



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“PERFIL DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE UNA PLANTA
PRODUCTORA DE JITOMATE HIDROPÓNICO”.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA
MARIA LETICIA RICO ROMERO

DIRIGIDA POR
DR. EDUARDO FERNANDEZ ESCARTIN

SINODALES

DR. EDUARDO FERNANDEZ ESCARTIN
Presidente

DR. JAVIER CASTRO ROSAS
Secretario

DR. RAMÓN A. MARTÍNEZ PENICHE
vocal

M. en C. MONTSERRAT HERNÁNDEZ I.
Suplente

M. en C. JOSEFINA SALDAÑA LOZANO
Suplente

M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES.
Director de la Facultad de Química

DR. SERGIO QUESADA ALDANA
Director de Investigación y Posgrado

No. Adq. H 67927

No. Título _____

Clas 635.642

R 541p



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)**

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**“PERFIL DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE UNA PLANTA
PRODUCTORA DE JITOMATE HIDROPÓNICO”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

MARIA LETICIA RICO ROMERO

QUERÉTARO, QRO., JUNIO DE 2003.

Resumen

El cultivo hidropónico, que consiste en proveer a la planta de los nutrientes necesarios para su crecimiento en ausencia de tierra, ofrece grandes expectativas para abatir la presencia de microorganismos patógenos. Esta tecnología es relativamente nueva y los estudios acerca de la microbiología implicada son más bien escasos. En el presente trabajo se determinó la microbiología del jitomate y de diversos materiales dentro de invernaderos hidropónicos, que podían operar como posibles reservorios y fuentes de contaminación. Paralelamente, se investigó la microbiología de jitomate comercial. A lo largo de 20 meses se colectaron 1603 muestras diversas involucradas en la producción de jitomate hidropónico y de jitomate del comercio. El jitomate hidropónico presentó escasa carga microbiana con medianas de <4 de bacterias mesófilas aerobias (BMA), 6 de *Enterobacteriaceae*, <3 de organismos coliformes totales (OCT), <3 de hongos y 2 de levaduras, expresadas en \log ufc/ jitomate. En jitomates de mercado y supermercado se obtuvieron niveles superiores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) a los obtenidos en jitomate hidropónico, con medianas de 5.9 a 6.5 de *Enterobacteriaceae*, 3.7 a 5.1 de OCT, 4.3 a 4.6 hongos, y 4.9 a 5.1 levaduras, expresadas en \log ufc / jitomate. La presencia global de *Salmonella* spp en jitomate hidropónico fue de 2.95% entre 541 muestras y en jitomate del comercio de 4.4% de 114 muestras. Entre 1603 muestras de jitomate, tierra, encharcamientos y materiales involucrados en la producción de jitomate hidropónico, la mayor incidencia de *Salmonella* spp se observó en muestras de esponjas nuevas (16.7%), encharcamientos (14.7%), trapos limpios (7.5%) y jitomate hidropónico sin limpiar (6.3%). Todas las muestras resultaron negativas a *Listeria* y *Listeria monocytogenes*. La concentración de *Enterobacteriaceae* y OCT en jitomate de mercado, supermercado e hidropónico no se asoció con la presencia de *Salmonella* spp. *Escherichia coli* tampoco funcionó como indicador de la presencia de *Salmonella* spp. El contenido de BMA de los jitomates hidropónicos no difiere significativamente ($p > 0.05$) respecto al nivel de altura del fruto en la planta, localización o tipo de ventilación del invernadero en donde se encuentre. El lavado de manos permitió abatir hasta 3 logaritmos el contenido de *Enterobacteriaceae*; hecho similar ocurrió con el lavado de trapos con decrementos hasta de 6 logaritmos de OCT. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el contenido de *Enterobacteriaceae* de las esponjas sucias y las sometidas a lavado y desinfección. Si bien el estudio demuestra un bajo perfil de contaminación del jitomate cultivado en los invernaderos hidropónicos, es necesario y posible conferir una mayor protección a su inocuidad modificando o introduciendo prácticas sanitarias de operación en etapas críticas del proceso.

(Palabras clave: jitomate, cultivo hidropónico, *Salmonella*)

Summary

Hydroponic cultivation, which consists of providing plants with the nutrients necessary for their growth in the absence of soil, offers great expectations in reducing the presence of pathogenic microorganisms. This work determined the microbiology of the tomato and different material found in hydroponic greenhouses as possible sources of contamination. At the same time, the microbiology of the commercial tomato was studied. 1,603 different samples involved in the production of hydroponic and commercial tomatoes were collected during a period of 20 months. Hydroponic tomatoes had a low microbial content with means of: BMA <4, *Enterobacteriaceae* 6, OCT <3, fungus <3 and yeast 2, expressed in \log_{10} ufc/tomato. In market and supermarket tomatoes, significantly higher statistics ($p < 0.05$) were obtained compared to hydroponic tomatoes with means of 5.9 to 6.5 for *Enterobacteriaceae*, OCT of 3.7 to 5.1, fungus 4.3 to 4.6 and 4.9 to 5.1 for yeast, expressed in \log_{10} ufc/tomato. The presence of *Salmonella* spp in hydroponic tomatoes was 2.95% in 541 samples, and commercial tomatoes were 4.4% positive in 114 samples. Among 1,603 samples of tomatoes, soil, pools of water and material used in hydroponic tomato production, the greatest incidence of *Salmonella* spp was observed in samples of new sponges (16.7%), pools of water (14.7%), clean cloths (7.5%) and unwashed hydroponic tomatoes (6.3%). All samples were negative to *Listeria* and *Listeria monocytogenes*. The concentration of *Enterobacteriaceae* and OCT in market, supermarket and hydroponic tomatoes was not associated with the presence of *Salmonella* spp. Neither did *E. coli* indicate the presence of *Salmonella* spp. The BMA content of hydroponic tomatoes does not significantly differ according to greenhouse altitude, location or type ventilation where they are grown. Hydroponic tomatoes are cleaned as they are packed. This operation includes diverse material such as workers' hands, cloths and sponges. We evaluated the washing of hands, cloths and sponges. Hand washing reduced *Enterobacteriaceae* to 3 \log_{10} ; similar results were obtained by washing cloths, reducing OCT to 6 \log_{10} . There is no significant difference ($p < 0.05$) between the *Enterobacteriaceae* content of dirty sponges and of those that were washed and disinfected.

(Key Words: Tomato, hydroponic cultivation, *Salmonella*)

Dedicatoria

Dedicado con todo mi amor a mis padres, Amador y Carmen.

**Gracias por ser para mi un ejemplo de bondad,
fortaleza, sabiduría y dedicación.**

**Gracias César y Ray por el impulso, apoyo y ayuda
que siempre me han brindado.**

A ti Arturo por formar parte de mis sueños.

A ti Ricardo por ser mi fuerza e inspiración.

Agradecimientos

**Al Dr. Eduardo Fernández Escartín por su apoyo y aliciente.
Por la enseñanza que ha inculcado en mi vida.**

**A la M. En C. Josefina Saldaña Lozano por compartir su experiencia.
Por ser una gran amiga.**

**A Mariella, Erika, Maribel y Carolina por su ayuda y apoyo
Que me permitió lograr esta meta.**

**A la Empresa Agros S. A. De C.V.
Y a la Ing. Isabel Coronado.**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Índice general

	Pág.
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de Cuadros	vii
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	xi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
II.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	3
II.1.1 Algunos microorganismos patógenos identificados en brotes por consumo de frutas y verduras.	8
II.1.2 Microbiología de frutas y verduras.	14
II.1.2.1 Deterioro microbiano de frutas y verduras	16
II.1.2.2 Microorganismos patógenos en frutas y verduras.	18
II.1.3 Sobrevivencia y multiplicación de microorganismos patógenos en frutas y verduras	21
II.2 Jitomate	23
II.3 Agroindustria del jitomate en México.	24
II.3.1 Situación nacional y mundial.	24
II.3.2 Comercialización.	29
II.4 Cultivo hidropónico	29
II.4.1 Desarrollo, maduración y cosecha de jitomate hidropónico.	33
III. Objetivos	34
III.1 Objetivo general.	34
III.2 Objetivos específicos.	34

IV. Materiales	35
V. Metodología	38
V.1.1 Descripción y elaboración del diagrama de flujo del proceso.	38
V.1.2 Selección de los puntos de muestreo y recolección de muestras .	41
A) Puntos de muestreo.	41
B) Recolección de muestras.	42
V.2.1 Preparación de muestras.	45
V.2.2 Grupos indicadores	45
V.2.3 Microorganismos patógenos.	51
V.2.4 Recuperación de bacterias mesófilas aerobias del aire	55
V.2.5 Evaluación de la técnica de la USDA para recuperar <i>Salmonella</i> spp a partir de jitomates.	56
V.2.6 Evaluación de la técnica de la USDA para recuperar <i>Listeria</i> spp. a partir de jitomates.	58
V.3.1 Identificación de microorganismos	60
V.4.1 Compuo de resultados y elaboración del perfil de contaminación.	64
V.4.2 Análisis estadístico	64
V.5 Microbiología de jitomate comercial.	64
V.5.1 Selección de puntos de muestreo y recolección de muestras.	64
V.5.2 Microbiología.	64
VI. Resultados y discusión.	65
VII. Conclusiones.	144
VIII. Bibliografía.	149

Índice de Cuadros

Cuadro	Título	Pág.
1.	Brotes de enfermedades por microorganismos patógenos asociados con frutas y verduras crudas.	4
2.	Brotes y casos de enfermedades transmitidas por alimentos, Estados Unidos 1993-1997.	6
3.	Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, en Estados Unidos, asociados al consumo de frutas y verduras crudas.	7
4.	Alimentos implicados en brotes de salmonelosis.	11
5.	Norma oficial alemana de la microbiología de ensaladas mixtas preparadas con verduras.	13
6.	Incidencia de <i>Salmonella</i> en frutas y verduras crudas.	19
7.	Positividad de algunos patógenos en frutas y verduras que se expenden en mercados y supermercados.	20
8.	<i>Listeria monocytogenes</i> en verduras crudas y mínimamente procesadas listas para su consumo (diferentes países).	22
9.	Principales productos crudos exportados de México a EUA, Canadá y países europeos, 1996-1999.	25
10.	Porcentaje de exportación de hortalizas de México a diversos países.	28

Índice de Tablas

Tabla	Título	Pág.
1.	Principales países productores de jitomate (1996-2000).	26
2.	Resumen de seis grupos microbianos en jitomates muestreados en el centro, cruceros y partes laterales, procedentes de invernaderos de ventilación superior y lateral durante los períodos caluroso, frío y lluvioso.	71
3.	Positividad a <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> spp en jitomates muestreados en el centro, cruceros y partes laterales procedentes de invernaderos de ventilación superior y lateral, durante los períodos caluroso, frío y lluvioso.	75
4.	Seis grupos microbianos en jitomates sin limpiar del área de empacado.	78
5.	Seis grupos microbianos en jitomates recién limpiados en el área de empacado.	79
6.	Positividad a <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> spp en jitomates sin limpiar y limpiados de el área de empacado.	82
7.	Cinco grupos microbianos en tierra colectada en el interior y en la periferia exterior de invernaderos.	83
8.	Positividad de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> spp en tierra colectada de la periferia de invernaderos próximos a donde se cultivan espárragos y maíz.	85
9.	Cuatro grupos microbianos de agua de encharcamiento dentro de invernaderos de ventilación superior y vivero.	86
10.	Positividad a <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> spp en solución hidropónica, tierra y agua de encharcamientos durante la etapa de crecimiento y cosecha de jitomate.	87

11. <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> y <i>E.coli</i> en jitomates que espontáneamente caen sobre la tierra, superficie plástica y agua de encharcamiento dentro del invernadero.	89
12. <i>Enterobacteriaceae</i> en el polvo de los pasillos de concreto de un invernadero de ventilación superior	91
13. NMP de <i>E.coli</i> en el polvo de los pasillos de concreto dentro de un invernadero de ventilación superior.	92
14. Cinco grupos microbianos en materiales en contacto con la semilla y plántulas durante la etapa de germinación.	94
15. Positividad a <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en materiales en contacto con la semilla y plántulas durante la etapa de germinación	95
16. Tres grupos microbianos en esponjas nuevas, y que han sido sometidas a tratamiento de lavado y almacenado, utilizadas durante la cosecha	98
17. Positividad de <i>Salmonella</i> y <i>E.coli</i> en esponjas nuevas o lavadas, almacenadas y sin almacenar utilizadas durante la cosecha.	101
18. Cinco grupos microbianos en trapos sucios y limpios utilizados en el limpiado del jitomate en el área de empaçado.	102
19. Efecto de tres condiciones de trabajo sobre el contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> en manos de cosechadores y empacadores de jitomate hidropónico	104
20. Contenido de organismos coliformes fecales y <i>E. coli</i> en las manos de los trabajadores de un invernadero y en el área de empaçado	106
21. <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>E. coli</i> en suelas de zapatos de trabajadores que pisan o no el tapete sanitario.	107
22. Inactivación de <i>Enterobacteriaceae</i> en esponjas sucias sometidas a 4 tratamientos térmicos en agua	111
23. <i>Enterobacteriaceae</i> en jitomates, trapos y manos de trabajadores durante el limpiado en el área de empaque (resumen de 2 estudios)	113

24. Persistencia de coliformes en trapos, utilizados en el área de empaclado, sometidos a lavado-desinfección (resumen de 3 estudios).	115
25. Positividad a <i>E.coli</i> y <i>Salmonella</i> en trapos y guantes utilizados, recién lavados y secados, y secados y almacenados (resumen de 3 estudios).	116
26. Recuperación de <i>Salmonella</i> de diversas muestras en dos caldos de enriquecimiento (CSC, CTT) y cuatro medios selectivos (AVB, ASB, XLD, SS).	118
27. Cinco grupos microbianos en jitomate “saladette” colectado en mercados y supermercados en período frío, caluroso y lluvioso	130
28. <i>Enterobacteriaceae</i> de jitomate “bola” comercial colectado en mercados y supermercados durante el período lluvioso.	133
29. Positividad de <i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> y <i>Listeria</i> spp en jitomate “saladette” colectado en mercados y supermercados en períodos frío, caluroso y lluvioso.	137
30. Positividad de <i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> y <i>Listeria</i> spp en jitomate “bola” colectado en mercados y supermercados en período lluvioso	138
31. Resumen del contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> en jitomate	139
32. <i>Enterobacteriaceae</i> identificadas de diversos materiales durante la producción de jitomate hidropónico y de jitomate comercial “saladette”.	142
33. <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> recuperadas de diversos materiales durante la producción de jitomate hidropónico y en jitomate comercial “saladette”	143

Índice de Figuras

Figura	Título	Pág.
1.	Consumo per cápita (Kg) de frutas y verduras crudas en los Estados Unidos.	11
2.	Efecto del tipo de ventilación sobre el contenido de bacterias mesófilas aerobias (período frío). Análisis estadístico.	73
3.	Efecto del período del año sobre el contenido de bacterias mesófilas aerobias en jitomates en invernaderos de ventilación superior y lateral. Análisis estadístico	74
4.	Efecto del limpiado sobre el contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> en jitomate del área de empacado. Análisis estadístico.	80
5.	<i>Enterobacteriaceae</i> en esponjas usadas, lavadas y almacenadas. Análisis estadístico.	99
6.	Efecto de tres condiciones de trabajo sobre el contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> en manos de cosechadores y empacadores de jitomate hidropónico. Análisis estadístico	108
7.	<i>Enterobacteriaceae</i> en las suelas de zapatos de trabajadores, cuando se pisa o no el tapete sanitario (800 ppm de sal cuaternaria de amonio). Análisis estadístico.	109
8.	Bacterias mesófilas aerobias en aire al nivel del piso (a) y a 1.5 mts de altura (b), antes y después de barrer dentro del área de almacenamiento de jitomate hidropónico. Análisis estadístico	121
9.	Bacterias mesófilas aerobias en aire colectado de diversas zonas dentro del área de almacenamiento (a), de empacado (b) y de lavado de esponjas (c). Análisis estadístico.	123
10.	Bacterias mesófilas aerobias en aire a dos niveles de altura en el centro de un invernadero de ventilación superior (a) y ventilación	

lateral (b). Análisis estadístico.	124
11. Bacterias mesófilas aerobias en aire de diversas zonas dentro del invernadero de ventilación lateral (a) y ventilación superior (b). Análisis estadístico.	125
12. Bacterias mesófilas aerobias en aire de diversas zonas externas a los invernaderos. Análisis estadístico	127
13. Bacterias mesófilas aerobias en aire colectado en 4 localidades del interior y del exterior de un invernadero de ventilación superior. Análisis estadístico.	128
14. <i>Enterobacteriaceae</i> en jitomate “saladette” muestreado en mercados y supermercados en el período caluroso (a), lluvioso (b) y frío (c). Análisis estadístico	131
15. <i>Enterobacteriaceae</i> en jitomate “bola” muestreado en mercados y supermercados en el período lluvioso. Análisis estadístico	134
16. <i>Enterobacteriaceae</i> en jitomate “saladette” muestreado en supermercados (a) y mercados (b) en los períodos lluvioso, caluroso y frío. Análisis estadístico	135

I. Introducción

La producción de frutas y verduras en nuestro país muestra un crecimiento notable. Este incremento resulta en parte de las perspectivas de los mercados de exportación y de una mayor demanda por parte del mercado nacional. Obedece además al desarrollo de nuevas tecnologías de producción entre las que destacan el cultivo en forma hidropónica.

