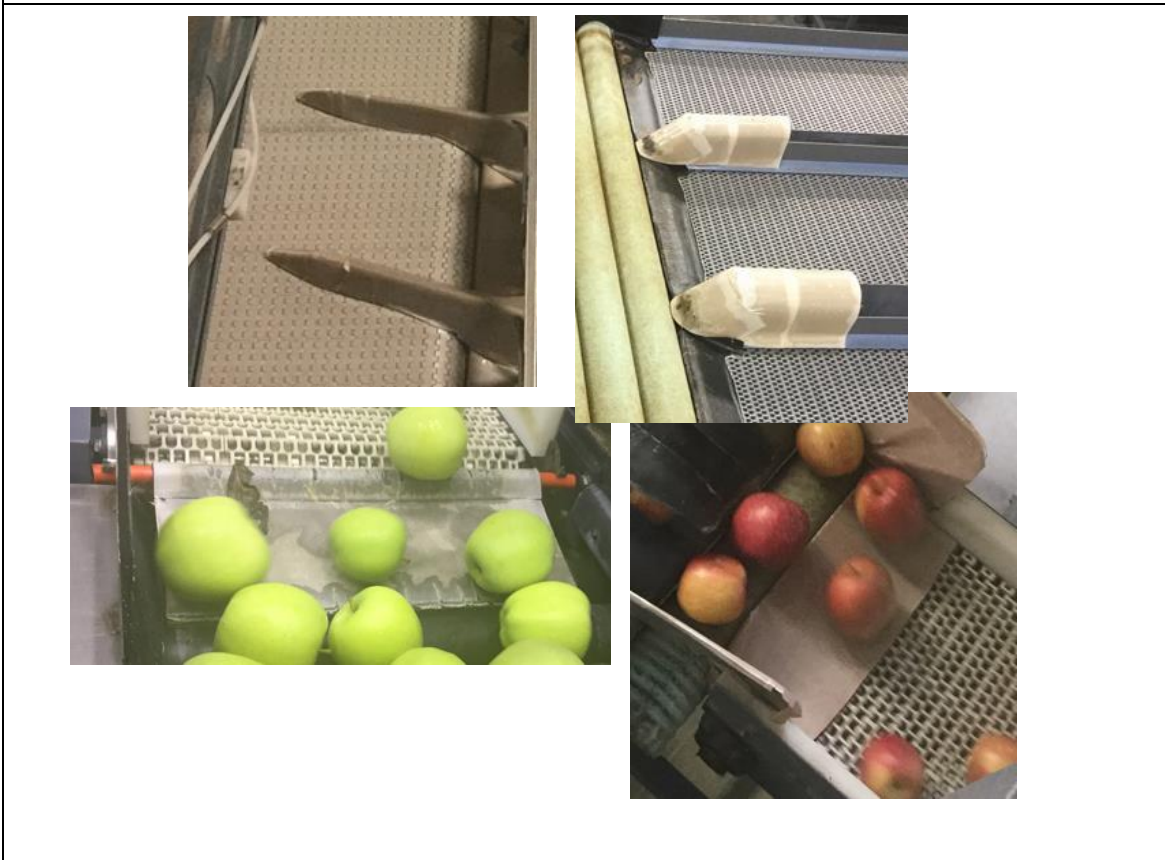


12. Divisores

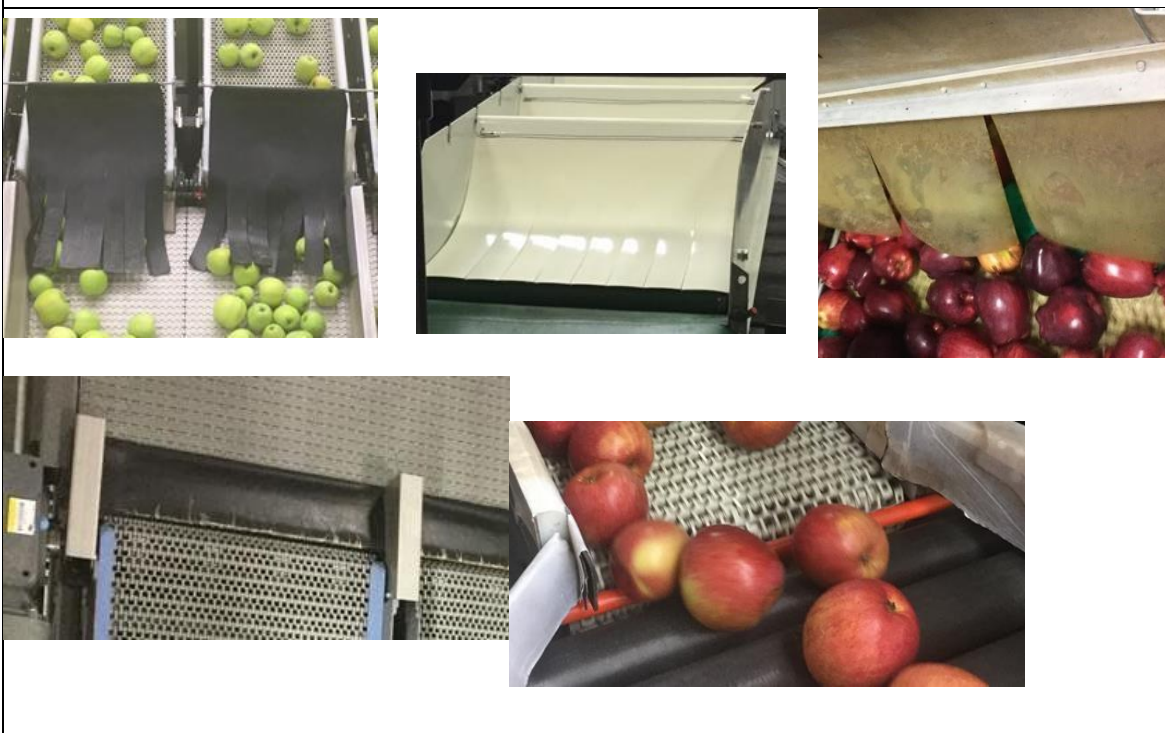


«Continuación»

13. Cintas o puntos de transferencia de teflón



14. Solapas de plástico y puntos de transferencia



3.5.4. Etapa 4: Ejecución del muestreo

La recolección de muestras se realizó durante la temporada de empaque 2018 (setiembre 2018 – julio 2019) luego de procedimientos de limpieza y desinfección. Adicionalmente, dado que las manzanas son almacenadas hasta por 12 meses en atmósfera controlada (0-2°C; 2% O₂; 1% CO₂) luego de ser cosechadas, cada planta de empaque fue visitada cuatro veces al año con el fin de obtener información que represente superficies que estuvieron en contacto con manzanas almacenadas a diferentes tiempos de almacenamiento y que fueron empacadas en distintas estaciones del año. En el Anexo 1 se describe el número de muestras evaluadas según el tiempo de almacenamiento de manzanas y estación del año, a través de cada operación unitaria.

El área de superficie muestreada fue de 10 cm x 10 cm (100 cm²), y se utilizó una esponja EZ- Reach conteniendo 10 ml de caldo neutralizante Dey/Engley previamente rotulada. En el caso de las superficies no lisas o regulares como rodillos o puntos de transferencia, se realizó una estimación aproximada del área de muestreo. El muestreo se realizó desde el área húmeda hacia el área seca con el fin de evitar cualquier riesgo de contaminación cruzada. Todas las muestras recolectadas fueron transportadas en un envase refrigerado con el fin de mantener la cadena de frío de 4-7 °C, y analizadas en el laboratorio de inocuidad de alimentos de Washington State University.

3.5.5. Etapa 5: Recuento de microorganismos indicadores

En la Figura 9, se describe la metodología empleada para el recuento de microorganismos indicadores. A cada esponja que contenía 10 ml de caldo neutralizante se le añadió dos ml de agua desionizada esterilizada con el fin de proveer suficiente cantidad de siembra para todos los microorganismos objetivos. Debido a que el muestreo de superficies se realizó luego de la limpieza y desinfección en donde se esperaba bajos recuentos de microorganismos, y por el número elevado de muestras evaluadas, no se realizaron posteriores diluciones. Previos estudios reportan metodologías de recuento similar sin emplear diluciones (Cosby et al., 2008; Wang et al., 2021; Williamson et al., 2018; Xiong, 2017). Se sembró 1 ml en cada placa Petrifilm 3MTM para el recuento de aerobios mesófilos

totales, *Enterobacteriaceae*, Coliformes, y *E. coli*. Las placas Petrifilm para el recuento de aerobios mesófilos totales se incubaron a 35 °C por 24 horas, mientras que las placas Petrifilm para el recuento de *Enterobacteriaceae*, coliformes, y *E. coli* se incubaron a 35 °C por 48 horas.