Las verduras crudas se encuentran expuestas a contaminación por gérmenes patógenos. Entre las fuentes de tales microorganismos tiene especial importancia la materia fecal humana y animal a través de la tierra de cultivo y el agua de riego. El cultivo hidropónico abate notablemente este problema. Sin embargo, por otras más, persisten riesgos de contaminación humana y de contaminación por patógenos extraintestinales.

Las empresas productoras y exportadoras de alimentos, enfrentan la obligatoriedad de satisfacer normas microbianas que los importadores establecen, específicamente, un bajo contenido de microorganismos indicadores y/o negativo para patógenos. Esta rigidez se sustenta en el conocimiento de brotes de enfermedades de naturaleza microbiana asociados al consumo de verduras, y de manera particular de jitomate. Hay que señalar además, que de estos alimentos se han aislado patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp (Beuchat., 1995).

En muchos países (principalmente los industrializados) no suele recurrirse a la aplicación de estiércol como fertilizante, al fecalismo al aire libre y al riego con aguas residuales crudas o mal tratadas, todas las cuales son reconocidas fuentes de contaminación de verduras crudas (Beuchat., 1995). En nuestro país, por el contrario, con cierta frecuencia se observan estas prácticas. Es de esperar entonces, que las verduras puedan ser vehículo de microorganismos patógenos que se encuentran participando en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

Desafortunadamente en México, cifras sobre la microbiología de frutas y verduras, incluido su contenido de bacterias patógenas y su papel como vehículos

de brotes de enfermedad, es limitada. Esta falta de información y el bajo control sanitario que con frecuencia ocurre durante el cultivo, cosecha y distribución de estos productos, incrementa el riesgo de adquirir enfermedad debido a su consumo.

Los datos epidemiológicos provenientes de otros países sobre brotes de enfermedad y aislamiento de patógenos en frutas y verduras, advierten sobre el riesgo que puede existir al consumir frutas y verduras contaminadas. En varios países se han reportado brotes por una gran variedad de frutas y verduras, incluidas aquellas consideradas tradicionalmente inofensivas como la cebolla y el ajo (cit. en Fernández, 1998).

En Estados Unidos, es más vasta la información acerca de la frecuencia con la que los alimentos se ven implicados (Bean y col., 1997).

El sistema de análisis de riesgos y puntos de control críticos (APPCC), fue diseñado para asegurar la inocuidad de los alimentos producidos para los programas espaciales en Estados Unidos (Bauman, 1990). Actualmente, es considerado el más confiable para producir alimentos inocuos (Buchanan, 1980). El APPCC tiene un enfoque sistemático, e incluye la identificación, evaluación y control de riesgos en etapas del procesamiento que son críticas para asegurar la inocuidad de un alimento.

En el presente estudio una empresa productora y exportadora de jitomate hidropónico planteó la necesidad de apoyo por parte de instituciones de educación superior, que cuente con recursos humanos y materiales para realizar investigaciones que permitan fundamentar las acciones que aplican dentro del sistema APPCC que han instalado. El correcto diseño de este sistema para una planta productora particular requiere inevitablemente de información básica acerca de la microbiología del producto (y factores que la determinan) a lo largo de la producción, empaque y distribución del jitomate. Esta información permite detectar peligros microbianos a lo largo del proceso de producción e identificar puntos críticos para su control, así como diseñar medidas correctivas que permitan obtener un producto inocuo y establecer criterios de verificación del sistema.

II. Antecedentes

II.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

El consumo de alimentos como frutas y verduras es una dicotomía en la perspectiva de la salud ya que forman parte importante de la alimentación humana, ayudando a preservar y promover la salud y bienestar (Fernández, 1998). Sin embargo, es factor determinante en la transmisión de enfermedades producidas por microorganismos (Cuadro 1), (Castro, 1999; IFT, 2001).

Entre 1995 y 1996, el 2% de las enfermedades causadas por alimentos en América Latina fueron asociadas al consumo de frutas y hortalizas (IFT, 2001). Los microorganismos patógenos aislados de estos productos, provienen tanto de animales como del hombre y algunos son comunes en el ambiente. Entre ellos se encuentran *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*.

Alimentos como la leche, carne y quesos se involucran en mayor proporción en brotes de ETAs, en tanto que las verduras aparecen con menor frecuencia como vehículos de bacterias patógenas.

Las ETAs constituyen uno de los problemas de salud más comunes en el mundo, con gran impacto social y económico. En nuestro país, las condiciones de elaboración y comercialización son con frecuencia inadecuadas, pero no se cuenta con suficiente información confiable sobre la incidencia de estas enfermedades.

En Estados Unidos, por ejemplo, algunos investigadores estiman que anualmente se presentan entre 12.6 y 76 millones de casos de enfermedades asociadas al consumo de alimentos. En Canadá la cifra es de 2.2 millones de casos al año. En México, la media de los últimos dos años para los casos de enfermedad diarreica es de 5, 147, 611 casos en todo el país; considerando que sólo cerca del 1-4% de los casos reales se reportan y que entre el 50-60% son transmitidos por alimentos, se estima que más de 257.4 millones de casos de ETAs se presentan anualmente (Fernández, 2000).

Cuadro 1. Brotes de enfermedad por microorganismos patógenos asociados con frutas y verduras crudas.

Microorganismo	año del brote	Producto	País
<i>E. coli</i> O157:H7	1995	Lechuga	E.U.A
	1995	Lechuga	Canadá
	1995	Ensalada	Canadá
	1996	Perejil	Japón
	1997	Alfalfa	E.U.A
	1998	Coliflor	E.U.A.
<i>Salmonella</i> spp.	1979-1991	Sandía	E.U.A.
	1988	Soya	Reino Unido
	1990	Semilla de soya	Suecia
	1990	Melones	México
<i>S. Javiana</i>	1991	Jitomate	E.U.A.
	1993		
<i>S. Montevideo</i>	1991	Melón	E.U.A.
	1993	Jitomate	E.U.A.
<i>S. Bovismorbificans</i>	1994	Alfalfa	E.U.A.
<i>S. Havana</i>	1998	Alfalfa	E.U.A.
<i>S. Baildon</i>	1998-99	Jitomate	E.U.A.
<i>S. Enteriditis</i>	2000	Alfalfa	Canadá
<i>Shigella sonnei</i>	1983	Lechuga	E.U.A.
	1986	Lechuga	E.U.A.
<i>Listeria monocytogenes</i>	1979	Jitomate y lechuga	E.U.A.
<i>Listeria</i> spp.	1981	Ensalada de col	Canadá
	1997	Albahaca fresca	E.U.A.

Fuente : Castro, (1999); IFT,(2001).

Alimentos implicados con mayor frecuencia en brotes son la carne de res, cerdo y pollo, productos marinos, huevo y lácteos (Park, 1999) (Cuadro 2). Algunos de estos alimentos, por ejemplo la leche no pasteurizada ocasiona frecuentemente infección por *Salmonella* spp en Inglaterra en 1950 y en Escocia en 1980 (McClenlland y Pinder, 1994). En 1985, un queso estilo mexicano fue responsable de un brote de listeriosis en el cual 48 personas de 142 infectadas murieron. Las muestras de queso examinado contenían 10^3 - 10^4 células de *L.monocytogenes* /g de queso (FDA y USDA, 1991), y en 1989, S. Javiana estuvo implicada en un brote de salmonelosis en Minnesota y Wisconsin causado por el consumo de queso Mozzarella (Leyer y Jonson, 1992).

Estos alimentos de origen animal pueden contener patógenos en bajo número, pero la gravedad del problema no es su presencia, pues si el alimento se somete a un adecuado tratamiento térmico, se abate el problema. La preocupación radica en que se suscite una contaminación por una inadecuada manipulación que favorezca la diseminación hacia materiales que después tengan contacto con otros alimentos listos para su consumo. Lo anterior no sólo se suscita cuando se manejan productos de origen animal sino también de origen vegetal. Un brote de salmonelosis en Inglaterra en 1988 estuvo asociado con el consumo de habichuelas (atribuido a S. Saint-paul) (Francis y col., 1999). Y un brote de infección con *L. monocytogenes* durante el verano de 1979 afectó a 23 pacientes de 8 hospitales de Boston; este brote fue atribuido al consumo de una ensalada de verduras crudas (Francis y col., 1999).

Datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) indican que el número de brotes de ETAs relacionados a productos crudos, y el número de personas afectadas, se han incrementado en años recientes (Cuadro 3). Un sinnúmero de razones ha sido propuesto para explicar este incremento de ETAs con los productos crudos. Desde principios de los 70's, ha sido observado un significativo incremento en el consumo de productos crudos ha sido observado en los Estados Unidos presumiblemente debido, en parte, a la activa promoción en que las frutas y verduras son parte importante de una dieta balanceada.

Cuadro 2. Brotes y casos de enfermedades transmitidas por alimentos Estados Unidos, 1993-1997.

Alimento	Brotes	Casos
Pescado	140	725
Ensaladas diversas	97	4,547
Carne de res	66	3,205
Frutas y verduras	66	12,357
Bivalvos	47	1,868
Pasteles	35	853
Carne de pavo	22	758
Carne de pollo	20	1,113
Huevos	19	367
Ensaladas pescado/pollo	16	1,381
Helado de crema	15	1194
Carne de cerdo	14	638
Leche	10	207

Fuente: modificado de Fernández (2000).

Cuadro 3. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, en Estados Unidos, asociados al consumo de frutas y verduras crudas.

Años Reportados	1982-1987	1988-1991	1992-1997
Casos en brotes ¹	4	8	14
Brotes ²	2	4	2

¹ Un caso es definido como una persona enferma asociada con un brote.

² Un brote es definido como dos o más casos de una enfermedad similar resultante de la ingesta de un alimento común.

* Adaptada por el comité regulador nacional de criterios microbiológicos para alimentos, 1999 y el CDC, 2000).

Desde 1982 a 1997, el consumo *per capita* de frutas y verduras incremento de 91.6 a 121.1, es decir, 32% (Gráfica 1) (IFT, 2001).

El mínimo procesamiento requerido para productos crudos y por ello, la ausencia de alguna etapa efectiva de eliminación de microorganismos, da lugar a alimentos que podrían contener microorganismos, algunos de los cuales son potencialmente peligrosos para la salud humana.

El alimento puede contaminarse con un patógeno y este sobrevivir hasta el tiempo de consumo a niveles suficientes para causar enfermedad. La dosis infectante (mínimo número de organismos necesarios para causar enfermedad) es muy baja en casos en donde sólo es necesario contaminar el alimento y sobrevivir, sin multiplicarse. Sin embargo, en otros puede ser esencial la multiplicación del patógeno, ya sea para provocar enfermedad ante dosis infectantes elevadas o para producir toxinas.

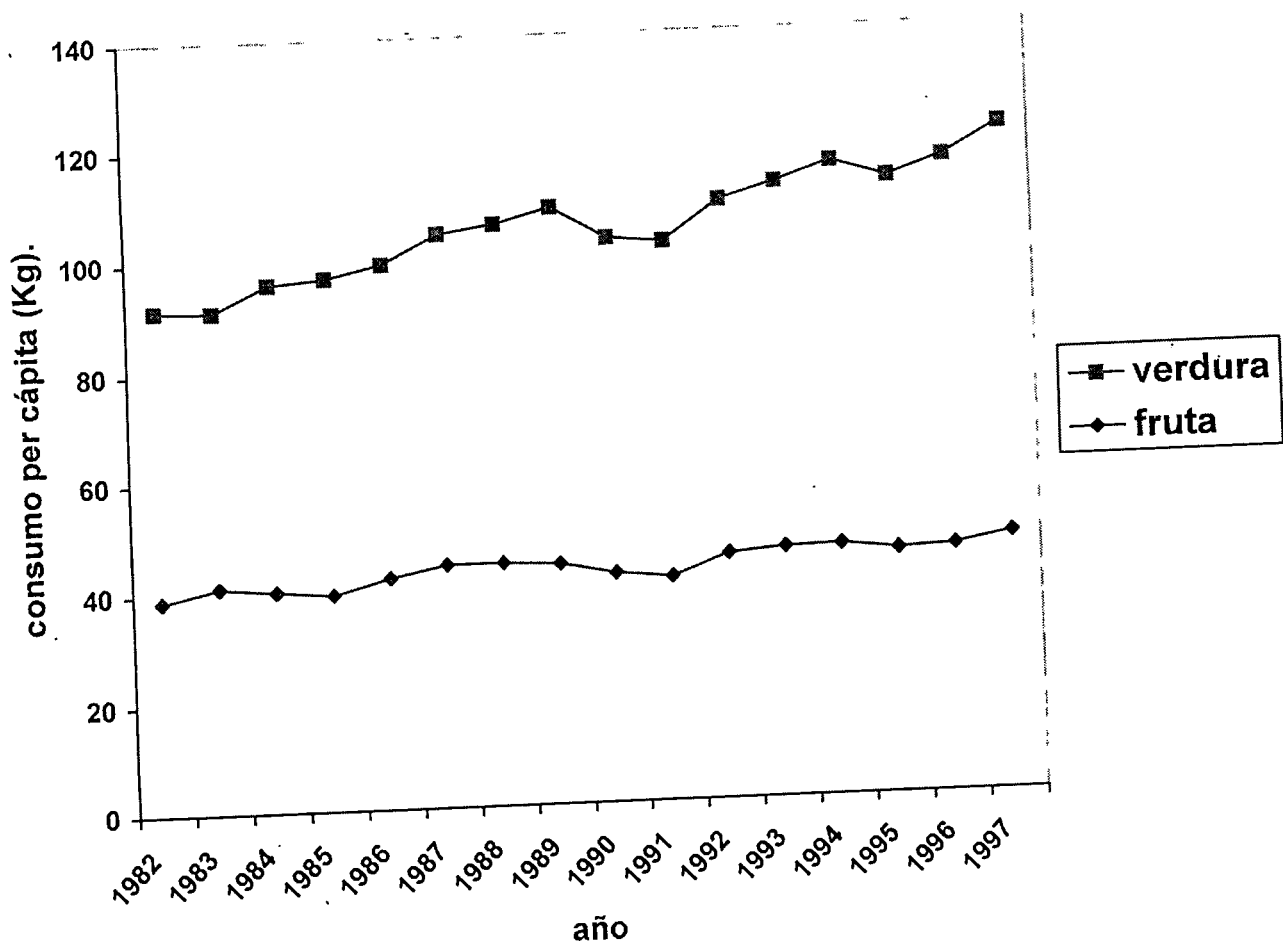
Los alimentos pueden llegar a contaminarse con patógenos microbianos por una amplia variedad de mecanismos. La contaminación puede ocurrir durante la producción, cosecha, procesamiento, o comercialización, así como en la cocina.

II.1.1. Algunos microorganismos patógenos identificados en brotes por consumo de frutas y verduras

Se tiene el conocimiento de brotes por consumo de frutas y verduras, de los cuales en ocasiones se logra identificar el punto de contaminación. La consideración pertinente para determinar dónde y cómo se suscitó la contaminación es conocer el habitat del patógeno y el vehículo más frecuente de transmisión. La shigelosis es usualmente transmitida de persona a persona, pero puede también ocurrir por consumo de agua o alimentos contaminados, incluyendo frutas y verduras. Por ejemplo, dos brotes de shigelosis estuvieron relacionados con el consumo de lechuga contaminada con *S. sonnei*. Se especula que en uno de los brotes, la contaminación ocurrió durante su crecimiento su cultivo o durante el almacenamiento del producto; en el segundo brote por un manejo inadecuado de la lechuga por parte de un trabajador portador, agravando

Gráfica 1

Consumo *per capita* (Kg) de frutas y verduras crudas en los Estados Unidos.



Fuente: IFT, (2001).

el problema debido a su almacenamiento a temperaturas inconvenientes dentro de una bolsa de plástico (Madden, 1992). En EUA, dos brotes fueron ocasionados por el consumo de cebollas crudas contaminadas con *S. flexneri*. Las cebollas fueron rastreadas en California, resultando que procedían de México; se cree que la contaminación ocurrió durante la cosecha o durante el empaque del producto (Beuchat, 1995).

En el caso de *Salmonella*, que es uno de los microorganismos que con más frecuencia ocasiona brotes, los vehículos más frecuentes son el pollo y otros productos cárnicos, así como los huevos y los productos lácteos (Cuadro 4) (Beuchat, 1995, Tietjen y Fung, 1995). Las frutas y verduras crudas están implicadas en menor grado; sin embargo, se han reportado brotes de gran dimensión por el consumo de estos alimentos. Tres brotes multiestatales estuvieron relacionados al consumo de jitomates crudos; uno de ellos por *Salmonella* Javiana en 1992, otro por *S. Montevideo* en 1993 (Wei y col., 1995) y un tercero en el 2000 involucrando a *S. Baildon* (IFT, 2001). Subsecuentes estudios de laboratorio revelaron que el patógeno pudo crecer en jitomates con fisuras o heridas, rodajas o rebanadas de jitomate (pH 4.1-4.5) almacenados a 20° a 30°C. De lo anterior es importante resaltar la característica capacidad de tolerancia a la acidez por parte de este microorganismo que incluso, ha provocado brotes por consumo de jugo de naranja no pasteurizado y sidra (cit. en Fernández, 2000).

Otras fuentes de interés en brotes de salmonelosis han sido el melón y la alfalfa. El consumo de melón ha propiciado dos grandes brotes, ocurridos en 1990 y 1991, con *S. chester* y *S. Poona* como agentes patógenos; se estima que más de 25,000 individuos estuvieron infectados, y dos personas murieron (Wei y col., 1995). Lo que propició el brote fue la conservación de melones (en ensalada), por varias horas a temperatura ambiente (cit. en Fernández, 2000). Y recientemente en Finlandia y EUA, grupos de población enfermaron después de consumir germinado de alfalfa. El serovar *S. Stanley*, fue aislado de los pacientes y del alimento (cit. en Fernández, 2000).

Cuadro 4. Alimentos implicados en brotes de salmonelosis.
Estados Unidos, 1983-1987.

Vehículo de Transmisión.	Casos		Brotos	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Leche	47	0.4	6	3.5
Cerdo	144	1.3	5	2.9
Frutas/verduras	234	2.2	5	2.9
Huevo	412	3.8	9	5.3
Pavo	763	7.1	7	4.1
Carne de res	938	8.8	19	11.2
Pollo	1800	16.8	15	8.8
Otros (incluyendo vehículos múltiples).	6309	58.9	101	59.4
Total	10,707	100	170	100

Fuente: Tietjen y Fung (1995).

No sólo microorganismos de origen intestinal han provocado brotes sino también de origen extraintestinal como *L. monocytogenes* que está ampliamente distribuida sobre frutas y verduras crudos (Beuchat, 1995).

En algunos países se han propuesto normas para la tolerancia de *L. monocytogenes* en verduras crudas. Esta normatividad responde a la severidad del padecimiento que ocasiona el microorganismo y a la elevada letalidad (30%) observada durante los brotes de listeriosis (Kamat y Madhusudanan, 1995).

En Francia, las autoridades han señalado recientemente un límite de 10^2 ufc/ g para las verduras crudas, listas para consumirse (Francis y col., 1999). En Alemania se recomienda que si el microorganismo está presente en número menor a 10^2 ufc/ g no se requieren medidas especiales, pero si es mayor se tomen precauciones. La norma oficial para una ensalada mixta preparada con verduras se presenta en el Cuadro 5 (Francis y col., 1999). La norma en el Reino Unido y Estados Unidos de América es la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de alimento listo para consumirse (Francis y col., 1999).

Alimentos como la lechuga y las ensaladas de col son los vehículos más frecuentes de listeriosis. Algunos brotes estuvieron asociados al consumo de col cruda contaminada con heces de oveja que contenían al patógeno; y al consumo de lechuga, apio y jitomates (Madden, 1992). Un brote ocasionado por *L. monocytogenes* ocurrió en 1981 en las provincias marítimas en Canada., hubo 34 casos de listeriosis perinatal y 7 de enfermedad en adultos. El alimento consistió de una ensalada que contenía col y zanahoria; el serotipo 4b fue aislado tanto de la ensalada como de la sangre de uno de los pacientes. La fuente de contaminación fue el abono ovino; en efecto, dos ovejas del rebaño habían muerto de listeriosis entre 1979 y 1981 (Beuchat, 1995). En ambos brotes las verduras crudas fueron la causa de la enfermedad; de ahí la importancia de someter a las verduras a un eficiente tratamiento de lavado y desinfección. Y una adecuada manipulación post tratamiento evitará la recontaminación permitiendo obtener un alimento inocuo.

Cuadro.5. Norma oficial alemana de la microbiología de ensaladas mixtas preparadas con verduras.

Microorganismo	Límite
Cuenta total	$< 5 \times 10^6$ ufc/g
<i>E. coli</i>	$< 10^2$ ufc/g
<i>Salmonella</i> spp.	ausente en 25 g
<i>L. monocytogenes</i>	$< 10^2$ ufc/g, no se toma ninguna acción
Recomendaciones de vida de anaquel	$>10^2$ ufc/g se investiga 7 días (incluyendo el día que se produjo).
Recomendaciones de la temperatura de refrigeración durante su transporte.	2-7°C

Fuente: Francis y col. (1999).

Otro microorganismo muy persistente es la *E. coli* enterotoxigénica (la causante de la "diarrea del viajero") que cada vez se asocia más al consumo de verduras crudas. En un brote, 78 huéspedes de un casa enfermaron después de consumir ensalada servida como parte de una cena *buffet*. La ensalada contenía varios ingredientes incluyendo cebolla, zanahoria, calabacín, pimientos, brócoli, champiñones, y jitomates (Beuchat, 1995; IFT, 2001). Hay pocos estudios sobre la presencia de este microorganismo en productos crudos; sin embargo, de lechuga y ensaladas mixtas analizadas en Estados Unidos no se aisló al patógeno. Un solo estudio realizado en México revela muy alta tasa de aislamiento (aproximadamente 20%) de este microorganismo en mezcla de verduras, cilantro y apio (IFT, 2001).

Un brote de hepatitis A producido por fresas mexicanas se difundió por varios puntos del oeste de los E.U.A. (Woo y col., 1997).

Estos hechos han puesto en entredicho la seguridad de las frutas y verduras crudas que no son sometidos a ningún proceso para reducir o eliminar los microorganismos patógenos (FDA y USDA, 1998).

II.1.2. Microbiología de frutas y verduras

Los microorganismos contaminan a las frutas y las verduras a través del suelo, agua, manipulación humana y durante su cultivo, cosecha y procesamiento. Algunos de ellos poseen capacidad de enfermar al hombre y a los animales.

En general, la presencia de microorganismos se limita a la superficie externa del fruto, aunque algunos investigadores reportan la presencia de bacterias en el interior de hortalizas (jitomates). Samish y Tulczynska (1963) encontraron que dentro de jitomates sanos existía un gradiente de microorganismos, con mayor número en el tejido conectivo del pedúnculo central bajo la cicatriz de la unión del pedúnculo con el fruto, y disminución hacia el centro y tejido distal periférico. Dichos autores también reportaron bacilos gram negativos móviles (*Pseudomonaceae* y *Enterobacteriaceae*) de los géneros *Pseudomonas*, *Xantomonas* y *Aerobacter* en el interior de verduras crudas íntegras.

Una diversidad de microorganismos han sido aislados de verduras crudas, entre ellos grupos indicadores como son: las bacterias mesófilas aerobias (BMA), *Enterobacteriaceae*, organismos coliformes, hongos y levaduras. Las BMA determinan el grado de contaminación ambiental a que esta expuesto, el efecto de las condiciones de almacenamiento y el grado de deterioro. Las BMA pueden estar en productos crudos desde 10^3 a 10^9 ufc/ g, y en mínimamente procesados desde 10^3 a 10^6 ufc/ g (Zagory, 1999). Por ejemplo, el contenido de BMA en fresas y uvas es aproximadamente de 10^5 a 10^6 ufc/ g. En cambio, los jitomates sólo contienen de 10^1 a 10^3 ufc/ g (Brackett, 1988). Tubérculos y otras verduras que están en contacto directo con la tierra durante su cultivo llegan a mostrar cuentas de hasta 10^7 ufc/ g (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992). Los coliformes totales han sido tradicionalmente utilizados como un indicador de contaminación fecal y /o de calidad sanitaria en varios alimentos, mientras que la familia de las *Enterobacteriaceae* pueden ser utilizadas como grupo indicador de contaminación por tierra (Oblinger y col., 1982). Se le asigna un significado similar al de los coliformes, pero con una cobertura mayor cuando se aplica a los alimentos (Fernández, 2000) , y se sugiere su aplicación en frutas y verduras ya que se puede asociar con el nivel de contaminación por tierra (Senter y col., 1985).

Existen otros grupos microbianos cuya presencia esta limitada por las características de la fruta o verdura. Una característica que funciona como un agente selectivo es el pH. Las frutas generalmente tienen un pH por debajo de 4.5 y son muy afectadas y alteradas por hongos. Las verduras tienen un pH superior de 4.5; consecuentemente, las bacterias que generan podredumbre son mucho más comunes (Will y col., 1989). La alta acidez y contenidos de azúcar de las frutas permite que las levaduras y los hongos predominen en el huésped (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992). Ambos factores y la presencia de sustancias bactericidas propias de la fruta, tienden a destruir algunos bacterias (McUntey y Wilbur, 1971). En cambio, el alto contenido de carbohidratos y la baja acidez de las verduras favorece a las bacterias lácticas (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992). Algunos investigadores como Mundt, Hammer y Sandine (cit. en

Vanderzant y Splittstoesser, 1992) han aislado streptococos y lactobacilos a partir de algunas verduras.

La presencia de microorganismos patógenos está determinada por una diversidad de fuentes y mecanismos de contaminación. Antes, durante y después de su cosecha entra en contacto con tierra, agua de riego, materia fecal humana o animal, estiércol o fertilizantes, maquinaria y equipo, aire y trabajadores. Por ejemplo: *L. monocytogenes* se aisló de tierra de campos de cultivo y tierra que no es de cultivo. Es importante resaltar que una mayor positividad fue de campos que no son para cultivo (cit. en Brackett, 1988). También se ha recuperado de agua residual cruda y tratada (cit. en Brackett, 1988), lo cual implica un riesgo si el agua se utiliza para regar hortalizas.

Senter y col., (1985) analizaron los efectos de las operaciones de empaquetado y manejo sobre la microflora de jitomate crudo. En dos meses del año (julio y noviembre) se encontró que el jitomate crudo obtenido directamente del campo tiene un contenido (mediana) de 3.7 log ufc/ g de *Enterobacteriaceae* en julio y de < 1 log ufc/ g en noviembre. Las operaciones de lavado redujeron 2 logaritmos (julio) y el subsecuente manejo hasta el empaquetado permitió reducir o mantener el contenido hasta < 1 log ufc/ g en ambos meses. Las condiciones de proceso y temperaturas de manejo afectaron la flora microbiana del jitomate dando lugar a un fruto con baja carga microbiana.

II.1.2.1. Deterioro microbiano en frutas y verduras

El deterioro de frutas y verduras por actividad microbiana desde el cultivo, la cosecha hasta el consumo puede ser rápido y variado particularmente en áreas tropicales donde la temperatura y la humedad son altas (Will y col., 1989). El contenido microbiano y la calidad de la fruta se ven afectados significativamente por la contaminación por tierra, agua, insectos, condiciones climáticas, tipo de fruta y estado de madurez (McUntey y Wilbur, 1971; cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

Las bacterias que causan deterioro en verduras predominantemente son bacilos gram negativos aerobios como *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp,

Flavobacterium spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Xanthomonas* spp, etc. (Fernández, 2000). Esta última, por ejemplo, causa ablandamiento de una diversidad de verduras. Miembros de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Clostridium*, son también importantes deterioradores (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

Algunos microorganismos nativos de la fruta llegan a convertirse en parte de la microflora en la línea de procesamiento industrial. Entre ellos se encuentran levaduras acidúricas y hongos. *Geotrichum candidum* ha sido denominado "hongo de la maquinaria", porque puede colonizar en el equipo de procesamiento de frutas (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992). De las bacterias ácido tolerantes, el grupo de bacterias lácticas es el más común; sin embargo, especies de *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Zymomonas*, también puede desarrollar en ambientes ácidos en las líneas de procesamiento de frutas (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992). Este grupo de bacterias llega a causar pérdidas económicas significativas para las empresas, al provocar el deterioro de su producto en un corto tiempo.

Ciertas bacterias, virus e insectos pueden invadir la fruta mientras ésta se desarrolla en la planta. Está bien establecido que la mayor pérdida ocurre durante la poscosecha. Algunas especies de hongos causantes de deterioro, son: *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Phytophthora* (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992), *Sclerotinia* y *Colletotrichum*, éste último es capaz de penetrar la cáscara sana de un fruto. Entre las bacterias destacan *Erwina* y *Pseudomonas* (Will y col., 1989), y entre las levaduras *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, y *Torulasporea* (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

Puede suceder que las relaciones entre el huésped (fruto o verdura) y el patógeno sean razonablemente específicas, por ejemplo: *Penicillium digitatum* afecta solamente cítricos mientras que *P.expansum* a manzanas y peras, pero no a cítricos (Will y col., 1989).

II.1.2.2. Microorganismos patógenos en frutas y verduras

La presencia de microorganismos patógenos para el hombre y para la planta es evidente. Las diversas fuentes de contaminación a las cuales se exponen tanto el fruto como la planta incrementan el riesgo de que el hombre o la planta contraiga una enfermedad.

Microorganismos patógenos en frutas y verduras es un problema frecuente en nuestro país. Algunas de ellas comúnmente utilizadas en la preparación de ensaladas (lechuga, pepino, rábano y otros), llegan a albergar diversos microorganismos, entre ellos: *E.coli*, *Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *Aeromonas* spp, *Yersinia* enterocolítica; algunos virus, amibas y nematodos (cit. en Vanderzant y Splittstoesser, 1992; Zhuang y col., 1995).

La recuperación de *E. coli* de los alimentos, implica que otros microorganismos de origen fecal, incluyendo patógenos, probablemente están presentes. Algunas veces existe correlación entre la abundancia de *E.coli* y la probabilidad de aislar *Salmonella* spp. (Fernández, 1981). Esta última se ha aislado en varios tipos de frutas y verduras crudas (Cuadro 6), entre ellas el jitomate (Jaquette y col., 1996). Ercolani en 1976 (cit. en Wells y Butterfiel, 1999), aisló *Salmonella* spp, del 68% de lechugas y 72% de hinojo, colectados en Italia.

L. monocytogenes ha sido aislada de papas, rábanos, pepinos, col, jitomate, espárragos, brócoli y coliflor almacenados a 4°C y de verduras que se expenden en mercados y supermercados (Cuadro 7). En ensaladas de verduras a base de col, apio, cebolla y lechuga que se adquirieron en supermercados en Inglaterra se aisló en el 67% de las muestras (Beuchat, 1995); y en brócoli crudo que recibía una planta procesadora del producto precocido y congelado en el Estado de Querétaro, se recuperó *Listeria* spp en el 11% de las muestras (Pérez,1998).

Farber y col.(1989) reportaron que de 110 muestras analizadas de diversos vegetales entre ellos lechuga y jitomate, ninguno contenía *Listeria monocytogenes* y solamente en una muestra de las 110 se recuperó *Listeria* spp. Petran y col.(1988) reportan resultados similares de muestras comerciales de vegetales frescos y congelados donde no se encontró *L. monocytogenes*. En cambio, Farber

Cuadro 6. Incidencia de *Salmonella* en frutas y verduras crudas.