El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó con un equipo automatizado para el recuento de colonias 3M™. Todos los valores de recuento se expresaron como UFC/100 cm². Cuando el valor de número de colonias era muy numeroso de contar se empleó el valor estándar 999, según lo especificado por el equipo de recuento de placas 3M y metodologías reportadas en previos estudios (Elmoslemany et al., 2010; Nygaard & Charnock, 2018).

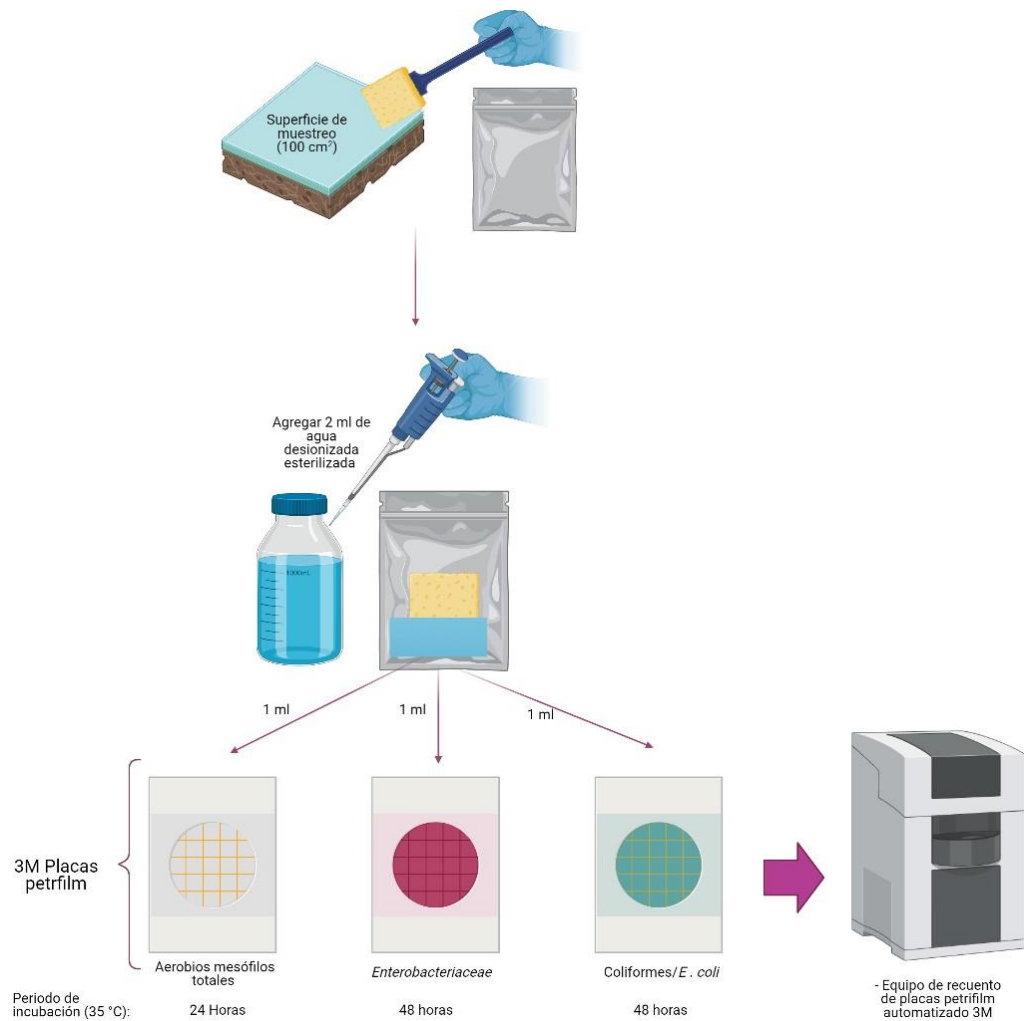


Figura 9. Esquema de protocolo de procesamiento de muestras para el recuento de microorganismos indicadores

3.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software JMP[®] Pro 12.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los valores de recuento de microorganismos indicadores se normalizaron usando Log 10. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), y se realizó una comparación múltiple de medias de poblaciones de microorganismos indicadores a través de cada operación unitaria y tipo de superficie empleando un análisis de varianzas y prueba de Tukey con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Para determinar los límites microbiológicos de cada microorganismo indicador se determinaron los límites superiores de control (LSC) (promedio + 3σ) en base al total de muestras (n=741).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recuentos de microorganismos indicadores

En base a las visitas realizadas a las cinco plantas de empaque de manzanas, los rangos de valores de recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae*, Coliformes y *E. coli* determinados luego de procedimientos de limpieza y desinfección se presentan en la Tabla 4 según cada operación unitaria identificada en el proceso de empaque de manzanas. En promedio, se establecieron los siguientes rangos de límites microbiológicos (Promedio \pm desviación estándar) (Log UFC/100 cm²) en superficies de contacto con alimentos de equipos utilizados en el empaque de manzanas: Aerobios mesófilos totales (2.7 ± 1.2 - 3.3 ± 0.9), *Enterobacteriaceae* (1.0 ± 1.0 - 1.7 ± 1.5), coliformes (0.6 ± 0.9 - 1.4 ± 1.3), y *E. coli* (0.2 ± 0.4 - 0.3 ± 0.6). Estos valores variaron de acuerdo con cada una de las operaciones unitarias del proceso de empaque de manzanas.

Como se observa en la Tabla 4, para todas las operaciones unitarias las poblaciones mayores fueron obtenidas para el microorganismo indicador aerobios mesófilos totales, seguidos por, en orden de tamaño de población, *Enterobacteriaceae*, coliformes y *E. coli*. Asimismo, se identificó qué operaciones unitarias presentaron valores estadísticamente diferentes según cada tipo de organismo indicador.

Otro de los objetivos fue evaluar los recuentos de los microorganismos indicadores según el tipo de superficie. En la Tabla 5, se reportaron dichos valores y al igual que los resultados de cada operación unitaria, cada tipo de superficie presentó recuentos estadísticamente diferentes según el tipo de microorganismo indicador. Por lo tanto, no se determinó una superficie específica que presente valores significativamente mayores para los cuatro microorganismos indicadores.

Tabla 4. Población promedio de microorganismos indicadores (Promedio \pm desviación estándar) (Log UFC/100 cm²) en cada operación unitaria del proceso de empaque de manzanas

Operación unitaria	n ^A	Promedio \pm desviación estándar (Log UFC/100 cm ²)			
		Aerobios mesófilos totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
Lavado	70	2.7 \pm 1.2 (b) ^B	1.7 \pm 1.5 (a)	1.4 \pm 1.3 (ab)	0.2 \pm 0.5 (a)
Lavado/enjuague/desinfección	79	2.8 \pm 1.2 (ab)	1.6 \pm 1.3 (a)	1.4 \pm 1.3 (a)	0.2 \pm 0.4 (a)
Primer secado (Ventiladores)	75	2.9 \pm 1.1 (ab)	1.3 \pm 1.2 (ab)	0.9 \pm 1.1 (bcd)	0.3 \pm 0.5 (a)
Encerado	50	3.3 \pm 0.9 (a)	1.3 \pm 1.3 (ab)	1.0 \pm 1.1 (abcd)	0.2 \pm 0.4 (a)
Segundo secado (Secador de túnel)	85	3.2 \pm 0.8 (a)	1.5 \pm 1.2 (a)	1.1 \pm 1.1 (abc)	0.2 \pm 0.4 (a)
Clasificación	302	3.0 \pm 0.8 (ab)	1.0 \pm 1.0 (b)	0.6 \pm 0.9 (d)	0.2 \pm 0.4 (a)
Empacado	80	3.0 \pm 0.7 (ab)	1.0 \pm 1.0 (b)	0.8 \pm 0.9 (cd)	0.3 \pm 0.6 (a)

^A Número de muestras (n total = 741)

^B Los valores dentro de cada columna que no están seguidas por la misma letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Tabla 5. Población promedio de microorganismos indicadores (Log UFC/100 cm²) por superficie en el proceso de empaque de manzanas