Producto	Año	País de origen	Número de muestras analizadas	Positivas(%)
Berenjena/ Pimientos	1976	Inglaterra	60	7 (11.7)
Tomates/ Pimientos	1978-80	Grecia	266	0 (0)
Aceituna	1979	Iraq	19	5 (26.3)
Misceláneos ¹	1981-83	España	849	46 (5.4)
Melón	1990	Importado ²	1440	11 (0.8)
	1990-91	Importado ³	2200	24 (1.1)
Lechuga/Eneldo	1973-75	Italia	209	146 (69.9)
Lechuga/Perejil	1978-80	Grecia	157	3 (1.9)
Tubérculos	1981-83	España	204	10 (4.9)
Lechuga	1985	España	65	5 (7.7)

¹ Berenjena, calabaza, haba, frijol, pepino, pimiento, tomate.

² Importado por USA desde Centroamérica, México y el Caribe.

³ Importado por Canadá desde USA, Centroamérica, México y el Caribe.

Fuente: D'Aoust, (1994).

Cuadro 7. Positividad de algunos patógenos en frutas y verduras que se expenden en mercados y supermercados

Patógeno	Tipo	País	Incidencia + / n	Porcentaje (%)	
<i>L. monocytogenes</i>	Lechuga	US	1/92	1.1	
	Ensalada mixta	Ucrania	4/64	6.3	
	Coliflor	US	0/92	0.0	
	Brócoli	US	0/92	0.0	
	Repollo	US	1/92	1.1	
	Zanahoria	US	1/92	0.0	
	Pepino	US	2/92	2.2	
	Champiñones	US	10/92	11.0	
	Papa	US	21/132	16.0	
	Tomate	Canadá	0/20	0.0	
	Tomate	Pakistán	2/15	13.0	
	Tomate	US	0/92	0.0	
	<i>Campylobacter</i>	Lechuga	Canadá	2/165	1.2
		Perejil	Canadá	1/177	0.6
Cebolla		Canadá	1/180	0.6	
Papa		Canadá	1/153	0.7	
Espinaca		Canadá	2/183	1.1	
Rábano		Canadá	2/174	1.1	
<i>Cryptosporidium</i>		Lechuga	Costa Rica	2/80	2.5
	Cilantro	Costa Rica	4/80	5.0	
	Tomate	Costa Rica	1/80	1.3	
<i>Salmonella</i>	Lechuga	Italia	82/180	68.0	
	Lechuga	España	5/80	6.3	

Fuente: IFT, (2001).

y col. (1989) reportaron que en muestras empacadas de ensaladas de vegetales sólo resultaron positivas a *L. monocytogenes* 4 de las 60 muestras y Steinbreugge y col., (1988) reportaron 9% de positividad en lechugas almacenadas. Tanto Farber (1989) como Steinbreugge (1988) reportan que *L. monocytogenes* fue capaz de desarrollar en los vegetales a 4°. Es importante mencionar que las lechugas fueron analizadas durante los meses fríos del año.

La gran ubicuidad de *L. monocytogenes* le permite encontrarse en verduras crudas y mínimamente procesadas (Cuadro 8), con gran dispersión en cuanto a los valores de incidencia registrados.

Así como es preocupante la presencia de un microorganismo patógeno para el hombre en un alimento, para una planta genera una situación que debe ser controlada.

El proceso de infección, particularmente en poscosecha, se debe en gran parte a las lesiones mecánicas producidas en la cáscara y las lesiones por insectos al fruto. Algunas bacterias pueden tener acceso al fruto huésped a través de aberturas naturales, lenticelas y grietas. Un ejemplo sobre el mecanismo de infección, es la penetración de esporas de *Phlyctaena vagabunda* a través de las lenticelas en la manzana previo a la cosecha. El daño se manifiesta por sí mismo como pudrición durante el almacenamiento (Will y col., 1989).

II.1.3. Sobrevivencia y multiplicación de microorganismos patógenos en frutas y verduras

La sobrevivencia y/o crecimiento de patógenos sobre frutas y verduras está influenciado por el organismo, el alimento, las condiciones ambientales en el campo, las de almacenamiento. En general, los patógenos sobreviven pero no crecen sobre la superficie externa de frutas y verduras crudas, debido en parte a las barreras protectoras naturales de la planta.

En el campo, el ambiente físico de la superficie de cultivo es considerado desfavorable para el crecimiento y sobrevivencia de la bacteria (Dickinson, 1986; IFT, 2001) (por ejemplo, pobre de nutrientes y humedad, fluctuaciones de temperatura y humedad, y luz ultravioleta).

Cuadro 8. *Listeria monocytogenes* en verduras crudas y mínimamente procesadas listas para consumirse (diferentes países).

Verduras	Número	% de muestras positivas	País
Verduras intactas			
Habichuelas	6/7	85%	Malasia
Col	6/18	33%	Sri. Lanka
Pepinos	2/92	2.2%	Unión Soviética
	1/15	6.7%	Pakistán
Lechuga	10/20	50%	Sri. Lanka
Papas	28/132	21.2%	E.U.A.
	19/70	27.1%	E.U.A.
Rábanos	19/32	14.4%	E.U.A.
Jitomates	2/15	13.3%	Pakistán
Verduras mínimamente procesadas y listas para consumirse.			
Pepinos cortados	4/5	80%	Malasia
Ensalada de col	4/92	2.2%	Canadá
	5/50	4%	Singapur
Preparado de verduras mixto	8/42	19%	Inglaterra
Verduras crudas y cortadas	11/25	44%	Holanda
Ensalada de verduras.	4/16	25%	Irlanda del norte

Fuente: Manzano y col. (1997).

Después de la cosecha los patógenos pueden sobrevivir pero no crecer sobre la superficie de frutas y verduras crudas, especialmente si la humedad no es elevada. En algunos casos, la concentración de patógeno disminuye sobre la superficie externa. La tasa de disminución depende del tipo de producto, humedad, y temperatura así como la atmósfera y el tipo de empaque usado. El crecimiento sobre las superficies intactas no es común porque los patógenos transmitidos por alimentos no producen las enzimas necesarias para penetrar la cáscara. Existen excepciones como es el crecimiento de *E.coli* O157:H7 sobre la superficie de melón (IFT, 2001).

Es bien sabido que patógenos como *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*, son capaces de crecer en jitomate (Beuchat, 1995).

La infiltración de agua de lavado dentro de frutas intactas ha sido demostrado con varias frutas y verduras, lo que permitió explicar un brote de salmonelosis asociado con jitomates crudos del comercio (IFT, 2001). Se ha observado que la infiltración ocurre a través de los espacios intercelulares al crearse una diferencia de presiones debido a que la temperatura del fruto era más elevada que la del agua (Bartz, 1999; IFT, 2001).

II.2. Jitomate

El jitomate (*Solanum lycopersicum* o *Lycopersicum esculentum*), pertenece a la familia *Solanaceae*. Es una planta herbácea, semileñosa, de flores amarillas agrupadas en racimos.

Su fruto es una baya que puede mostrar diversas formas (alargada, esférica), de superficie lisa y brillante, y con numerosas semillas aplanadas al interior de dos cavidades (INEGI, 1997).

II.3 Agroindustria del jitomate en México

II.3.1 Situación nacional y mundial

El jitomate es uno de los cultivos que presenta mayor productividad en hidroponía. En una hectárea se pueden cosechar de 200 a 700 toneladas, a diferencia de la agricultura tradicional, con la que se obtienen alrededor de 30 toneladas/hectárea (Asociación Hidropónica Mexicana, 1999). En 1998, 89.8 millones de toneladas de jitomate se cosecharon en el mundo, de los cuales aproximadamente 11.6 millones de toneladas fueron cultivadas en invernaderos hidropónicos (Dorais y col., 2001).

El cultivo de jitomate en 1997 generó en nuestro país divisas por 592 millones de dólares representando el 34% del total de las divisas captadas por exportación de hortalizas. Como parámetro de comparación, el café en ese mismo año captó divisas por 827 millones de dólares en su exportación, siendo el producto hortícola número uno a nivel nacional, seguido del jitomate (Yáñez, 2000).

El cultivo en invernadero al terminar el año de 1998, se estimó por los constructores de diversas empresas en un crecimiento en Canadá del 8%. En Estados Unidos se han sumado 123 hectáreas más, que representan algo así como un tremendo incremento del 16%, mientras que en México, el crecimiento fue aproximadamente de 88 hectáreas de invernaderos, es decir un incremento del 34% (Bringas, 1999b).

Actualmente España se ubica en el primer lugar de la lista de exportadores de hortalizas y México ocupa el sexto sitio. Embarca más de dos millones de toneladas a los mercados internacionales, lo que comprende el 4% del mercado internacional mundial de hortalizas (Ennis, 1999).

Los principales productos exportados por México a Estados Unidos y Canadá de 1996-1999 se enlistan en el cuadro 9 (Bringas, 1999a), siendo el jitomate el fruto de mayor exportación. En la Tabla 1 se enlistan los principales países productores de jitomate en el período 1996-2000 (FAO, 2000).

Cuadro 9. Principales productos hortícolas crudos exportados de México a EUA, Canadá y países europeos, 1996-1999.

EUA	Canadá	Alemania, Francia y Gran Bretaña.
Jitomates	Jitomates	Espárrago
Pimientos	Pimientos	Melón
Chiles	Melón	Cebollas
Pepinos	Sandía	Ajos
Cebolla	Uvas	Mangos
Calabacita	Fresas	Aguacate
Sandía	Cebollas	
Melón	Espárrago	
Espárrago	Berenjena	
Berenjena	Ajos	
Ajos		
Apio		
Brócoli		
Elote.		

Fuente: Modificado por Bringas, (1999a).

Tabla 1. Principales países productores de jitomate (1996-2000).

País	1996	1997	1998	1999	2000
China	15.5*	16.3	17.1	17.9	19.2
USA	11.8	10.5	10.0	13.2	13.2
Turquía	7.8	6.6	6.6	6.6	6.6
Italia	6.5	5.6	6	1.2	7
Egipto	6	5.8	5.7	6.2	6.3
India	5.3	5.3	5.4	5.4	5.4
España	3.3	3.4	3.5	3.9	3.7
Irán	2.9	2.5	3.2	3.5	3.7
Brasil	2.6	2.7	2.8	3.2	3.0
México	2.4	2.3	2.2	2.4	2.4
Grecia	2.0	2.0	2.0	2.1	2.0
Federación de Rusia	1.6	1.6	1.7	1.7	2.0
Chile	1.4	1.1	1.2	1.2	1.3
Portugal	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1
Marruecos			1.2		1.0
Ucrania			1.2	1.2	
Uzbekistán				1.0	1.1
Mundial	29.1	87.7	92.3	99.7	100.8

Fuente: FAO, (2000)-

*Cifras en millones de toneladas métricas.

A principios de la década de los 90's el jitomate mexicano representó el 13% de las compras de jitomate de invierno que efectuaron los consumidores en Estados Unidos. En la actualidad, la mitad del volumen del jitomate de invierno consumido por ese país proviene de México (Ennis, 1999).

En los últimos cinco años, además del jitomate, otros productos como la cebolla, los chiles, los pimientos, los pepinos, la calabaza, la uva, la sandía, el melón, el mango y el aguacate, se han colocado entre los 10 primeros lugares de las exportaciones mundiales (Bringas, 1999a; Gatzionis, 2000). Sin embargo, la exportación de frutas y verduras requiere de un sistema de normalización de la calidad (Gatzionis, 2000), pues pueden provocar daños a la salud de consumidor por la presencia de microorganismos patógenos.

Los horticultores del sector social de nuestro país generalmente carecen de la infraestructura necesaria para poder cumplir con las normas que se imponen, y permitir así la comercialización del jitomate tanto para mercado nacional como de exportación (López, 2000).

El 92% de las exportaciones de hortalizas en México tienen como destino los Estados Unidos, destacando también los mercados de Canadá, Francia y Japón (Cuadro 10).

La exportación de frutas y verduras requiere de un sistema de normalización y estandarización de calidad, que determine un estándar mínimo que permita incursionar en los mercados internacionales. Por ello, son necesarias normas de calidad, de inocuidad, de residuos tóxicos, de marca, de envase, de transporte, de almacenamiento y de comercialización. Si se cubren estas expectativas basadas en normas oficiales mexicanas obligatorias, se estarían generando productos de clase mundial, capaces de ser aceptados sin restricción alguna en cualquier país al que se exporten (Gatzionis, 2000).

Cuadro 10. Porcentaje de exportación de hortalizas de México a diversos países.

País	% de exportación
E.U.	92.0
Canadá	5.8
Francia	1.2
Japón	0.5
Otros mercados	0.5

Fuente: Yáñez, (2000).

II.3.2 Comercialización

El comportamiento del mercado de las frutas y verduras en México está directamente vinculado con la estacionalidad de los cultivos, y se divide en dos ciclos: primavera-verano y otoño-invierno. En el primer ciclo las frutas y verduras presentan sus mayores variaciones de producción y en el segundo es en donde México realiza la mayor parte de las operaciones de exportación.

En la última década la producción de frutas y verduras en invernadero ha aumentado. Dado que los jitomates de invernadero suelen alcanzar elevadas cotizaciones en los mercados, se requiere un severo control en la selección, no solamente de frutos defectuosos y dañados, sino también de la uniformidad en el tamaño y color (Serrano, 1978; Yáñez, 2000).

Los aspectos comerciales presentan cada vez mayor complejidad. Los retos más relevantes se encuentran en el manejo en poscosecha de los cultivos, en los aspectos sanitarios y de inocuidad, en mercados más competitivos (solamente en la temporada 1999-2000 concurrieron 12 países al mercado de tomate de invernadero de los Estados Unidos), y la consolidación de los compradores (Steta, 2000).

Ante los problemas de comercialización del jitomate, de las 300 mil cajas que salen a diario al extranjero, el 23%- (70 mil cajas)- es el volumen que se desecha, debido a la sobreoferta (López, 2000).

II.4 Cultivo hidropónico

El diccionario define a la agricultura como el " arte de cultivar la tierra". La tierra o el suelo, sirven de soporte para que las plantas se anclen y constituyan un magnífico almacén de agua, oxígeno y sales minerales en donde se completará su ciclo biológico. Como tal almacén, el suelo es generoso en sus aportes pero muy complejo en cuanto a los mecanismos de retención y de liberación de sus contenidos (Gázquez, 2000).

El hombre, en su afán de controlar los procesos de nutrición de las plantas y con el objeto de aproximarse al potencial productivo de las mismas, ha ido

buscando alternativas de medio de cultivo hacia sustratos que interaccionen menos en los procesos de aporte-absorción (Gázquez, 2000; Morgan, 2000).

No obstante, hay que recordar que la capacidad productiva de la planta está en función de factores: genéticos, climáticos y/o medioambientales, de disponibilidad de agua, tecnológicos y culturales.

La hidroponía es un sistema de cultivo para las plantas sin necesidad de que sean puestas en el suelo; siendo precisamente este su fundamento: sustituir a la tierra.

Se les llama cultivos hidropónicos o sin tierra pues las plantas se desarrollan en un medio totalmente artificial, donde los nutrientes necesarios para su crecimiento se suministran por medio de una solución de agua y sales minerales (Hernández, 1981).

Las técnicas de cultivo sin suelo o hidropónicas intentan incrementar la eficiencia de los sistemas de producción en base a tres ventajas fundamentales (Gázquez, 2000):

- Óptima relación aire/agua.
- Disminución radical de enfermedades y plagas.
- Control perfecto de la nutrición.

Existe una clasificación para este sistema que está basada en características específicas de donde se distinguen dos modalidades (Hernández, 1981; Morgan, 2000), la primera es el medio exclusivamente líquido, siendo en este caso una solución nutritiva, en la cuál las plantas tienen inmerso el sistema radicular. La segunda es el medio sólido, donde el cultivo se desarrolla sobre un sustrato sólido pero inerte y poroso para que se haga circular la solución y pueda nutrirse la planta sin problemas. Algunos de los sustratos utilizables son: la arena, vermiculita, agrolita, turba volcánica y la grava.

Recientemente los trabajos sobre hidroponía se han enfocado a dos aspectos principales (cit. por Hernández, 1981):

- la búsqueda de sistemas hidropónicos más económicos y fáciles de manejar.

-estudios que incluyen aspectos de nutrición vegetal.

Ventajas y desventajas de la hidroponía (cit. por Hernández, 1981; Asociación Hidropónica Mexicana, 1999):

comparado con el sistema de cultivo tradicional, la hidroponía está considerada como un sistema de producción agrícola con gran número de ventajas:

- Suministro óptimo de aire, nutrientes y agua.
- Mayor control fitosanitario.
- Reducción del consumo de agua, pues las pérdidas por evaporación son limitadas.
- Permite el monocultivo (cultivo repetitivo de la misma especie).
- Posibilidad de cultivar en cualquier tipo de terreno, lo que no sería posible realizar por cultivo tradicional.
- Obtención de cosechas extraestacionales.
- Reducción de gastos en lo laboral.
- Obtención de productos de mejor calidad.
- No depende de fenómenos meteorológicos.
- Requiere mucho menor espacio y capital para una mayor producción.
- Mayor limpieza e higiene en el manejo del cultivo desde la siembra hasta la cosecha.
- Uniformidad en los cultivos
- No se fertiliza con materia orgánica
- Se utilizan nutrientes naturales y limpios
- El equipo de producción es de alta tecnología
- La temperatura, nutrientes, ventilación, luz y humedad relativa son controlados por los productores.
- Mayor control de la contaminación por patógenos.

Entre las desventajas destacan:

- la inversión inicial a nivel comercial se considera elevada, pues se requieren instalaciones y maquinaria especial.

Los cultivos hidropónicos se encuentran menos expuestos a la contaminación (ingreso de animales superiores, corrientes de aire, uso de aguas negras, entre otras), a diferencia de cultivos en el campo en donde operan diversas fuentes de contaminación (Riser y col., 1985).

Algunas frutas y verduras que crecen en el campo tienen un ambiente adecuado para el desarrollo de muchos tipos de bacterias (Riser y col., 1984). En 1978, Maxey (Riser y col., 1985) inoculó *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *S. Typhimurium* en lechuga y observó que su número incrementó ligeramente durante 6 h, sugiriendo que el microambiente exterior de la lechuga podría ser favorable para estos microorganismos.

Estudios realizados sobre la microbiología de la lechuga que crece bajo sistema hidropónico, indican que bacterias patógenas humanas no se encuentran en estos productos (Riser y col., 1985).

La calidad microbiológica de productos de campo no es regulada por agencias como la FDA y la USDA en EE.UU. (Riser y col., 1984), o por SSA en México, que son las encargadas de establecer estándares microbianos para productos agrícolas. Probablemente la calidad microbiana de productos hidropónicos tampoco es controlada por estas agencias. Al no haber información en la literatura acerca de esta tecnología, se desconoce el riesgo que implica el consumo de productos así cultivados.

Puede no resultar fácil mantener un invernadero hidropónico libre de microorganismos como *E.coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, etc, debido a la facilidad con la que pueden ser vehiculizados por humanos, insectos, reptiles y aves. Por tal razón, se deben implementar medidas de saneamiento periódicas.

La capacitación constante a los trabajadores en las buenas prácticas de higiene es esencial debido al estrecho manejo del producto, así como a la maquinaria utilizada para la cosecha y transporte. Por ello, la importancia de proporcionar el equipo necesario que evite el ingreso de materiales que sirvan de vehículo de patógenos (uniforme, guantes, zapatos, etc.).

II.4.1 Desarrollo, maduración y cosecha de jitomate hidropónico

El cultivo hidropónico de jitomate permite a los agricultores obtener una mayor producción y mejor calidad del fruto de lo que se obtendría en el cultivo tradicional. La calidad del jitomate está influenciada por el cultivar (variedad), las condiciones ambientales (intensidad de la luz, humedad relativa, temperatura, y concentración de CO₂) y las prácticas de cultivo (sistema utilizado, densidad de las plantas, sistema de irrigación, composición y concentración de nutrientes en la solución nutritiva, tiempo de cosecha y condiciones de almacenamiento). Lo anterior se refleja en su apariencia (color, tamaño, firmeza, jugosidad y textura), sus cualidades organolépticas (sabor, atribuido a los aromas volátiles, azúcares y contenido de ácidos) y propiedades nutritivas (contenido de minerales, vitaminas, carotenoides, etc.) (Dorais y col., 2001).

El sistema hidropónico incrementa la firmeza del fruto, la concentración de vitamina C, azúcares, ácidos, fosfatos, potasio, calcio y magnesio en el jitomate (Dorais y col., 2001).

III. Objetivos

III. 1. Objetivo General

Delinear el perfil de contaminación microbiana de interés sanitario dentro de una planta productora de jitomate hidropónico e identificar reservorios y fuentes potenciales de contaminación.

III. 2. Objetivos específicos.

Objetivo 1. Describir una planta productora de jitomate hidropónico y elaborar el diagrama de flujo.

Objetivo 2 Seleccionar los materiales y productos cuyo estudio microbiológico permita detectar reservorios y fuentes de contaminación al fruto.

Objetivo 3 Aislar, identificar y en su caso efectuar el recuento de microorganismos de interés sanitario en los materiales y producto.

Objetivo 4 Computar los resultados y elaborar un perfil de contaminación de los invernaderos y factores que determinan la calidad microbiológica del jitomate.

Objetivo 5 Comparar la microbiología del jitomate hidropónico con la del jitomate obtenido del comercio.

IV. Materiales

Equipo y materiales

Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge
Balanza analítica, sensibilidad 0.0001g, Ainswoth, Modelo 100A
Balanza granataria, sensibilidad 0.1g, OHAUS, Modelo No. CT200-S
Baño María de precisión de 43 ± 0.2 °C , Modelo 251.
Baño María de precisión de 44.5 ± 0.2 °C Modelo 251.
Campana de flujo laminar, Alder y Veco
Centrífuga de mesa, Sol-Bat J300
Cuenta colonias, Québec Reichert-Jung
Microbiological Air Sampler for 90mm standard (petridishes MAS-100 Merck).
Homogenizador Stomacher, Seward 400
Horno para esterilización, Shel-lab.
Incubadora de 30° y 35°, Felisa.
Incubadora refrigeradora 6-70° (22°), Precision Scientific
Lámpara de luz U.V. Blak-Ray, Modelo 56.
Microscopio luminoso
Potenciómetro, Accumet, Modelo 10
Vortex, Fisher Scientific Ind.
Membranas de filtración Millipore de poro 0.45 μ de 13 y 17 mm.
Micropipetas 5-1000 μ L, Labsystems
Espátulas de madera.
Unidades de filtración Millipore
Material de uso común en el laboratorio de microbiología
Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial

Medios de cultivo (Vanderzant y Splittstoesser, 1992)

Agar cuenta estándar (ACE), Bioxon
Agar papa dextrosa (APD), Bioxon
Agar rojo violeta bilis (ARVB), Bioxon
Agar rojo violeta bilis con 1% glucosa (ARVBG), Bioxon
Agar verde brillante (AVB), Bioxon
Agar sulfito bismuto (ASB), Bioxon
Agar xilosa-lisina-desoxicolato de sodio (XLD), Bioxon
Agar salmonella-shigella (SS), Bioxon
Agar cloruro de litio-feniletanol-moxalactamo (LPM), Oxoid
Agar oxford modificado (MOX), Oxoid
Agar soya tripticasa con extracto de levadura (AST-EL), Bioxon
Agar eosina azul de metileno (EMB), Bioxon
Agar hierro-lisina (LIA), Bioxon
Agar hierro y triple azúcar (TSI), Bioxon
Agar de hierro de Kligler (KIA), Bioxon
Medio de SIM (sulfhídrico, indol y movilidad), Bioxon
Medio MIO, Bioxon
Medio citrato de Simón, Bioxon
Caldo de preenriquecimiento de la Universidad de Vermont (UVM), Oxoid
Caldo de enriquecimiento para Listeria (LEB), Oxoid
Caldo de enriquecimiento secundario Fraser (CF), Oxoid
Caldo lauril fluorocult (CLF), Bioxon
Caldo lactosado (CL), Bioxon
Caldo soya tripticasa con extracto de levadura (0.6%) (CST-EL), Bioxon
Caldo selenito cistina (CSC), Bioxon
Caldo tetrionato (CTT), Bioxon
Caldo soya tripticasa (CST), Bioxon
Caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB), Bioxon
Caldo EC (EC), Oxoid

Caldo rojo fenol, Bioxon

Caldo urea, Bioxon

Caldo rojo de metilo y Voges Proskauer (RM-VP), Bioxon

Soluciones

Diluyente de peptona (0.1%)(DP), Bioxon

Solución salina isotónica (0.85%), Productos Químicos Monterrey

Sol. ampicilina (1%)

Reactivos y colorantes

Gram (cristal violeta, safranina, lugol, alcohol etílico 95%), Sigma

Creatinina, Sigma

Rojo de metilo, Sigma

Manitol, Sigma

Ramnosa, Sigma

Xilosa, Sigma

α -naftol 5% (sol. alcohólica), Sigma

Hidróxido de potasio (KOH) 40% (sol. acuosa), J.T.Baker

Kovac.

Sol. rosa de bengala (0.6%), Sigma

Buffer de fosfatos, Productos Químicos Monterrey

Sol. formaldehído (0.3%), Productos Químicos Monterrey

Peróxido de hidrógeno

Antisuero polivalente A-1 para *Salmonella* (INDRE)

Antisuero monovalente para *L. monocytogenes* serotipo O:1 y O:4, Difco

Kit para hibridación de DNA Gene-Trak para *Listeria* spp.

V. Metodología:

Objetivo 1. (Describir una planta productora de jitomate hidropónico y elaborar el diagrama de flujo).

La investigación se realizó en la empresa Agros S.A. de C.V., productora de jitomate hidropónico situada en el Municipio de Bernal, Colón , Querétaro. El estudio se extendió a lo largo de 2 ciclos de producción.

V.1.1 Descripción y elaboración del diagrama de flujo del proceso. (Diagrama 1).

La empresa cuenta con invernaderos cubiertos, protegidos con paredes de plástico, mosquitero y techos de vidrio. Están dotados de 3 tipos de tuberías, unas transportan la solución hidropónica, por otras circula agua caliente que permite controlar la temperatura interior y unas terceras son drenajes. Están dotados de cortinas situadas en el techo que regulan la entrada de luz. El suelo se encuentra cubierto con plástico. Mediante un sistema computarizado se mantiene bajo control la humedad relativa y la temperatura.

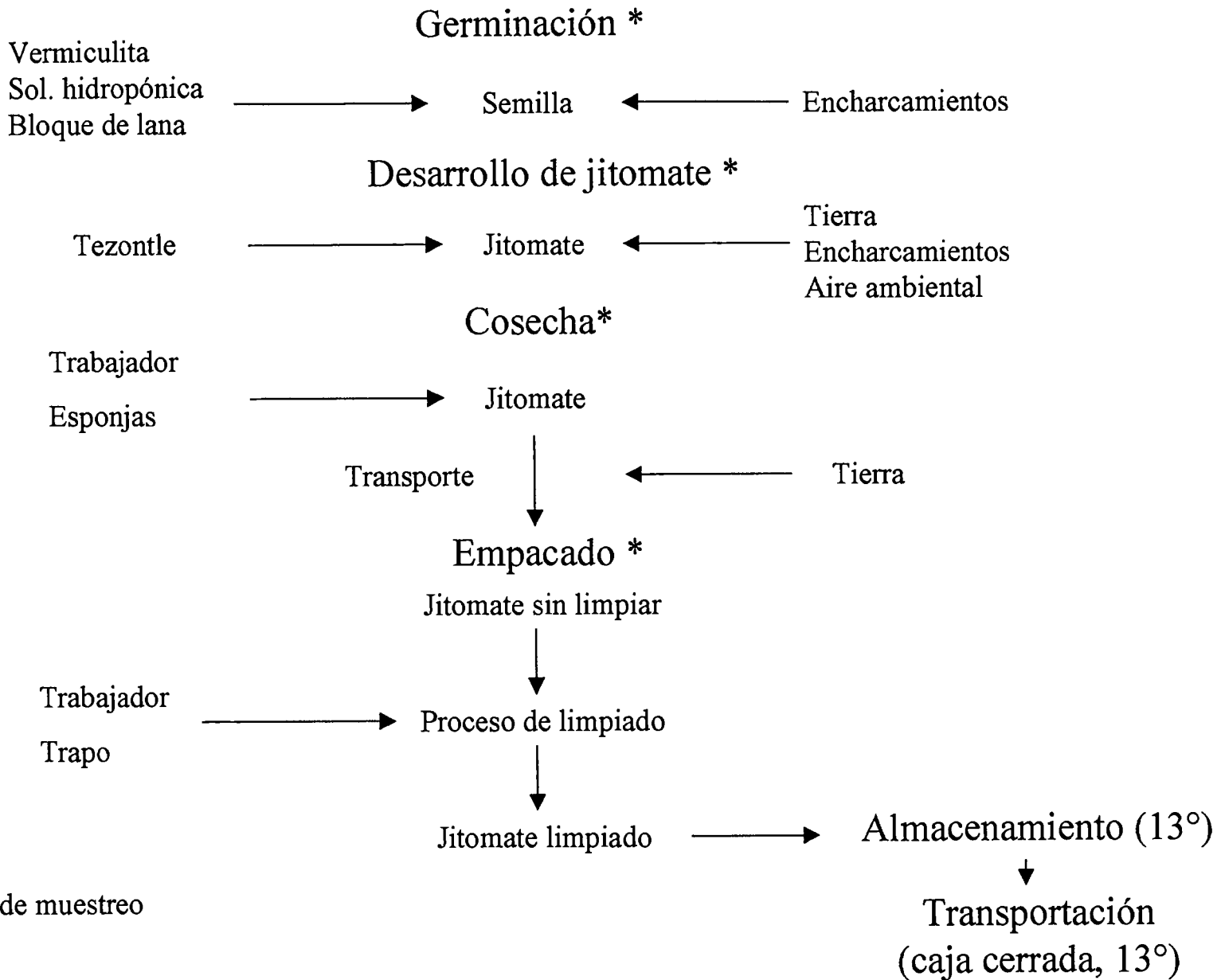
El ciclo de producción se divide en cinco etapas: la germinación de semilla, desarrollo de jitomate, cosecha, empaclado y almacenamiento.

En un invernadero exclusivo las semillas importadas de Holanda se hacen germinar en vermiculita (material poroso inerte parecido a la arena), humedecida con solución hidropónica. La plántula generada debe alcanzar 10 cm de altura aproximadamente para ser trasplantada al bloque de lana de roca. Este último material es poroso y esponjoso, y en él la planta pasará toda su vida productiva. La solución hidropónica se suministra automáticamente a la planta de acuerdo con un programa computarizado. Los bloques de lana con las plántulas se colocan sobre la superficie de plástico que cubre el suelo y dentro de un recipiente que contiene tezontle (piedra porosa) el cual sirve de soporte a la planta.

Cuando la plántula ha crecido entre 15 y 20 cm, se transporta a los invernaderos para iniciar el crecimiento de la planta y desarrollo del jitomate.

Diagrama 1

Producción de jitomate hidropónico



La planta crece verticalmente, de manera que permite un mayor número de plantas en un mínimo espacio de terreno (Foto 1).

La polinización se realiza mediante abejorros seleccionados, importados de Holanda, que se albergan dentro de los propios invernaderos.

Cuando los frutos maduran, los trabajadores colectan los jitomates directamente con la mano desnuda. Se puede advertir una estrecha vigilancia del lavado de manos para lo cual cuentan con instalaciones adecuadas.

Los jitomates cosechados se colocan en cajas de plástico que contienen un material poroso y esponjoso (que en lo sucesivo se denominará “esponja”) y que evita el daño mecánico de los jitomates durante el transporte al área de empaclado. Esta área es un edificio central independiente de los invernaderos. Durante el transporte, los jitomates se protegen con una lona de la contaminación del ambiente. Son recibidos y sometidos a un proceso de limpieza con un trapo humedecido con sol. de cloro (100 ppm), cuyo objetivo central es proporcionarle brillo y mejor presentación. El manejo del jitomate se realiza con las manos limpias y desnudas. Finalmente se les coloca en cajas de cartón y se almacenan en un cuarto frío (13°), para su embarque en camiones con cámara frigorífica.



FOTO 1.