Superficie de contacto con alimentos	n ^A	Aerobios mesófilos totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
Rodillos de cerdas	40	3.3 (a) ^B	1.7 (ab)	1.4 (abc)	0.3 (a)
Cintas y puntos de transferencia de teflón	101	3.2 (a)	1.3 (abc)	0.8 (bcd)	0.2 (a)
Solapas y puntos de transferencia de plástico	86	3.2 (a)	1.2 (abc)	0.9 (abcd)	0.3 (a)
Mesa/contenedor de empaque	16	3.1 (ab)	0.8 (abc)	0.8 (abcd)	0.1 (a)
Cinta transportadora entrelazada	63	3.1 (ab)	0.8 (c)	0.6 (d)	0.1 (a)
Rodillos de secador de túnel	23	3.1 (ab)	1.4 (abc)	1.1 (abcd)	0.2 (a)
Tazas de clasificación	31	3.1 (ab)	0.8 (abc)	0.7 (abcd)	0.2 (a)
Cepillos de lavado	59	3.0 (ab)	1.7 (a)	1.5 (a)	0.2 (a)
Bordes laterales de equipos	34	2.9 (ab)	0.8 (bc)	0.7 (abcd)	0.2 (a)
Divisores	24	2.9 (ab)	0.8 (abc)	0.6 (bcd)	0.1 (a)

^ANúmero de muestras (n total = 741)

^B Los valores dentro de cada columna que no están seguidas por la misma letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

«Continuación»

Superficie de contacto con alimentos	n ^A	Aerobios mesófilos totales	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes	<i>E. coli</i>
Cepillos de pulido	23	2.9 (ab)	1.5 (abc)	0.9 (abcd)	0.1 (a)
Cinta transportadora lisa	45	2.9 (ab)	0.8 (bc)	0.6 (cd)	0.2 (a)
Cepillos de clasificación	48	2.9 (ab)	0.9 (abc)	0.6 (d)	0.3 (a)
Tanque de lavado	27	2.7 (ab)	1.8 (ab)	1.6 (ab)	0.2 (a)
Cepillos bajo ventiladores	45	2.7 (ab)	1.3 (abc)	0.9 (abcd)	0.2 (a)
Rieles guía de plástico	19	2.6 (ab)	0.7 (abc)	0.6 (abcd)	0.1 (a)
Rodillos de clasificación	41	2.5 (ab)	1.1 (abc)	0.7 (bcd)	0.2 (a)
Bandas de tracción	16	2.4 (ab)	1.4 (abc)	1.2 (abcd)	0.2 (a)

^ANúmero de muestras (n total = 741)

^B Los valores dentro de cada columna que no están seguidas por la misma letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

4.1.1 Aerobios mesófilos totales

Las poblaciones de aerobios mesófilos totales reportadas en promedio de las cinco plantas de empaque de manzanas evaluadas variaron entre $2.7 \pm 1.2 - 3.3 \pm 0.9$ Log UFC/100 cm² luego de procesos de limpieza y desinfección. En previos estudios, donde se evaluaron superficies de contacto con alimentos luego de procedimientos de lavado y desinfección, se encontraron recuentos similares. Por ejemplo, en una planta de empaque de arándanos el valor promedio de aerobios mesófilos totales fue de 3.8 Log UFC/100 cm² (Gazula et al., 2019). Asimismo, en una planta procesadora de zanahorias y lechugas se obtuvieron poblaciones promedio de aerobios mesófilos totales de 3.4 a 3.5 Log UFC/100 cm² (Lehto et al., 2011). En contraste, en una planta de empaque de duraznos frescos, se determinó un valor mayor de 4.3 Log UFC/100 cm² (Wang et al., 2021). La diferencia en los valores reportados en este estudio puede ser explicado por factores específicos asociados al tipo de producto. Específicamente, a diferencia de los duraznos, las manzanas tienen una superficie semilisa, con una capa protectora de cera natural y por lo tanto es menos propensa a los daños mecánicos durante la cosecha.

Las operaciones unitarias que presentaron valores estadísticamente diferentes fueron la operación de lavado (menor valor) y las operaciones de encerado y secado por túnel (mayores valores) (Tabla 4). Según el flujo de proceso de empaque de manzanas (Figura 1), en la operación de lavado las manzanas ingresan a un tanque de acero inoxidable que contiene desinfectantes como cloro o ácido peroxiacético. Estos desinfectantes han sido previamente reportados como efectivos para eliminar la contaminación cruzada entre manzanas y agua de lavado (Pietrysiak et al., 2019). Según las visitas realizadas a las plantas de empaque, la concentración de estos desinfectantes es monitoreada constantemente mediante sistemas automatizados de inyección de desinfectantes o kits de muestreo.

En contraste, la operación de encerado y secado por túnel no reciben una introducción constante de desinfectantes y poseen superficies más complicadas de limpiar y desinfectar. Por ejemplo, los cepillos de pulido acumulan cera entre las cerdas de los cepillos. Se ha demostrado que la cera puede causar atrapamiento de microorganismos y humedad, creando un microambiente que causa las condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos como *Listeria monocytogenes* (Glass et al., 2015). Sin embargo, en otros

estudios se ha reportado la actividad antibacteriana de las ceras usadas en el empaque de manzanas contra *L. monocytogenes* (Macarisin et al., 2019), *E. coli* O157: H7 (Kenney & Beuchat, 2002) y *Salmonella* Muenchen (Kenney & Beuchat, 2002), posiblemente debido a uno de los componentes de la cera comercial: alcohol isopropílico o alcohol etílico (Macarisin et al., 2019). Similarmente, en el secador por túnel, los rodillos están forrados con material de teflón, en los que se observó bordes desgastados y hendiduras, que facilitan la acumulación de residuos y posiblemente niches para el crecimiento de microorganismos.

4.1.2 *Enterobacteriaceae*

Las poblaciones de *Enterobacteriaceae* variaron entre 1.0 ± 1.0 - 1.7 ± 1.5 Log UFC/100 cm² a lo largo del proceso de empaque de manzanas. Previos estudios sobre *Enterobacteriaceae* en superficies de contacto con alimentos en otras plantas de procesamiento de alimentos obtuvieron poblaciones mayores de entre 3.0 y 3.3 Log UFC/100 cm² (Lehto et al., 2011) y 2.1 y 2.5 Log UFC/100 cm² (Gómez et al., 2012) en plantas de procesamientos de carnes y vegetales, respectivamente. Estas diferencias de resultados se explican por las condiciones de crecimiento, cosecha y manipulación de estos productos, que, a diferencia de las frutas de árbol como manzanas, son comúnmente asociados con contaminación fecal y de suelo.

Respecto a los recuentos microbiológicos en base a cada operación unitaria. las operaciones unitarias de clasificación y empacado (área seca de la planta de empaque) presentaron valores estadísticamente significativamente menores a las operaciones unitarias de lavado. Esto se atribuyó a la eliminación de posibles fuentes de *Enterobacteriaceae* que vienen en la fruta desde el campo, y que son parte del microbiota regular de las manzanas (Wassermann et al., 2019), en el área húmeda de lavado y desinfección. Por lo tanto, hay un menor arrastre de estos microorganismos hacia el área seca de la planta de empaque. Las especies de *Enterobacteriaceae* son bacterias que son fácilmente inactivadas con el uso de desinfectantes (Kornacki et al., 2015).

De igual forma, los tipos de superficies que presentaron mayores recuentos de *Enterobacteriaceae* fueron los cepillos de lavado, en comparación con las superficies pertenecientes a las operaciones de clasificación y empaçado como cintas transportadoras.

4.1.3 Coliformes

Los valores de coliformes que se obtuvieron variaron entre 0.6 ± 0.9 - 1.4 ± 1.3 Log UFC/100 cm². En un estudio en plantas de empaçado de pimientos, se reportó un valor de coliformes similar de 0.6 ± 0.2 Log UFC/100 cm² en superficies como rodillos, cintas transportadoras y contenedores para empaçado (Soto-Beltrán et al., 2015). En contraste con los resultados obtenidos, en dos estudios que evaluaron superficies de contacto con alimentos en sistemas de clasificación automatizados de empaçado de duraznos reportaron mayores recuentos de Coliformes de 2.9 Log UFC/100 cm² y 2.5 Log UFC/cm², respectivamente (Wang et al., 2021; Williamson et al., 2018). Según los autores, este valor fue esperado ya que representa microbiota natural presente en los duraznos, que también fueron evaluados, además de las diferencias físicas entre duraznos y manzanas previamente descrito.

Similar con los recuentos obtenidos de *Enterobacteriaceae*, se reportaron recuentos menores de coliformes en el área seca (operaciones unitarias de clasificación y empaçado), en comparación con la operación de lavado.