V.1.2 Selección de los puntos de muestreo y recolección de muestras

A) Puntos de muestreo (Diagrama 1)

En la selección de los puntos de muestreo se consideraron las siguientes variables:

Tipo de invernadero según ventilación

superior

lateral

Localización del jitomate dentro del invernadero.

periferia

cruceros

centro de las parcelas

altura del jitomate con respecto al suelo (40 cm y 1.5 mt).

Posibles reservorios de microorganismos.

tierra de los pasillos y agua de encharcamientos, dentro del invernadero.

tierra exterior de la periferia de los invernaderos

Trabajadores

Materiales diversos

trapo

esponjas

Época del año.

calurosa (Febrero- Mayo).

fría (Noviembre- Enero).

B) Recolección de muestras

El muestreo se llevó a cabo a lo largo de dos ciclos completos de producción. La planeación del muestreo se basó en el programa vigente de producción; se incluyen los procesos de saneamiento y desinfección de invernaderos.

Las muestras de jitomate se colectaron en dos épocas : calurosa (Febrero a Mayo) y fría (Noviembre a Enero); las muestras de las manos de los trabajadores, tierra, agua de encharcamiento y esponjas se colectaron a lo largo de los dos ciclos de producción.

Se realizó el muestreo de la superficie de las suelas de zapatos y del polvo del suelo de los pasillos con torundas. De las esponjas se cortaron porciones con tijeras estériles. Los jitomates se colectaron de dos lugares en bolsas de rollo: de los invernaderos (directamente de la planta) y del área de empackado (de cajas de plástico y de cartón).

Las muestras se colectaron en bolsas de plástico y se transportaron al laboratorio; el análisis se inició 2-3 h después de su recolección.

En el caso de jitomate, se colectaron muestras compuestas de 6 jitomates; para otras muestras, la cantidad fue variada según el tipo de material.

Específicamente, las muestras colectadas según etapa incluyen:

1. Invernadero destinado a la germinación de las semillas:

- vermiculita
- bloque de lana de roca
- solución hidropónica
- agua de encharcamientos

2. Invernadero para el desarrollo de la planta

- Interior del invernadero
 - tezontle
 - solución hidropónica
 - manos de trabajadores

jitomate

nivel bajo : 30 cm

nivel alto: 1.5 mt

agua de encharcamientos

polvo del suelo de los pasillos

tierra del piso

aire

suelas de zapatos de trabajadores

3. Exterior del invernadero

tierra

laterales de invernaderos

campos de cultivo cercanos

agua de pozo

aire

4. Área de empacado

jitomate

sin limpiar

limpiado

trapo

recién lavado-desinfectado-secado

lavado-almacenado

sucio

manos de trabajadores

El jitomate cosechado se colectó en cajas de plástico que contienen una esponja. Éstas son reutilizadas varias veces durante el día, y al término, son lavadas y desinfectadas.

5. Área de lavado de esponjas

esponja

nueva

lavada-desinfectada

sucia

aire

Objetivo 2 (Seleccionar los materiales y productos cuyo estudio microbiológico permita detectar reservorios y fuentes de contaminación al fruto).

La cuantificación de los microorganismos indicadores se realizó siguiendo las técnicas tradicionales (Vanderzant y Splittstoesser, 1992) (Diagrama 2 y 3). A partir de la misma muestra preparada se efectuó el recuento de los diversos grupos indicadores y de los microorganismos patógenos (Diagrama 4, 5, y 6).

V.2.1. Preparación de las muestras.

Procedimiento.

1. En una bolsa de polietileno con caldo lactosado (CL) se colocó según el caso:

- 6 jitomates con 100 ml de CL.
- 3 porciones de 100 cm² de una esponja con 90 ml de CL.
- una torunda (muestreo de las 2 manos del trabajador) con 30 ml de CL.
- 10 g de tierra con 90 ml de CL.
- un trapo con 100 ml de CL.
- 10 ml de solución hidropónica con 90 ml de CL.

2. La remoción de los microorganismos se realizó según el tipo de muestra. Cada jitomate se frotó manualmente durante 1 minuto, de la misma forma se trató a las esponjas y trapos. El resto de las muestras (torunda, líquidos, tierra) se homogenizaron en Stomacher a velocidad media por 30 seg. La suspensión se utilizó para el recuento de los grupos indicadores y la investigación de *Salmonella*.

V.2.2 Grupos indicadores

A) Bacterias mesófilas aerobias (Peeler y Maturin, 1992) (Diagrama 2).

Recuento por la técnica de vaciado en placa utilizando ACE e incubando a 22°/48h.

B) *Enterobacteriaceae* (Oblinger y col., 1982) (Diagrama 2).

Recuento por la técnica de vaciado en placa con bicapa, utilizando ARVB con 1% de glucosa e incubando 35°/ 24 h.

C) Organismos coliformes

1. Coliformes totales (Hitchins y col., 1992) (Diagrama 2).

Recuento por técnica de vaciado en placa con bicapa, utilizando ARVB e incubando 35°/ 24 h.

Para las muestras de agua de pozo se siguió la técnica de número más probable (NMP) (Greenberg y col., 1992). Mediante un preenriquecimiento en tubos con CL (a doble concentración) se inocularon 100 ml de agua distribuidos en 10 tubos con 10 ml, seguido de confirmación en CLBVB (35°/24-48 h).

2. Coliformes Fecales (Hitchins y col., 1992).

Se aplicó únicamente en muestras de agua de pozo. Con la técnica de NMP se preenriqueció en CL (doble concentración), seguido de enriquecimiento y confirmación en EC (44.5°± 0.2°C/ 24-48 h).

D) Hongos y levaduras (Mislivec y col., 1992) (Diagrama 2).

Recuento por técnica de vaciado en placa utilizando APD e incubando a 22°/ 3-5 días. A 100 ml de agar temperado a 45° se adicionó 1 ml de solución de ampicilina al 2% y 0.5 ml de rosa de bengala al 0.6% con el propósito de inhibir el desarrollo bacteriano y la extensión del micelio de los hongos respectivamente.

E) *Escherichia coli* (Hitchins y col., 1995a) (Diagrama 3).

El recuento se realizó por la técnica de NMP mediante la prueba de fluorescencia con el ácido 4-metilumbeliferil β -D-glucuronido (MUG). Esta técnica múltiple permite aplicar tres pruebas características del metabolismo de *E.coli* a 44.5° ± 0.2°: fermentación de la lactosa con producción de gas, producción de indol y actividad de la enzima β -glucuronidasa sobre el sustrato MUG presente en el caldo lauril fluorocult (CLF). Cuando el MUG no fluorescente es hidrolizado por la

enzima β -glucuronidasa se genera 4-metilumbeliferona, que exhibe fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta con longitud de onda de 365 nm. Para la técnica de NMP se requirió una etapa de preenriquecimiento en CL, y posterior confirmación con la prueba múltiple referida.

Diagrama 2

Investigación de la microbiología de jitomate

Bolsa con 6 jitomates

+

100 ml caldo
lactosado



Frotar 1 min.



Suspensión (D)



Diluciones decimales

48

BMA
ACE

Enterobacteriaceae
ARBV+glucosa (1 %)

OCT
ARBV

Hongos y levaduras
APD+ RB (0.6 %)+ ampicilina (2 %)

°/ 24-48 h

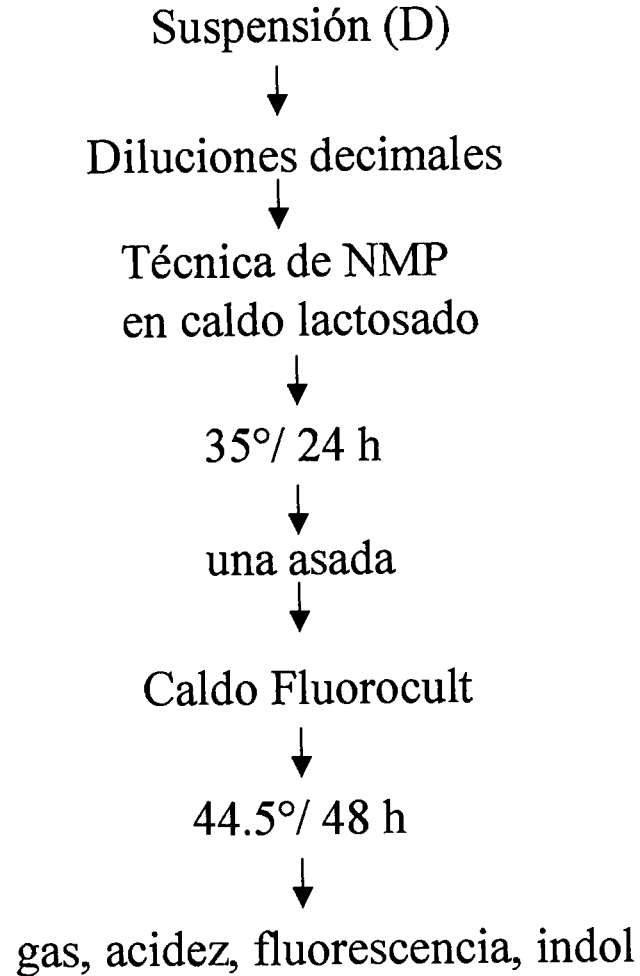
35°/ 24 h

35°/ 24 h

22°/ 3-5 días

Diagrama 3

Determinación semicuantitativa de *E. coli* en jitomate



V.2.3 Microorganismos patógenos

A) *Salmonella* (Flowers y col., 1992) (Diagrama 4).

Las muestras se preenriquecieron en CL a 35°/ 18 h, se preenriquecieron en dos caldos de enriquecimiento selectivo (CTT y CSC) y se incubaron a 43° y 35° respectivamente durante 24 h. El aislamiento se obtuvo en 4 medios selectivos: AVB, ASB, XLD y ASS. Las colonias sospechosas se confirmaron bioquímica y serológicamente.

B) *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* (Diagrama 5 y 6).

Todas las muestras, excepto la tierra, se analizaron mediante la técnica de la USDA (Donnelly y Brackett, 1992), preenriqueciendo en caldo UVM a 35°/24 h y enriqueciendo 0.1 ml en caldo Fraser (35°/48 h). Los tubos ennegrecidos se estrían en medios selectivos de MOX y LPM, de los cuales se aislaron de 3 a 4 colonias presuntivas de *Listeria*, se purificaron en placas de AST-EL y se conservaron en tubo inclinado con el mismo medio. Las cepas aisladas se confirmaron bioquímicamente, y por serología e hibridación de DNA (Ryser y Marth, 1991).

Las muestras de tierra se analizaron por la técnica de la FDA (Hitchins, 1995b), sometiendo a enriquecimiento en caldo LEB a 30°/48 h y continuando de manera similar a la técnica de la USDA.

Considerando la importancia de recuperar patógenos como *Salmonella* y *Listeria* a partir de un alimento con características tan peculiares y que es ampliamente consumido crudo, se evaluó la sensibilidad de las dos técnicas tradicionales de recuperación de patógenos utilizadas en este estudio.