4.1.4 *Escherichia coli*

Los valores de *E. coli* fueron bajos a través de todo el proceso de empaçado entre 0.2 ± 0.4 - 0.3 ± 0.6 Log UFC/100 cm² y no reportaron diferencias significativas tanto entre operaciones unitarias como tipos de superficie. Similar a lo reportado en previos estudios donde se evaluaron superficies en contacto con alimentos, la variabilidad de recuentos de *E. coli* fue elevada. Parish (1998), detectó en una procesadora de naranjas niveles de *E. coli* (MPN/unit) desde <0.3 a 5700 en diversos puntos de muestreo de la planta. Asimismo, Soto-Beltrán et al., (2015), reportó niveles de contaminación de *E. coli* desde 0.3 – 2.6 log CFU/400cm². Tradicionalmente los frutos de árbol como las manzanas contienen niveles bajos de *E. coli* (Frankish et al., 2021) debido a que no son un producto agrícola que este en contacto con el suelo. Por ello, una menor introducción de este microorganismo debe ser previsto durante el empaçado de manzanas. Sin embargo, la mayor variabilidad de recuentos de *E. coli* puede

explicarse por la introducción aleatoria de este microorganismo indicador proveniente de la fruta que ingresa con una mayor carga de contaminación debido a heces de animales, agua de irrigación, etc, similar a lo reportado en una planta de empaque de duraznos (Wang et al., 2021). Asimismo, las propiedades físicas y químicas de los diferentes materiales de las superficies de los equipos afectan los niveles de contaminación microbiana y la efectividad de los desinfectantes utilizados (Gazula et al., 2019).

E. coli es usado como indicador de contaminación fecal y es regularmente empleado para verificar la calidad del agua (Baylis et al., 2011). A pesar de que todas las plantas de empaque de manzanas muestreadas utilizan agua recirculada en sus tanques de lavado, no se encontraron mayores valores de *E. coli* en esta operación unitaria. Esto se explica a lo previamente reportado respecto al uso de desinfectantes como cloro y ácido peroxiacético en el tanque de lavado de manzanas. Similarmente, en un estudio en el que se evaluaron concentraciones microbianas en diferentes tipos de procesamiento postcosecha de productos agrícolas, no se detectó *E. coli* en el agua de lavado (Ailes et al., 2008).

4.2 Límites microbiológicos en superficies de contacto con alimentos en plantas de empaque de manzana luego de procedimientos de limpieza y desinfección

En la Tabla 6 y Anexos 2-5 se representan los límites superiores de control (LSC) para cada uno de los microorganismos indicadores evaluados luego de procedimientos de limpieza y desinfección. Los LSC se determinaron en base a las 741 muestras evaluadas y representan el promedio de recuento de colonias + 3σ . En el Anexo 2 para el microorganismo indicador bacterias aerobias mesófilas totales, Anexo 3 para el microorganismo indicador *Enterobacteriaceae* y el Anexo 4 para el microorganismo indicador coliformes, el máximo recuento de colonias obtenido se representó mediante el valor 4.1 Log CFU/100 cm². En el Anexo 5 donde se representa el LSC para *E. coli*, el máximo valor de recuento de colonias reportado fue de 2.3 Log CFU/100 cm². El valor mínimo de recuento de colonias obtenido para todos los microorganismos indicadores se representó mediante el valor 0.1 Log CFU/100 cm². Este valor se obtuvo según los procedimientos descritos en el Anexo 6.

Tabla 6. Límites microbiológicos recomendados en superficies de contacto con alimentos en plantas de empaque de manzanas luego de procedimientos de limpieza y desinfección

Microorganismo indicador	Log UFC/100 cm ²
Aerobios mesófilos totales	< 3.1
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1.3
Coliformes	< 1.0
<i>E. coli</i>	< 0.3

Actualmente, en los EE. UU no existen regulaciones que definan estándares específicos de los niveles aceptables de cargas microbianas de microorganismos indicadores en superficies de contacto de alimentos para la industria de productos agrícolas frescos. Estos estándares deberían abordar las diferencias que puedan surgir según el método de muestreo empleado, el área de la superficie muestreada, el tipo de producto que se ha procesado y la operación unitaria en la que se tomen las muestras. Por lo tanto, se recomienda que cada tipo de industria construya los límites microbiológicos para aceptar o rechazar la limpieza de una superficie en base a los estándares objetivos obtenidos después de un procedimiento de limpieza y desinfección validado que se ha realizado de manera correcta (Blackburn, 2003; Forsythe S.J, 2000).

Las cinco plantas de empaque muestreadas cuentan con un plan de higiene y saneamiento además de un programa de monitoreo ambiental, por lo que sus procesos de limpieza y desinfección se encuentran validados. Generalmente, cada planta de empaque emplea distintos detergentes y desinfectantes como cloro, ácido peracético y amonio cuaternario dependiendo del tipo de superficie o área (húmeda o seca), para llevar a cabo estos procesos.

De acuerdo con esto, éstas cinco plantas de empaque representan una situación general de la industria de empaque de manzanas en el estado de Washington. Por ello, los rangos de poblaciones de organismos indicadores obtenidos en este estudio son específicos para la

industria de empaque de manzanas frescas y se basó en cada operación unitaria del proceso de empaque.

Al comparar los límites microbiológicos aceptables (Tabla 6) con otras regulaciones nacionales e internacionales descritos en la Tabla 1, se determinó que los valores obtenidos en este estudio cumplen con la mayoría de los límites aceptables reportados por regulaciones internacionales y nacionales basados en industrias de alimentos listos para el consumo humano. Por ejemplo, respecto a los recuentos de aerobios mesófilos totales, los valores obtenidos en esta investigación se encuentran dentro de límite aceptable según la norma Mexicana NOM- 093- SSA1-1994 (Secretaria de Salud, 1995) y la norma de EE. UU (Favero et al., 1984). Sin embargo, la norma de Canadá (BC Centre for Disease Control, 2010) reporta valores más estrictos, por lo que los valores obtenidos para la industria de manzanas estarían por encima del límite aceptable. Cabe resaltar que estas normativas están basadas en establecimientos que expenden alimentos listos para el consumo que muchas veces pasan por operaciones de tratamiento térmico como pasteurización, cocción, etc., que tienen el fin de reducir la carga microbiana. A diferencia del proceso de empaque de manzanas, en el que no existe ninguna operación en el que se realice algún proceso de tratamiento térmico para la eliminación de microorganismos.

Respecto a los niveles de coliformes, los valores reportados en este estudio estuvieron dentro del límite aceptable según las regulaciones peruana (MINSA, 2007) y mexicana. Actualmente la norma peruana solo especifica límites microbiológicos del organismo indicador coliformes mediante el muestreo por método de esponja. Asimismo, no se encontró ninguna normativa que especifique un valor aceptable para el microorganismo indicador *E. coli*.

4.3 Aplicación de las competencias profesionales

El presente Trabajo de Suficiencia Profesional se encuentra enmarcado dentro de las actividades realizadas por la Bachiller en Ciencias – Industrias Alimentarias en la institución Washington State University, desempeñando el cargo de asistente de investigación de

postgrado. La carrera de Industrias Alimentarias permite el correcto desenvolvimiento dentro de la institución, tanto en conocimientos como en competencias adquiridas.

En la realización de una investigación relacionada con el recuento de microorganismos indicadores en plantas de empaque de manzanas se realiza la elaboración de flujogramas de las operaciones unitarias pertenecientes a todo el proceso de empaque de manzanas, el muestreo microbiológico en superficies en contacto con alimentos, y la evaluación de normas regulatorias internacionales.

Estas funciones se desempeñaron apropiadamente ya que se ponen en práctica los conocimientos adquiridos durante los años de estudio, tal como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en el desempeño laboral

Cursos	Conocimientos adquiridos puestos en práctica
Microbiología de Alimentos	Técnicas de microbiología aplicada
Introducción a la ingeniería de Alimentos	Elaboración de flujogramas
Gestión de la Calidad de Alimentos	Normas alimentarias nacionales e internacionales
Tecnología de alimentos I	Procesamiento de frutas y hortalizas

Asimismo, en el presente Trabajo de Suficiencia Profesional se puso en práctica el recuento de microorganismos indicadores en superficies de contacto con alimentos en plantas de empaque de manzanas, aplicando conocimientos específicos de análisis microbiológicos, elaboración de flujogramas y evaluación de normas alimentarias internacionales, que guardan relación con las asignaturas mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en la evaluación de microorganismos indicadores

Cursos	Conocimientos adquiridos puestos en práctica
Microbiología de Alimentos	Técnicas de muestreo de superficies y recuento de bacterias
Tecnología de alimentos I	Procesamiento postcosecha de frutas
Introducción a la ingeniería de Alimentos	Determinación de operaciones unitarias y elaboración de flujogramas
Gestión de la Calidad de Alimentos	Normas alimentarias nacionales e internacionales
Control de Calidad de Alimentos	Determinación de límites críticos de control

Finalmente, el desarrollo de capacidades y competencias durante la carrera, tales como trabajo en equipo, búsqueda y redacción apropiada de información técnico-científica, comunicación, empatía y responsabilidad en el trabajo, entre otros, permitió un correcto desenvolvimiento del bachiller en el centro laboral, así como en la ejecución exitosa de las labores y actividades encomendadas.

V. CONCLUSIONES

1. Se determinaron las poblaciones promedio y rangos (Promedio \pm desviación estándar) (Log UFC/100 cm²) de los microorganismos indicadores Aerobios mesófilos totales (2.7 ± 1.2 - 3.3 ± 0.9), *Enterobacteriaceae* (1.0 ± 1.0 - 1.7 ± 1.5), coliformes (0.6 ± 0.9 - 1.4 ± 1.3) y *E. coli* (0.2 ± 0.4 - 0.3 ± 0.6), en superficies de contacto con alimentos de equipos utilizados en el empaque de manzanas en cinco plantas de empaque de manzanas del estado de Washington, EE. UU, luego de procedimientos de limpieza y desinfección.
2. Los límites microbiológicos de los microorganismos indicadores (Log UFC/100 cm²) encontrados en superficies de contacto con alimentos, de equipos utilizados en el empaque de manzanas en base a cinco plantas de empaque de manzanas del estado de Washington, EE. UU, luego de procedimientos de limpieza y desinfección fueron: Aerobios mesófilos totales (< 3.1), *Enterobacteriaceae* (< 1.3), coliformes (< 1.0), y *E. coli* (< 0.3).
3. El recuento de aerobios mesófilos totales en las superficies de contacto con alimentos de los equipos pertenecientes a las operaciones unitarias de encerado y segundo secado por túnel mostraron valores significativamente mayores a la operación unitaria de lavado.
4. Las poblaciones de *Enterobacteriaceae* y coliformes, las poblaciones mayores fueron observadas en las superficies de contacto con alimentos de los equipos pertenecientes a operaciones unitarias asociadas al área húmeda (operaciones de lavado y desinfección) en comparación con las operaciones de clasificación y empackado.
5. Los recuentos de *E. coli* fueron bajos en las superficies de contacto con alimentos de los equipos pertenecientes a todas las operaciones unitarias y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.
6. Se reportaron diferentes tipos de superficie de contacto con alimentos con mayores recuentos estadísticamente significativos según el tipo de microorganismo indicador.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la correlación entre los microorganismos indicadores evaluados y el microorganismo indicador *Listeria* especies y otros patógenos alimentarios.
- Evaluar la correlación entre la prevalencia de microorganismos indicadores y el uso de pruebas rápidas comúnmente utilizados en la industria alimentaria como bioluminiscencia ATP.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 3M Food Safety. (2020). 3M™ Petrifilm™ Plates and plate reader. Recuperado de: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1505478O/3m-petrifilm-plates-brochure.pdf>
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Ailes, E. C., Leon, J. S., Jaykus, L. A., Johnston, L. M., Clayton, H. A., Blanding, S., Kleinbaum, D. G., Backer, L. C., & Moe, C. L. (2008). Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season. *Journal of Food Protection*, 71(12), 2389–2397. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.12.2389>
- Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 73(January), 177–208.
- Angelo, K. M., Conrad, A. R., Saupe, A., Dragoo, H., West, N., Sorenson, A., Barnes, A., Doyle, M., Beal, J., Jackson, K. A., Stroika, S., Tarr, C., Kucerova, Z., Lance, S., Gould, L. H., Wise, M., & Jackson, B. R. (2017). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014–2015. *Epidemiology and Infection*, 145(5), 848–856. <https://doi.org/10.1017/S0950268816003083>
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., & Davies, A. (2011). The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry.
- BC Centre for Disease Control. (2010). Environmental hygiene monitoring -A guide for environmental health officers. Recuperado de: <http://www.bccdc.ca/resource->

- gallery/Documents/Guidelines%20and%20Forms/Guidelines%20and%20Manuals/EH/FP
S/Food/EnvMonitoringHygieneGuideforEHOs.pdf
- Bell, C., & Kyriakides, A. (2009). Pathogenic *Escherichia coli*. In C. Blackburn & P. McClure (Eds.), *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control* (Second, pp. 581–626). Woodhead Publishing Limited.
- Betts, R., & Blackburn, C. (2009). Detecting pathogens in food. In C. Blackburn & P. McClure (Eds.), *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control* (Second, pp. 17–65). Woodhead Publishing Limited.
- Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4, 413–423. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01555-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01555-1)
- Blackburn, C. (2003). Microbiological analysis and food safety management: GMP and HACCP systems. *Detecting Pathogens in Food*, 3–19.
- Brandl, M. T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 67–392. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143359>
- Brooks, J. P., & Gerba, C. (2014). Bioaerosol contamination of produce: Potential issues from an unexplored contaminant. In K. R. Matthews, G. M. Sapers, & C. P. Gerba (Eds.), *The Produce Contamination Problem: Causes and Solutions* (Second edition). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-01380-4>
- Burnett, S. L., Chen, J., & Beuchat, L. R. (2000). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4679–4687.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2015). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros. Apples (Final Update). Recuperado de: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html%0A>
- Cordier, J.-L. (2013). Microbiological Criteria and Indicator Microorganisms. In M. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (Fourth, pp. 81–90). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch4>
- Cosby, C. M., Costello, C. A., Morris, W. C., Haughton, B., Devereaux, M. J., Harte, F., & Davidson, P. M. (2008). Microbiological analysis of food contact surfaces in child care centers. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 6918–6922. <https://doi.org/10.1128/AEM.00547-08>

- Critzer, F. J., & Doyle, M. P. (2010). Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. In *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.006>
- Da Silva, N., Taniwaki, M., Junqueira, V., Silveira, N., Do Nascimento, M., & Gomes, R. (2013). Aerobic plate count. In *Microbiological examination methods of food and water - A Laboratory Manual (First, pp. 57–66)*. CRC Press.
- Davidson, C. A. (2001). *An Evaluation of Some Microbiological and ATP Bioluminescence Methods for the Recovery and Detection of Bacterial Contamination from Food Contact and Environmental Surfaces*. University of Wales.
- Davidson, C. A., Griffith, C. J., Peters, A. C., & Fielding, L. M. (1999). Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness - ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*, 14, 33–38
- De Oliveira Mota, J., Boué, G., Prévost, H., Maillet, A., Jaffres, E., Maignien, T., Arnich, N., Sanaa, M., & Federighi, M. (2021). Environmental monitoring program to support food microbiological safety and quality in food industries: A scoping review of the research and guidelines. *Food Control*, 130. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108283>
- Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., Wichtel, J. J., Stryhn, H., & Dingwell, R. T. (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine*, 95(1–2), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.03.007>
- Estrada, E. M., Hamilton, A. M., Sullivan, G. B., Wiedmann, M., Critzer, F. J., & Strawn, L. K. (2020). Prevalence, persistence, and diversity of listeria monocytogenes and listeria species in produce packinghouses in three U.S. States. *Journal of Food Protection*, 83(2), 277–286. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-411>
- Favero, M. S., Gabis, D. A., & Vesley, D. (1984). Environmental monitoring procedures. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods (pp. 49–54)*. American Public Health Association.
- Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., & Burkhardt, W. (2018). Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In *Bacteriological Analytical Manual*. U.S. Food and Drug Administration.
- Forsythe S.J. (2000). *The microbiology of safe food (First edition)*. Recuperado de: <https://ntserver1.wsulibs.wsu.edu:2171/lib/wsu/reader.action?docID=351572>

- Frankish, E. J., Bozkurt, H., Ross, T., Phan-thien, K., Luning, A., Bell, T. L., & Mcconchie, R. (2021). An observational assessment of Australian apple production practices for microbial control. *Food Control*, 123, 107767. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107767>
- Gazula, H., Quansah, J., Allen, R., Scherm, H., Li, C., Takeda, F., & Chen, J. (2019). Microbial loads on selected fresh blueberry packing lines. *Food Control*, 100(January), 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.032>
- Glass, K. A., Golden, M. C., Wanless, B. J., Bedale, W., & Czuprynski, C. (2015). Growth of *Listeria monocytogenes* within a caramel-coated apple microenvironment. *MBio*, 6(5), 2–6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01232-15>
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J. J., Rota, C., & Yangüela, J. (2012). Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and Enterobacteriaceae in the meat industry. *Food Control*, 27(1), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.031>
- Griffith, C. (2005). Improving surface sampling and detection of contamination. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (pp. 588–618). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9781845690533.3.588>
- Griffith, C. (2016). Surface sampling and the detection of contamination. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (Issue 44, pp. 673–696). Woodhead Publishing Series.
- Griffiths, M. (1997). Rapid Microbiological Methods with Hazard Analysis Critical Control Point. *Journal of AOAC International*, 80(6), 1143–1150.
- Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., & Busta, F. F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 78–141. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x>
- Heredia, N., Caballero, C., Cárdenas, C., Molina, K., García, R., Solís, L., Burrowes, V., Bartz, F. E., de Aceituno, A. F., Jaykus, L.-A., García, S., & Leon, J. (2016). Microbial Indicator Profiling of Fresh Produce and Environmental Samples from Farms and Packing Facilities in Northern Mexico. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1197–1209. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-499>
- Hoelzer, K., Pouillot, R., Gallagher, D., Silverman, M. B., Kause, J., & Dennis, S. (2012). Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial

- removal through cleaning and sanitation. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.019>
- Kenney, S. J., & Beuchat, L. R. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Muenchen on apples as affected by application of commercial fruit waxes. *International Journal of Food Microbiology*, 77(3), 223–231. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00113-7)
- Kornacki, J. L., Gurtler, J. B., & Stawick, B. A. (2015). Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In Y. Salfinger & M. L. Tortorello (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Fifth, pp. 103–120). American Public Health Association.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods Staff (ICMSF). (2002). Sampling to assess control of the environment. In *Microbiological Testing in Food Safety Management* (pp. 199–224). https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8369-7_11
- Lehto, M., Kuisma, R., Määttä, J., Kymäläinen, H. R., & Mäki, M. (2011). Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. *Food Control*, 22(3–4), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.029>
- Lynch, M. F., Tauxe, R. V., & Hedberg, C. W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137(3), 307–315. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001969>
- Macarisin, D., Sheth, I., Hur, M., Wooten, A., Kwon, H. J., Gao, Z., De Jesus, A., Jurick II, W., & Chen, Y. (2019). Survival of outbreak, food, and environmental strains of *Listeria monocytogenes* on whole apples as affected by cultivar and wax coating. *Nature Research*, 9(January), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48597-0>
- Magdovitz, B. F., Gummalla, S., Thippareddi, H., & Harrison, M. A. (2020). Evaluating environmental monitoring protocols for *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes* in Frozen Food Manufacturing Facilities. *Journal of Food Protection*, 83(1), 172–187. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-190>
- Marus, J. R., Bidol, S., Altman, S. M., Oni, O., Parker-Strobe, N., Otto, M., Pereira, E., Buchholz, A., Huffman, J., Conrad, A. R., & Wise, M. E. (2019). Notes from the field: Outbreak of Listeriosis likely associated with prepackaged caramel apples - United States, 2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(3), 76–77. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6803a5>

- MINSA. (2007). Guía técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas (RM/461-2007). El Peruano. https://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas_Legales/alimentos/RM_461_2007.pdf
- Moberg, L., & Kornacki, J. (2015). Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In Yvonne Salfinger & M. Tortorello (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (Fifth, pp. 27–43). American Public Health Association.
- Moore, G., & Griffith, C. (2002). A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology*, 19(1), 65–73. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0464>
- Moore, Ginny. (2003). *Rapid Methods for Assessing Surface Cleanliness within the Food Industry: Their Evaluation, Design and Comparison to Traditional Techniques*. University of Wales.
- Moore, Ginny, & Griffith, C. (2002). A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: An industry trial. *International Journal of Environmental Health Research*, 12(4), 317–329. <https://doi.org/10.1080/0960312021000056429>
- Nygaard, A. B., & Charnock, C. (2018). Longitudinal development of the dust microbiome in a newly opened Norwegian kindergarten. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0553-x>
- Odonkor, S. T., & Ampofo, J. K. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview, 5–11. <https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2>
- Parish, M. (1998). Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus-processing facility implicated in a salmonellosis outbreak. *Journal of Food Protection*, 61(3), 280–284. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.3.280>
- Pietrysiak, E., & Ganjyal, G. M. (2018). Apple peel morphology and attachment of *Listeria innocua* through aqueous environment as shown by scanning electron microscopy. *Food Control*, 92, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.049>
- Pietrysiak, E., Smith, S., & Ganjyal, G. M. (2019). Food safety interventions to control *Listeria monocytogenes* in the fresh apple packing industry: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 0, 1–22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12496>

- Ruiz-Llacsahuanga, B., Hamilton, A., Zaches, R., Hanrahan, I., & Critzer, F. (2021). Utility of rapid tests to assess the prevalence of indicator organisms (Aerobic plate count, Enterobacteriaceae, coliforms, *Escherichia coli*, and *Listeria* spp.) in apple packinghouses. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108949. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108949>
- Ryser, E., & Schuman, J. (2015). Mesophilic Aerobic Plate Count. In Y Salfinger & M.L. Tortorello (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (Fifth, pp. 95–101). American Public Health Association.
- Samish, Z., Etinger-Tulczynska, R., & Bick, M. (1963). The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 28, 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1963.tb00194.x>
- Secretaria de Salud. (1995). Norma Oficial Mexicana 093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.
- Tortorello, M. L. (2003). Indicator Organisms for Safety and Quality-Uses and Methods for Detection: Minireview. *Journal of AOAC International*, 86(6), 1208–1217. <https://academic.oup.com/jaoac/article/86/6/1208/5657037>
- U. S. Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service, & Northwest Regional Field Office. (2019). 2019 Washington Annual Statistical Bulletin. https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Annual_Statistica_1_Bulletin/2019/WA_ANN_2019.pdf
- U.S Food and Drug Administration. (2017a). Draft guidance for industry: control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Recuperado de: <http://www.regulations.gov>.
- U.S Food and Drug Administration. (2017b). Fresh Pak Inc. recalls lot specific sliced apple products because of possible health risk. Recuperado de: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/fresh-pak-inc-recalls-lot-specific-sliced-apple-products-because-possible-health-risk>
- U.S Food and Drug Administration. (2017c). Jack Brown Produce, Inc. Recalls Gala, Fuji, Honeycrisp and Golden Delicious apples due to possible health risk. Recuperado de: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/jack-brown-produce-inc-recalls-gala-fuji-honeycrisp-and-golden-delicious-apples-due-possible-health>
- U.S Food and Drug Administration. (2019). North Bay Produce voluntarily recalls fresh apples because of possible health risk. Recuperado de:

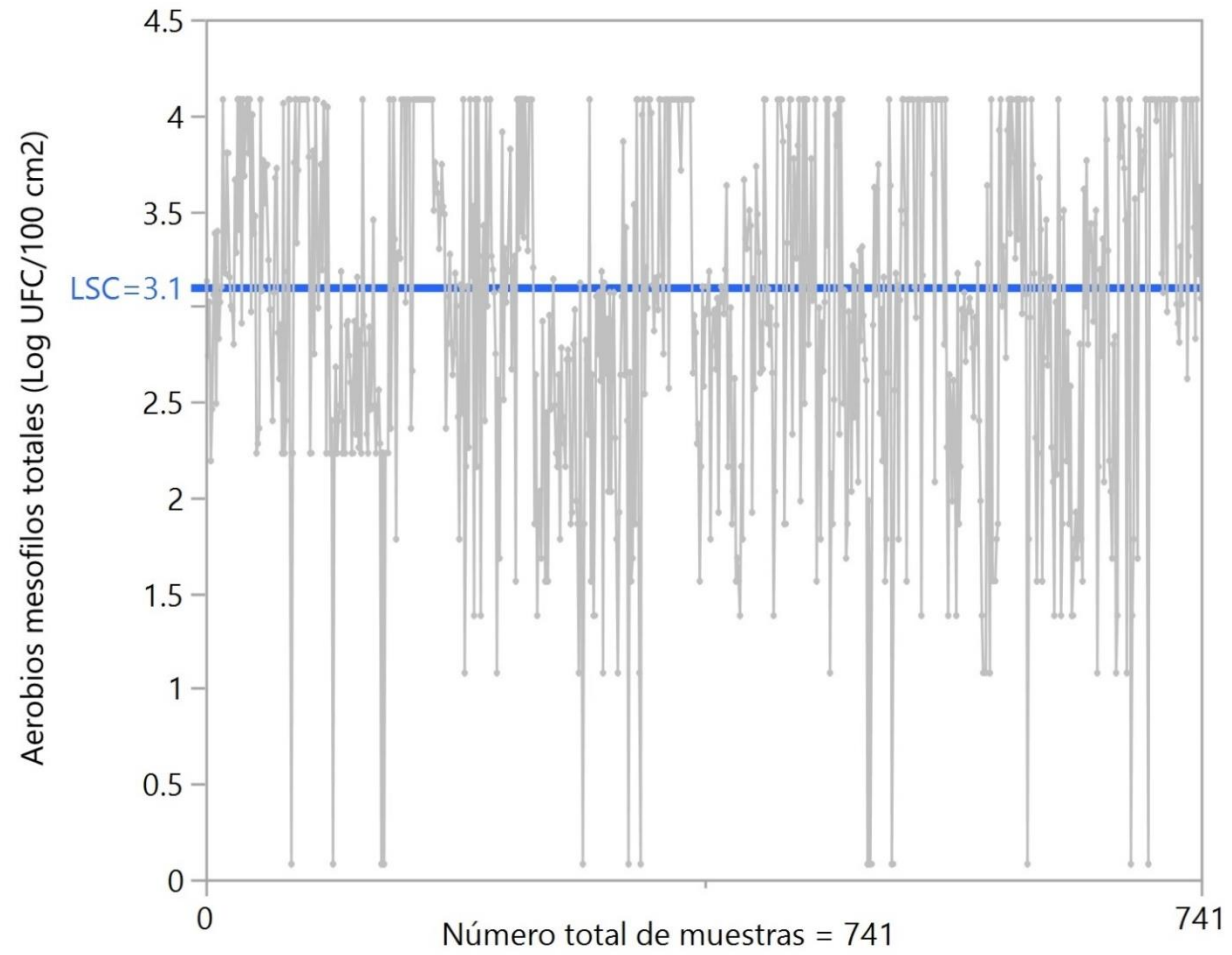
- <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/north-bay-produce-voluntarily-recalls-fresh-apples-because-possible-health-risk>
- U.S Food and Drug Administration. (2020). Country Fresh expands voluntary recall. Recuperado de: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/country-fresh-expands-voluntary-recall#:~:text=Country>
- United Fresh Produce Association. (2018). Strategies for Listeria Control in Tree Fruit packinghouses. Recuperado de: <https://wstfa.org/wstfa-assets/uploads/Strategies-for-Listeria-Control-in-Tree-Fruit-Packinghouses.pdf>
- Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: Fundamental and public health aspects. *ISME Journal*, 5(2), 173– 183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
- Wang, P., Quansah, J. K., Pitts, K. B., & Chen, J. (2021). Hygiene status of fresh peach packing lines in Georgia. *Lwt*, 139(November 2020), 110627. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110627>
- Wassermann, B., Müller, H., & Berg, G. (2019). An Apple a Day: Which Bacteria Do We Eat with Organic and Conventional Apples? *Frontiers in Microbiology*, 10(July), 1– 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01629>
- Williamson, K., Pao, S., Dormedy, E., Phillips, T., Nikolich, G., & Li, L. (2018). Microbial evaluation of automated sorting systems in stone fruit packinghouses during peach packing. *International Journal of Food Microbiology*, 285(July), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.024>
- Wu, S. T., Burnett, J., Wang, J., Hammons, S. R., Veenhuizen, D. R., & Oliver, H. F. (2020). Infrastructure, sanitation, and management practices impact *Listeria monocytogenes* prevalence in retail grocery produce environments. *Food Control* (109), 106911. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106911>
- Xiong, J. (2017). Food Safety Knowledge and Practices of College Students. College of Saint Benedict/Saint John's University. Recuperado de: https://digitalcommons.csbsju.edu/elce_cscday

VIII. ANEXOS

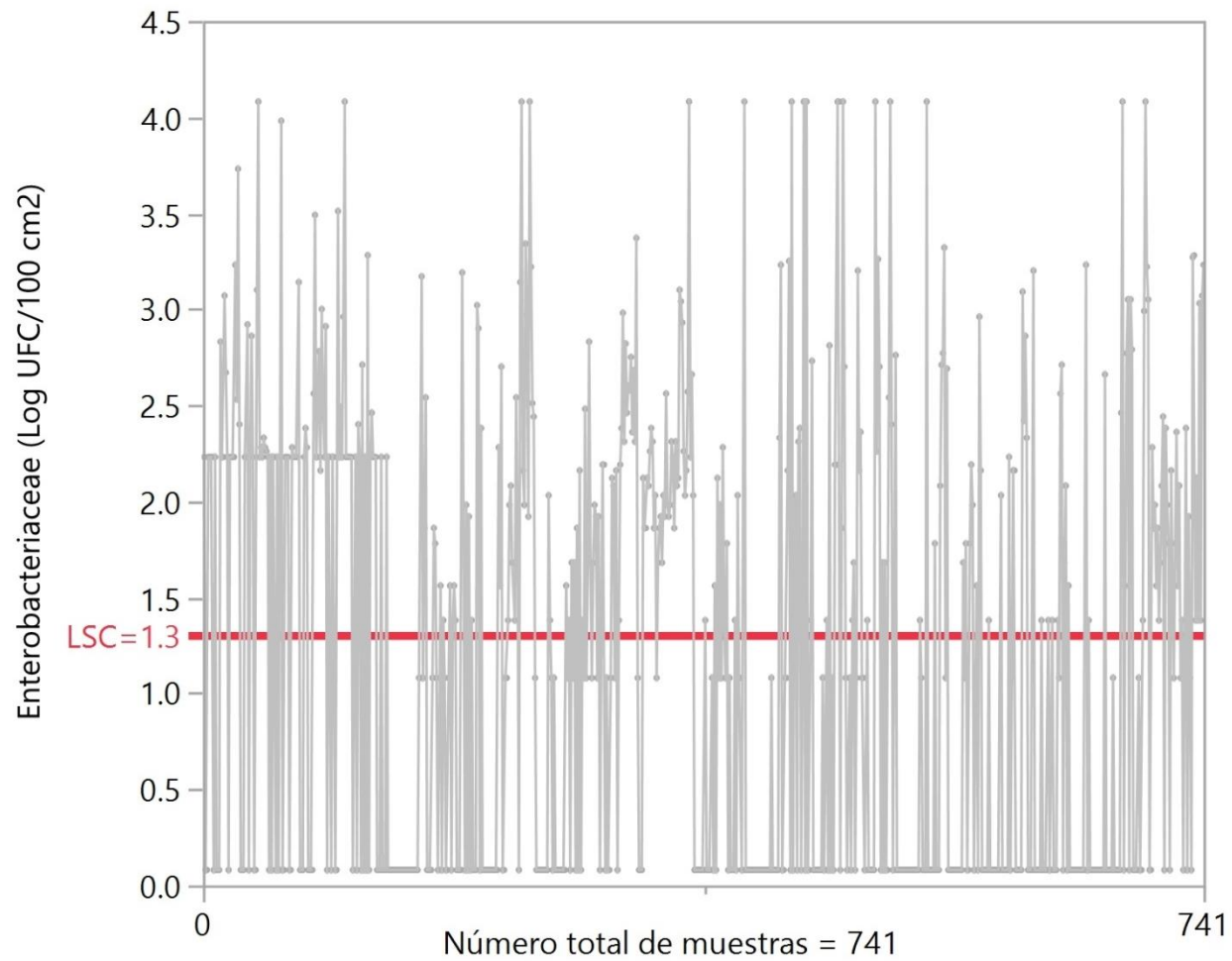
Anexo 1. Número de superficies muestreadas según tiempo de almacenamiento de manzanas, estación del año en que se realizó el muestreo y operación unitaria del proceso de empaque de manzanas

Estación del año	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Número de superficies muestreadas
Tiempo de almacenamiento de manzanas (meses)	1 a 3	4 a 6	7 a 9	10 a 12	
Operación unitaria					
Lavado	18	18	17	17	70
Lavado/enjuague/desinfección	20	20	20	19	79
Primer secado (Ventiladores)	19	19	19	18	75
Encerado	12	12	12	11	50
Segundo secado (Sec. túnel)	22	22	22	22	85
Clasificación	76	76	75	75	302
Empacado	20	20	20	20	80
Número de superficies muestreadas	187	187	185	182	741