Diagrama 4

Investigación de *Salmonella* spp. en jitomate

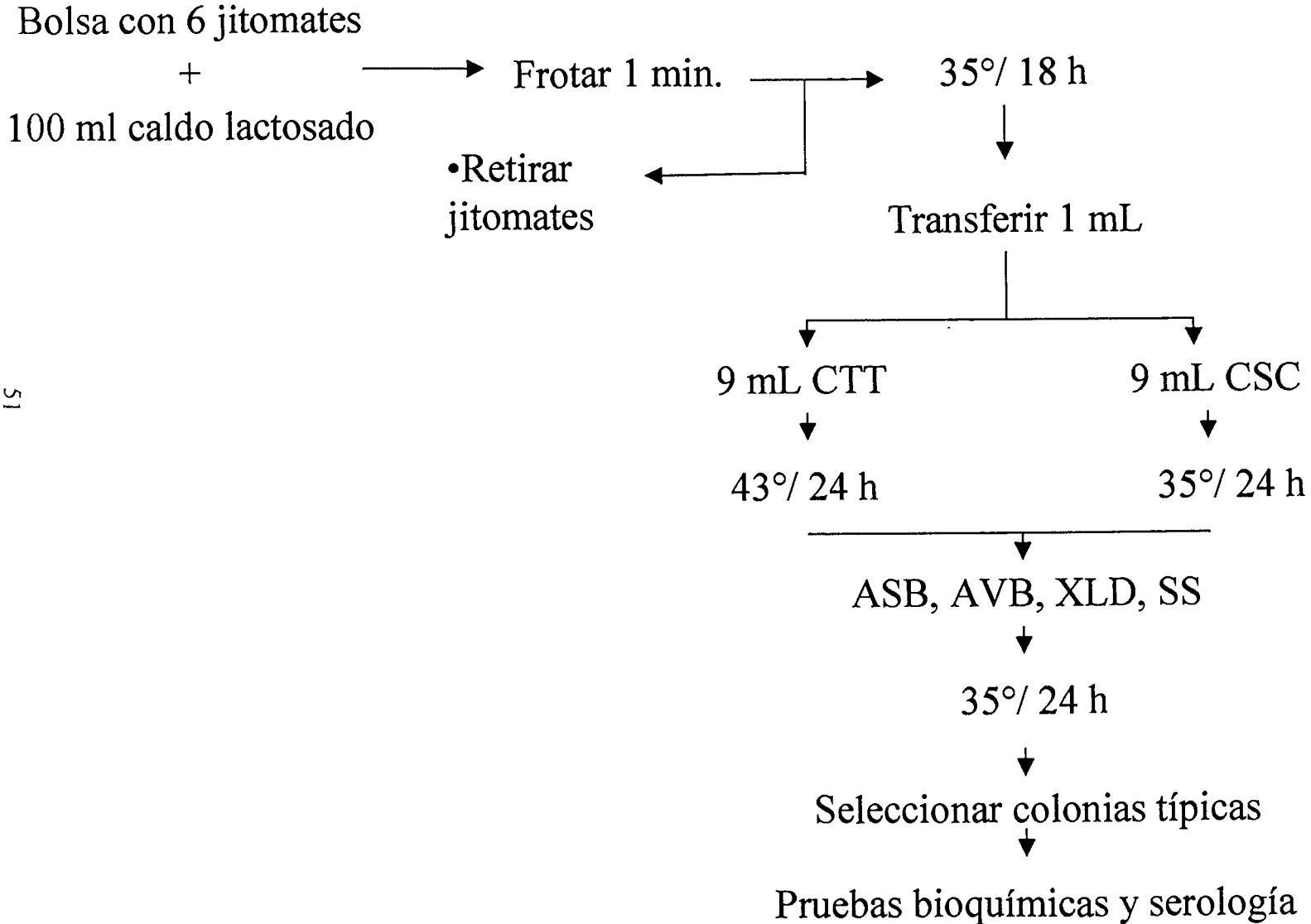


Diagrama 5

Investigación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en jitomate

Bolsa con 6 jitomates
+
100 ml caldo UVM

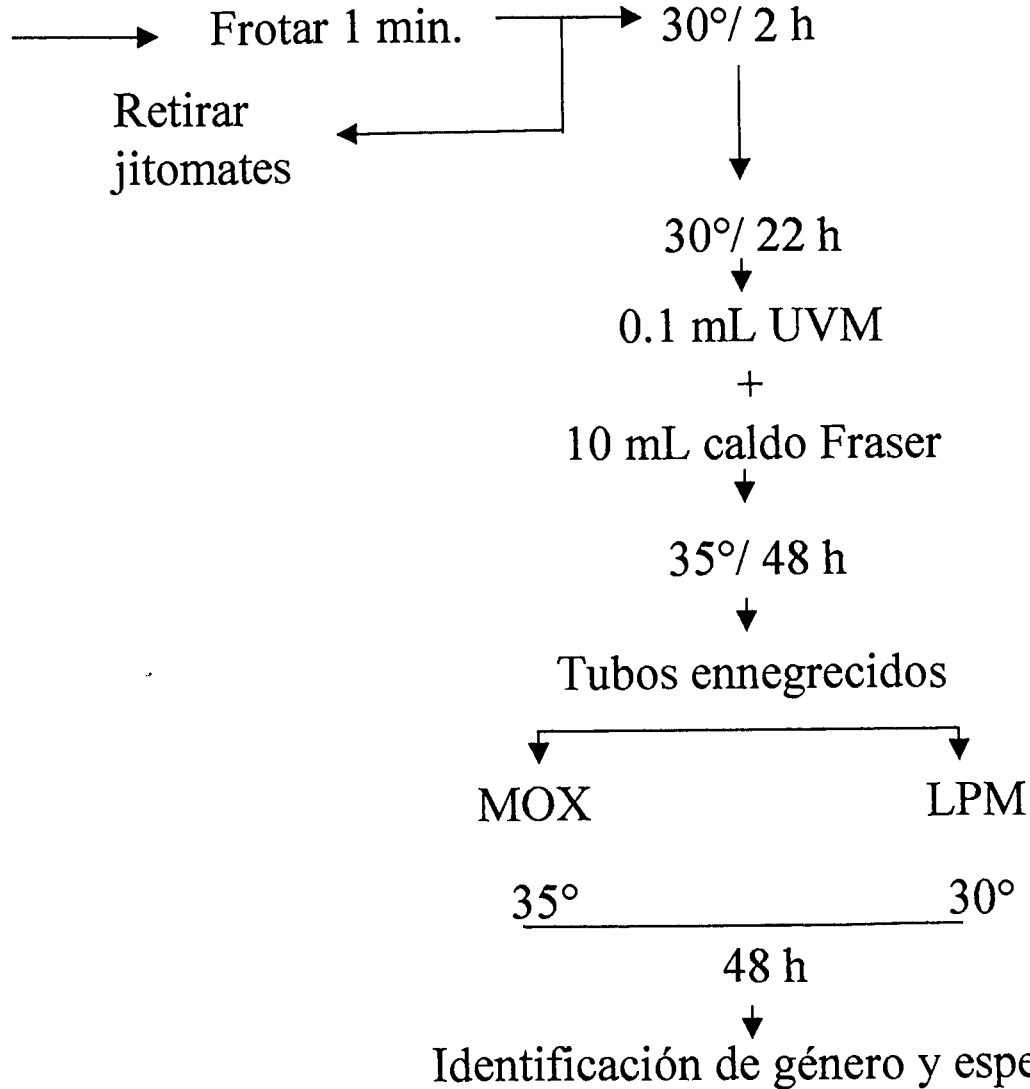
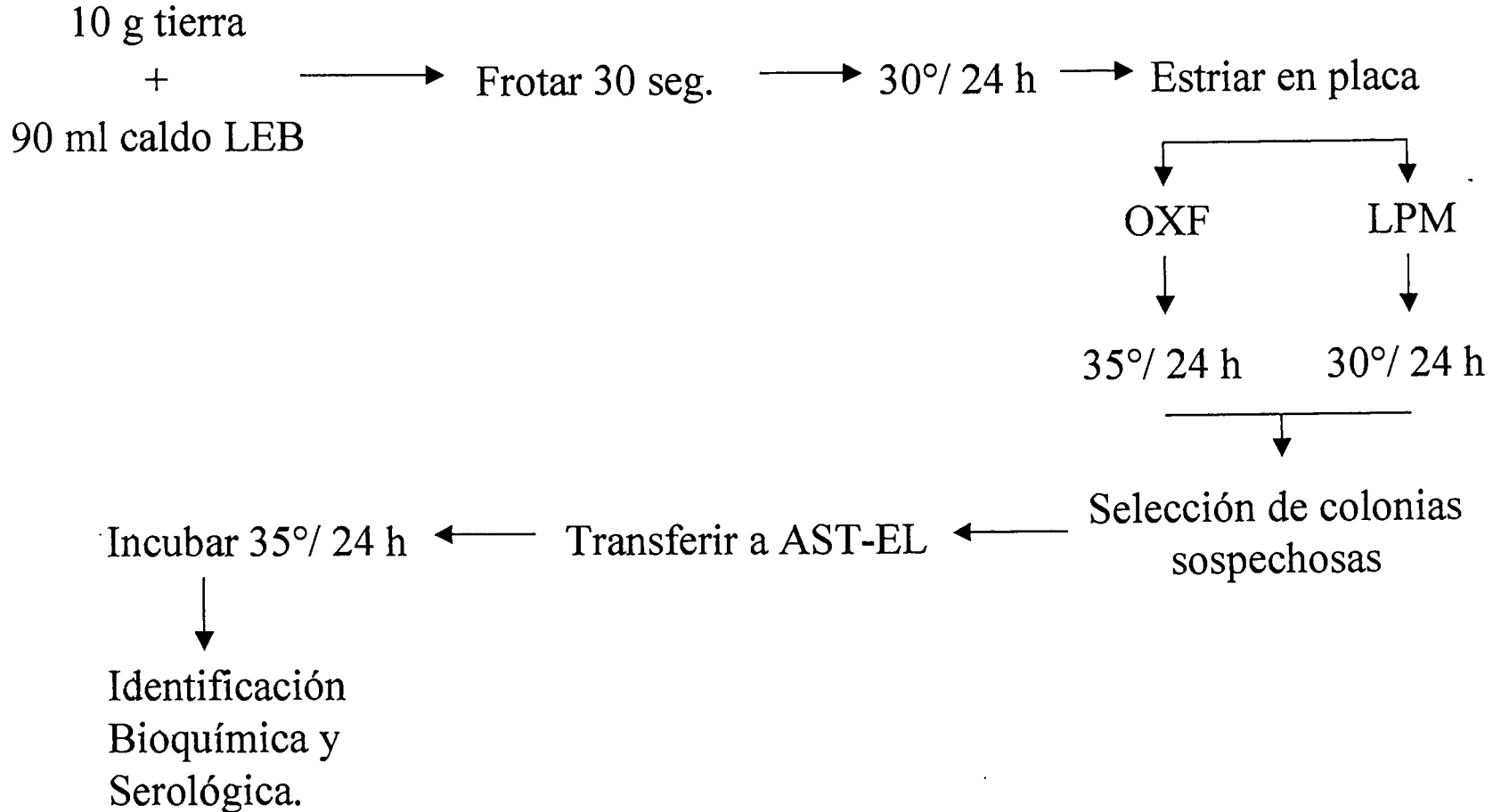


Diagrama 6

Investigación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en tierra



V.2.4. Recuperación de bacterias mesófilas aerobias del aire

La recolección de las muestras de aire se realizó con un aparato automático que muestrea aire a una velocidad de flujo de aire de 100 Lt / min con opción de programar el volumen que se desee muestrear. Mediante muestreos preliminares se determinó que 100 Lt de aire era una cantidad de aire adecuada para comparar las poblaciones microbianas en diferentes áreas durante el proceso.

Área	Almacenamiento
	Empacado
	Lavado de esponjas
	Invernaderos
	Ventilación superior
	Ventilación lateral
	Periferia exterior de invernaderos
Localización	periferia
	crucero
	centro
	nivel alto (1.5 mt)
	nivel bajo (10 cm)
Condición	antes de barrer.
	después de barrer

Se determinó el contenido de BMA del aire, en 9 ocasiones. El muestreo se aplicó durante las etapas de cosecha, empacado y almacenamiento en diferentes horarios. Los muestreos para cada área se realizaban dentro de los mismos horarios, cuando las actividades eran semejantes.

Se utilizaron placas con agar cuenta estándar. Las placas se incubaron a 22°/48 h.

V.2.5 Evaluación de la técnica de la USDA para recuperar *Salmonella* spp. a partir de jitomates (Diagrama 7).

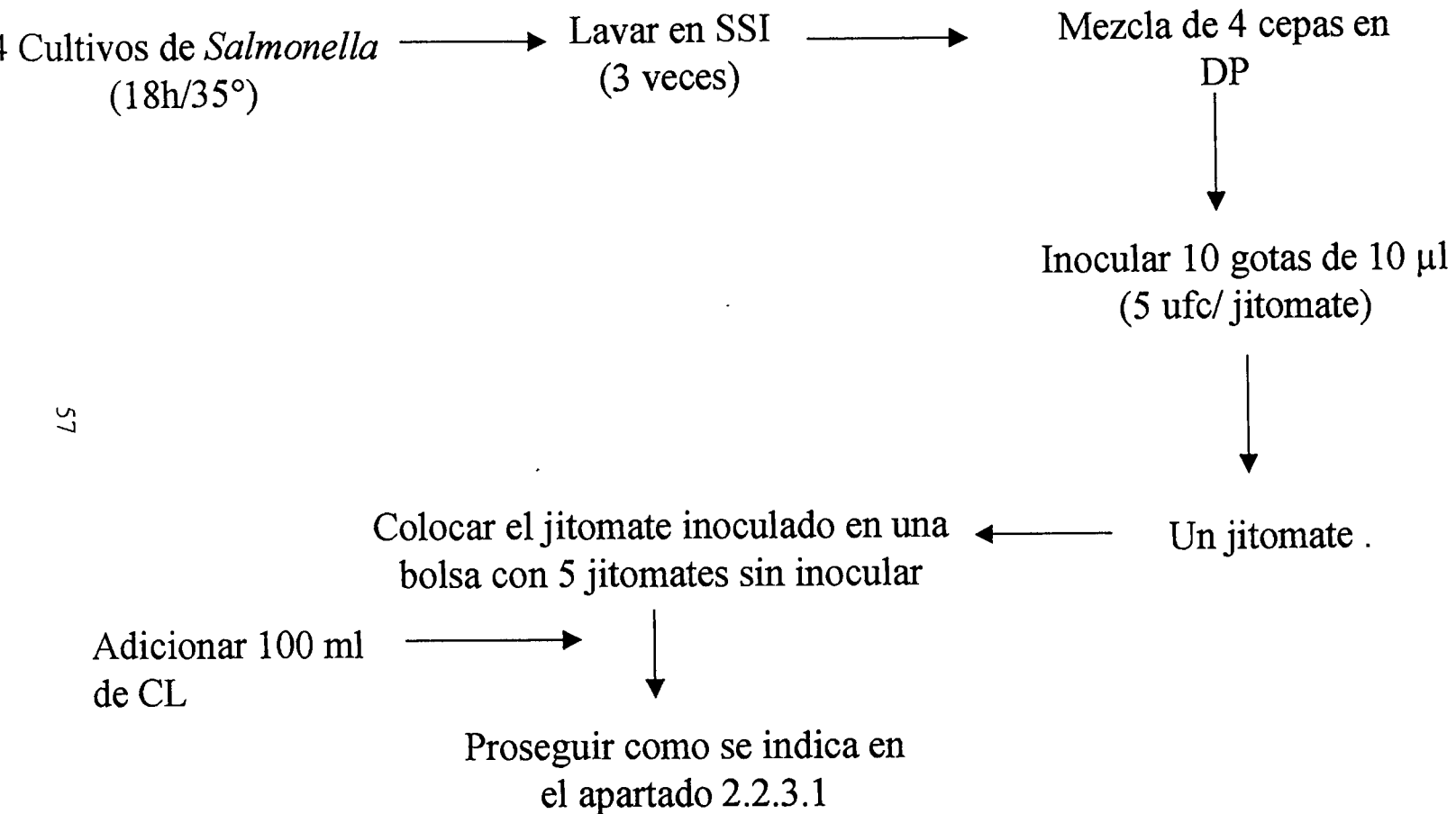
En ausencia de una técnica específica para recuperar *Salmonella* a partir de jitomate, se evaluó la técnica tradicional recomendada por la USDA.

Procedimiento:

1. Se prepararon cultivos frescos de 4 serovares de *Salmonella* (*S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Goonarienburg*, *S. Gominarum*) mediante 3 transferencias sucesivas en 3 ml de CST incubados 35°/18 h. Cada cepa se lavó dos veces con 3 ml de SSI y se centrifugó a 3500 rpm/ 5 min entre cada lavado. Se preparó la mezcla a partir de las cuatro cepas en DP y se homogenizó.
2. Se inoculó la superficie de un jitomate con 10 gotas de 10 µl c/u de la suspensión diluida para contener 5 ufc/ 0.1 ml. Se coloca el jitomate inoculado junto con otros 5 jitomates en una bolsa de plástico y se adicionaron 100 ml de CL. El estudio se realizó por triplicado.
3. La recuperación de *Salmonella* se llevó a cabo como se describe en el inciso a del apartado 2.3.
4. El recuento de la mezcla de cepas utilizadas como inóculo se efectuó por triplicado en AST por la técnica de Miles Misra con 20 µL de las diluciones 5, 6 y 7.

Diagrama 7

Evaluación de la técnica de la USDA para recuperar *Salmonella* spp. a partir de jitomates.



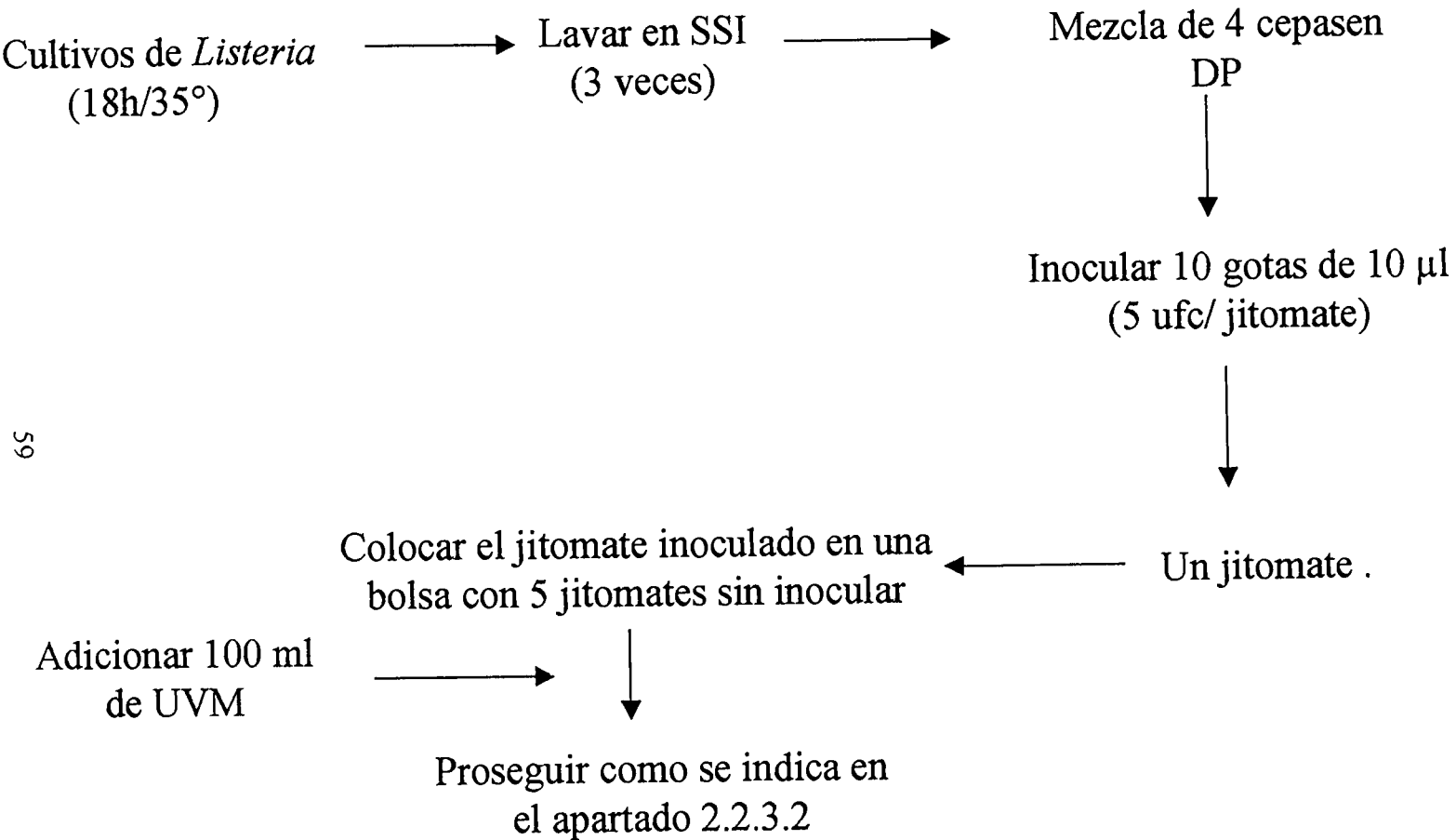
V.2.6 Evaluación de la técnica de la USDA para recuperar *Listeria* spp. a partir de jitomates (Diagrama 8).