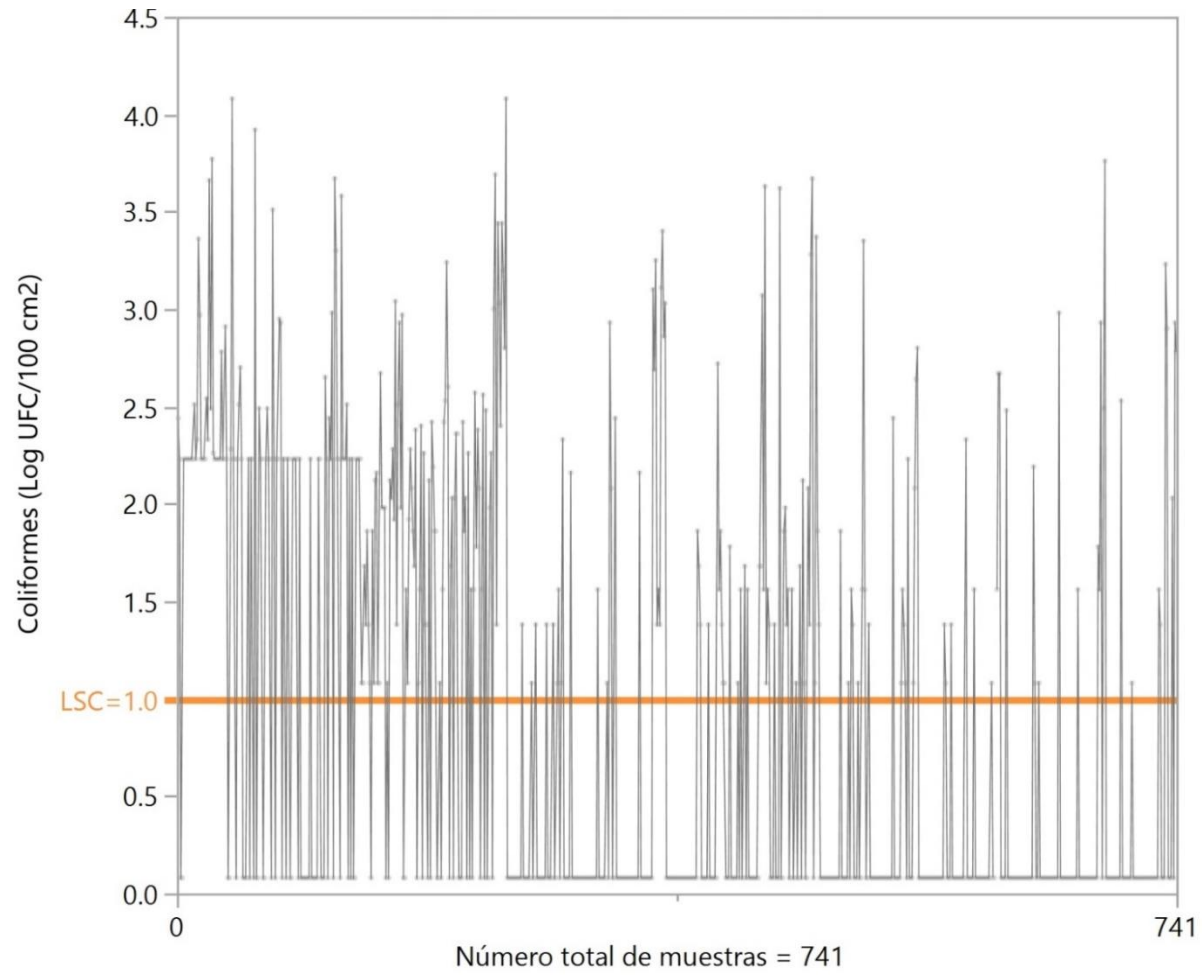
Anexo 2. Límite Superior de Control (LSC) de recuentos de aerobios mesófilos totales en superficies de contacto con alimentos de plantas de empaque de manzana luego de procedimientos de limpieza y desinfección



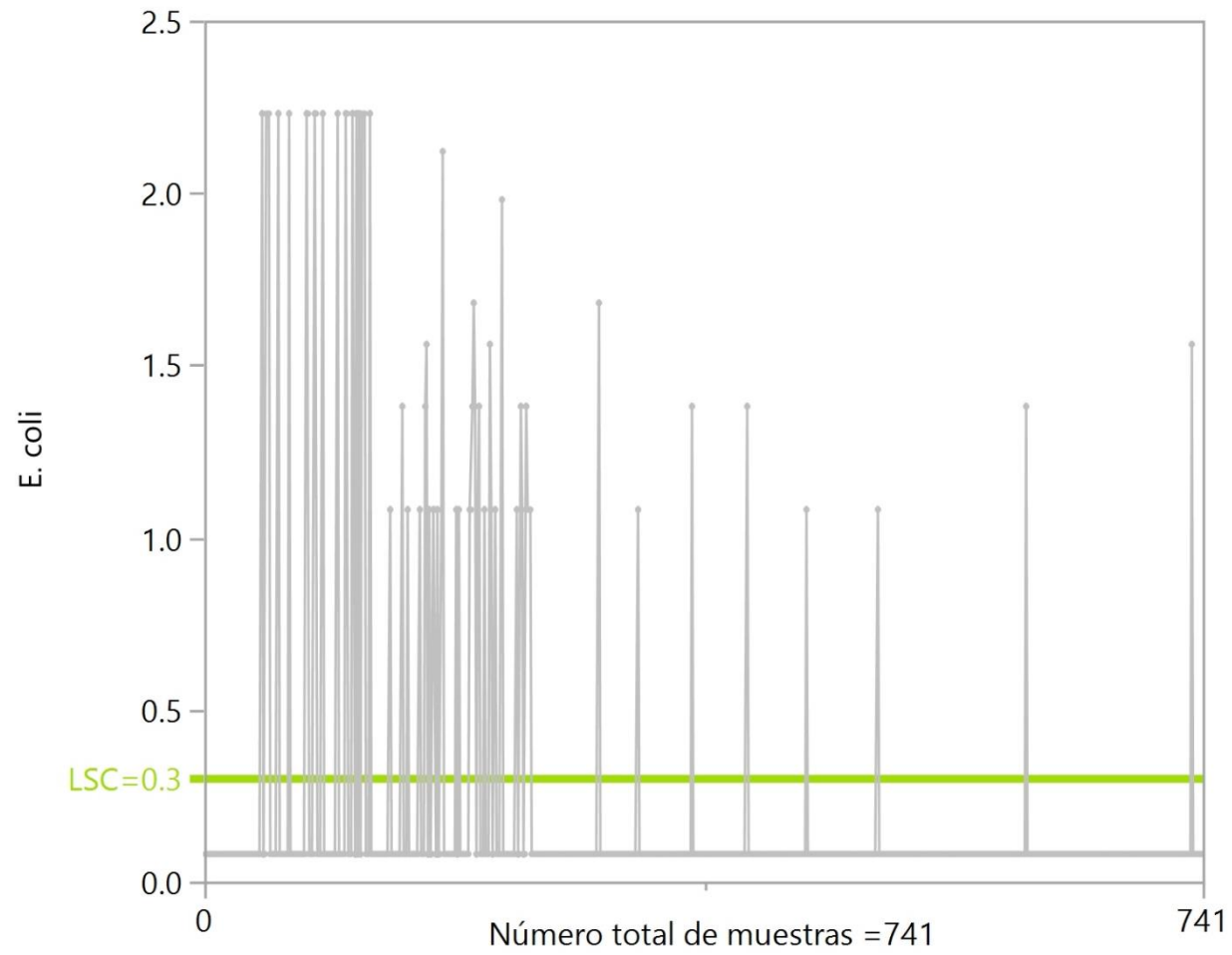
Anexo 3. Límite Superior de Control (LSC) de recuentos de *Enterobacteriaceae* en superficies de contacto con alimentos de plantas de empaque de manzana luego de procedimientos de limpieza y desinfección



Anexo 4. Límite Superior de Control (LSC) de recuentos de coliformes en superficies de contacto con alimentos de plantas de empaque de manzana luego de procedimientos de limpieza y desinfección

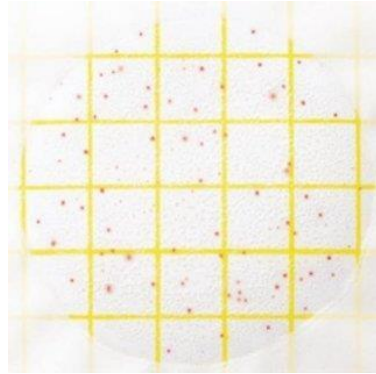


Anexo 5. Límite Superior de Control (LSC) de recuentos de *E. coli* en superficies de contacto con alimentos de plantas de empaque de manzana luego de procedimientos de limpieza y desinfección



Anexo 6. Ejemplo de cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas Petrifilm

- Petrifilm Aerobios mesófilos totales:



Según el contador de recuento de colonias automático, este Petrifilm contenía 80 UFC. Debido a que se sembró 1 ml del total (10 ml D/E caldo neutralizante contenido en la esponja + 2 ml de agua estéril desionizada añadida= 12 ml) en la placa Petrifilm y no se realizaron diluciones posteriores, el cálculo para determinar cuántas UFC se encontraban en el total de superficie muestreada (100 cm²), se realizó de la siguiente manera:

80 UFC → 1 ml de siembra en Petrifilm

“X” UFC → 12 ml total (10 ml D/E caldo neutralizante contenido en la esponja + 2 ml de agua estéril desionizada añadida)

Por lo tanto: “X” = 960 UFC/100cm²

Se aplicó Log10: 2.98 UFC/100cm²