Procedimiento:

1. Se prepararon cultivos frescos de 2 cepas de *Listeria* (*L. monocytogenes* Scott A, y otra nativa aislada de brócoli en nuestro laboratorio) y las especies *L. innocua* y *L. welshimeri* mediante 3 transferencias sucesivas en 3 ml de CST-EL incubados 35°/18 h. La mezcla se preparó como se indica en el paso 1 de 2.2.4.
2. Se prepararon diluciones decimales de la mezcla en DP de manera que se obtuvieran aproximadamente 5 ufc/ 0.1 ml . Se inoculó la superficie de un jitomate con 10 gotas de 10 µl c/u de la respectiva dilución. Se colocó el jitomate inoculado junto con otros 5 jitomates en una bolsa de plástico y se adicionó caldo UVM. La técnica se realizó por triplicado.
3. El recuento de la mezcla de cepas utilizadas como inóculo se efectuó por triplicado en AST-EL por la técnica de Miles Misra con 20 µL de las diluciones 5, 6 y 7.
4. La recuperación de *Listeria* se llevó a cabo como se describe en el inciso b del apartado 2.3.

Diagrama 8

Evaluación de la técnica de la USDA para recuperar *Listeria* spp. a partir de jitomates.



Objetivo 3. (Aislar, identificar y en su caso efectuar el recuento de microorganismos de interés sanitario en los materiales y producto).

V.3.1 Identificación de microorganismos patógenos de jitomate hidropónico y del comercio

A) Las cepas de *Salmonella* aisladas de colonias sospechosas de los medios selectivos mencionados se confirmaron, mediante las siguientes pruebas:

1. Características morfológicas y de cultivo (Flowers y col., 1992).

A partir de un cultivo en AST incubado a 35°/ 18- 24 h se preparó un frotis y tinción de Gram para confirmar su pureza al microscopio.

Las pruebas bioquímicas incluyen:

- Fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa (medio TSI)
- Descarboxilación de lisina y ornitina (medio LIA, MIO)
- Producción de ácido sulfhídrico (TSI)
- Movilidad (MIO)
- Producción de Indol (MIO)
- Utilización del citrato como única fuente de carbono (medio de citrato)
- Producción de amoníaco a partir de urea (caldo urea)

2. Identificación serológica.

Procedimiento:

- 1.Reconstituir el antisuero A-1 en 1 ml de solución salina isotónica estéril.
2. Incluir un control positivo (*S. Typhimurium*) como referencia y un control negativo (*E. coli*).
- 3.Probar las cepas problemas a partir de un cultivo de 18 h en AST.
- 4.Efectuar la aglutinación en laminilla.

Las cepas confirmadas fueron enviadas al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, INDRE, SeSa, para su serotipificación.

B) Identificación de género y especie de *Listeria* .

Se confirmó la pureza del cultivo en AST-EL e identificó morfológicamente al microorganismo mediante la observación de un frotis teñido al Gram y movilidad al microscopio.

1. Género (Ryser y col., 1991):

- hidrólisis de la esculina
- producción de catalasa
- movilidad en medio de SIM
- rojo de metilo
- Vogues-Proskauer
- hidrólisis de la urea
- fermentación de lactosa y glucosa

2. Especies (Ryser y col., 1991):

- fermentación de manitol, xilosa y ramnosa.
- beta-hemólisis en gelosa sangre de borrego.

3. Identificación serológica (Difco, 1975).

La identificación con antisueros específicos se realizó en las cepas identificadas como *L. monocytogenes*.

Procedimiento:

1. Diluir los antisueros comerciales (Difco) O tipo 1 y 4 en solución salina estéril 1:20.

2. Incluir un control positivo usando la cepa Scott A como referencia y un control negativo (un buffer de fosfatos adicionado de formaldehído al 0.3 % final).
3. Probar las cepas problemas a partir de un cultivo de 18 h en CST-EL.
4. Efectuar la prueba con la técnica de aglutinación en laminilla.

4. Hibridación de DNA

La confirmación del género es mediante la prueba de hibridación de DNA con un Kit comercial en las cepas identificadas presuntivamente como *Listeria*.

A partir del cultivo puro se prepararon cultivos de 18 h en CST-EL incubados a 35°.

La prueba consta de 6 etapas (Gene-Trak, 1992)

- a. Lisar la célula.
- b. Liberar el DNA
- c. Hibridar del DNA del microorganismo con la sonda de prueba.
- d. Captura del complejo hibridado
- e. Marcación enzimática del complejo
- f. Desarrollo del color y detección fotométrica.

C) Identificación de la flora nativa de jitomate hidropónico y del comercio.

1. Selección de cepas de *Enterobacteriaceae*.

Se estudiaron 200 cepas de *Enterobacteriaceae* a partir de colonias características en las placas de ABRVG. Se seleccionaron colonias de diferentes diámetros (0.5 - 4.0 mm), púrpura oscuro, púrpura claro y rosa, con y sin halo de precipitación de sales biliares. Se transfirieron al medio selectivo EMB para su purificación. Las colonias aisladas en EMB se resembraron en AST y se incubaron a 35° / 18-24 h. Mediante la tinción de Gram se confirmó su pureza al microscopio. Se conservaron en AST.

2. Identificación de género y especie.

A partir de un cultivo de 24 h se aplicaron diversas pruebas de metabolismo, de forma tradicional:

- Fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa (medio TSI)
- Descarboxilación de lisina y ornitina (medio LIA, MIO)
- Producción de ácido sulfhídrico (TSI)
- Movilidad (MIO)
- Producción de Indol (MIO)
- Utilización del citrato como única fuente de carbono (medio de citrato)
- Producción de amoníaco a partir de urea (caldo urea)
- Fermentación de manitol (caldo manitol)
- Prueba de Rojo de metilo (caldo RM-VP)
- Prueba de Vogues- Proskauer (caldo RM-VP)

Los géneros y especies fueron determinados apoyándose en la novena edición del manual Bergey's, 1994.

Objetivo 4 (Computar los resultados y elaborar un perfil de contaminación de los invernaderos y factores que determinan la calidad microbiológica del jitomate).

V.4.1 Cómputo de resultados y elaboración del perfil de contaminación.

V.4.2 Análisis estadístico.

Para determinar el significado de diferencias en el contenido microbiano de jitomate hidropónico y materiales involucrados en el cultivo hidropónico, así como de jitomate proveniente de mercados y supermercados, se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis la cual detecta diferencias significativas de medianas (Montgomery, 1991).

Objetivo 5. (Comparar la microbiología del jitomate hidropónico con la del jitomate obtenido del comercio).

V.5 Microbiología de jitomate comercial.

V.5.1 Selección de puntos de muestreo y recolección de muestras.

En 4 mercados públicos y 4 supermercados de la ciudad de Querétaro se colectaron 114 muestras de jitomate "saladette", a lo largo de 9 meses, que incluyen tres épocas del año: calurosa (Febrero-Mayo), lluviosa (Junio-Julio) y fría (Noviembre-Enero).

Se seleccionaron jitomates relativamente limpios (sin residuos de tierra). La unidad de muestreo fueron 6 jitomates.

V.5.2. Microbiología

En cada muestra se investigó el contenido de 5 grupos indicadores (*Enterobacteriaceae*, organismos coliformes, hongos, levaduras y *E. coli*) y la presencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Las muestras se trasladaron al laboratorio y se analizaron dentro de 2 a 3 horas después de la recolección, siguiendo las técnicas descritas en los apartados V.2.2 y V.2.3.

VI. Resultados y discusión

Los resultados y discusión se presentan en el siguiente orden:

VI.1. Microbiología de jitomates hidropónicos.

VI.1.1. Recién cosechado.

VI.1.2. Sin limpiar y limpiado del área de empacado.

VI.2. Reservorios de microorganismos.

VI.2.1. Tierra.

VI.2.2. Encharcamientos.

VI.2.3. Polvo de la superficie de los pasillos.

VI. 3. Fuentes de contaminación en el interior de los invernaderos.

VI.3.1. Materiales utilizados durante la germinación.

VI.3.2. Trabajadores.

VI.4. Fuentes de contaminación externas a los invernaderos.

VI.4.1. Esponjas.

VI.4.2. Trapos sucios y limpios.

VI.4.3. Polvo de la superficie del piso del área de almacenamiento de jitomate.

VI.5. Eficiencia de los tratamientos que se aplican a diversos materiales.

VI.5.1. El lavado de manos de cosechadores y empacadores de jitomate.

VI.5.2. La utilización de tapetes sanitarios.

VI.5.3. El tratamiento térmico para desinfectar esponjas.

VI.5.4. La práctica de limpiado de jitomate en el área de empacado.

VI.5.5. El lavado de los trapos empleados en la limpieza de los jitomates.

VI.6. Evaluación de la técnica de la USDA para el aislamiento de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*.

VI.7. Microbiología del aire.

VI.7.1. Área de almacenamiento.

VI.7.2. Área de empacado.

VI.7.3. Área de lavado de esponjas.

VI.7.4. Invernaderos.

VI.7.5. Ambiente exterior.

VI.8. Microbiología del jitomate del comercio.

VI.9. Identificación de las cepas aisladas de diversos materiales.

Desafortunadamente en México no se cuenta con información sobre la magnitud de la participación de las verduras como agente etiológico en brotes de ETAs. Y es más escasa aún sobre la frecuencia de bacterias patógenas en estos productos.

En la actualidad los convenios de comercio internacional presentan restricciones severas para aceptar productos que contienen este tipo de microorganismos.

La necesidad de generar frutas y verduras libres de microorganismos patógenos para el humano ha impulsado el desarrollo de tecnologías de cultivo que toman en consideración este problema. El cultivo hidropónico ofrece amplias expectativas al respecto. La tierra no es necesaria, aunque se requiere cuidar la calidad bacteriológica del agua.

La mayoría de los estudios en el jitomate se han enfocado principalmente a la obtención de mayores rendimientos y a la prevención de enfermedades en las plantas. Un objetivo central es generar mayor resistencia a diversos factores ambientales y enfermedades que actualmente provocan pérdidas económicas considerables. En contraste, los estudios sobre la importancia sanitaria de los microorganismos son escasos.

La persistencia de los microorganismos suele ser afectada por factores intrínsecos de las verduras como la actividad de agua (Brackett, 1997), el tipo de verdura (Brackett y Splittstoesser, 1992) y las características del suelo. Las bacterias dentro del tejido de las frutas generalmente se asocia con condiciones patológicas del fruto. En frutas sanas la flora bacteriana está limitada a la superficie, mientras el interior es virtualmente estéril (Samish y col., 1963). Las frutas tienen una cáscara o cubierta externa que protege al fruto de la invasión microbiana. Cuando la cubierta es dañada, los microorganismos pueden ingresar fácilmente, desarrollar y deteriorar al fruto (Mountney y Wilbur, 1971).

La altura o proximidad a la que se encuentra el fruto con respecto al suelo, el lugar donde se localiza dentro del invernadero, el tipo de ventilación del invernadero y la estación del año, son factores que pueden determinar el contenido microbiano. Muchas verduras se desarrollan cerca o por debajo de la

superficie del suelo, y por ello, están sujetos a presentar una microflora muy heterogénea (Mountney y Wilbur, 1971).

Para mejorar la calidad microbiológica de los jitomates cultivados en condiciones de hidroponía es necesario llevar a cabo estudios pongan de manifiesto las fuentes de contaminación más relevantes. Los invernaderos difieren en ocasiones en el tipo de ventilación, en la estructura y tipo de piso, y en las condiciones de temperatura y humedad relativa.

Entre los grupos microbianos de interés en los vegetales crudos que pudieran guardar una correlación con la presencia de microorganismos patógenos destacan las *Enterobacteriaceae* y los organismos coliformes. Es recomendable el uso de la familia *Enterobacteriaceae* como indicador de la calidad sanitaria de alimentos en lugar de los tradicionales coliformes, debido a que la primera está mejor definida taxonómicamente y es más abundante (Mossel y col., 1979; Mercuri y Cox, 1979). No se limita a los fermentadores de la lactosa ya que existen patógenos no fermentadores que pueden desarrollar en los alimentos (Oblinger y col., 1982).

La mayoría de los laboratorios de control sanitario de los alimentos aplican rutinariamente el análisis de *Enterobacteriaceae*, de organismos coliformes totales (OCT) (De Boer, 1998), y de *E.coli*, este último como indicador de contaminación fecal. Suelen incluirse además bacterias mesófilas aerobias (BMA) y hongos y levaduras como indicadores de frescura, y patógenos como *L. monocytogenes* y *Salmonella*. En este trabajo hemos incluido a todos los mencionados en un primer enfoque, para apreciar su posible relación con las condiciones sanitarias prevalentes a lo largo del proceso de producción.

A partir de la misma muestra de los diversos materiales analizados se investigaron todos los microorganismos anteriormente mencionados, excepto *Listeria* debido a la peculiar metodología que se requiere para su recuperación.

El muestreo cubrió el período de Mayo 1999- Octubre 2001, con 185 visitas a lo largo de dos ciclos de producción de jitomate. Cada ciclo comprende 6 etapas: germinación de la semilla, crecimiento de la planta, desarrollo del jitomate, cosecha, empacado y almacenamiento.

Los jitomates provenían de 2 invernaderos de ventilación lateral y de 3 de ventilación superior. Las muestras se colectaron en bolsas de plástico y se transportaron al laboratorio protegiéndolas de cualquier contaminación externa.

La estructuración y acondicionamiento dentro de los invernaderos permite amortiguar los cambios bruscos de temperatura del exterior. Los registros de las condiciones ambientales dentro de los invernaderos, fueron las siguientes: en época de calor la humedad relativa oscilo entre 75 a 82% y temperaturas de 25° a 35°, y en época de frío la humedad relativa desciende ligeramente entre 70 a 75% con temperaturas extremas de 15° a 29°, pero regularmente de 26°.

VI. 1. Microbiología de jitomates hidropónicos

VI.1.1. Jitomate recién cosechado:

En frutos sanos, la flora bacteriana está limitada a la superficie, mientras el tejido interno es virtualmente estéril. Sin embargo, esta flora epífita puede ingresar al fruto por aperturas naturales o a través de las heridas ocasionadas por agentes externos. Las bacterias muestran potencial para penetrar los tejidos más fácilmente en las etapas tempranas de desarrollo del fruto, cuando los diferentes canales o aperturas todavía no se cubren por corcho o materiales cerosos (Samish y col., 1963).

Los resultados que obtuvimos es esta investigación se refiere a microorganismos de la superficie del jitomate. En la literatura encontramos reportes de carga microbiana en verduras que crecen enterradas en el suelo (tubérculos) o sobre la superficie de la tierra (la lechuga y el perejil) con niveles de hasta 10^7 microorganismos por gramo. Aún en un mismo tipo de verdura, la población microbiana suele variar de manera considerable; en la col, por ejemplo se han obtenido recuentos desde 10^4 hasta 10^9 microorganismos por gramo, (cit. Vanderzant y Splittstoesser, 1992). En las fresas y las uvas oscilan entre 10^5 y 10^6 microorganismos por gramo. En contraste, los jitomates suelen contener únicamente entre 10^1 y 10^3 (cit. Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

Resultados semejantes a los mencionados en la literatura detectamos en jitomate hidropónicos (Tabla 2), aunque con variaciones según el tipo de invernadero, localización, nivel de altura y época del año.

Entre las 207 muestras compuestas de jitomate colectadas durante las épocas calurosa, fría y lluviosa, los coliformes totales y *Enterobacteriaceae* fueron escasos. Las cifras generalmente oscilan entre <0.5 y 0.8 log ufc/ jitomate como medianas, y máximos de <4 a <6 log ufc/ jitomate para los primeros y cifras algo superiores para las segundas (Tabla 2). Estos niveles son congruentes con la amplia protección que ofrecen los sistemas cerrados y ausencia de tierra de cultivo dentro de los invernaderos.

Otro microorganismo de nuestro interés fue *E. coli*, que está muy bien relacionado con la deficiencia en prácticas de sanidad. Estas incluyen el uso de aguas contaminadas para la irrigación, la presencia de heces de animales y de humanos en la zona, así como contaminación por parte de los trabajadores o del equipo de trabajo (Vanderzant y Splittstoesser, 1992). Este microorganismos estuvo ausente en todas las muestras (Tabla 2)(<0.5 NMP/ jitomate). La detección de un número tan bajo (mediana de 0.8 log ufc/ jitomate) de *Enterobacteriaceae* y la ausencia de *E. coli*, pone de manifiesto una aceptable calidad de los jitomates obtenidos bajo condiciones de hidroponía. No obstante, y de manera sorprendente se detectó *Salmonella*, en algunos especímenes. Es evidente que ni los grupos coliforme y *Enterobacteriaceae*, ni la *E. coli*, pueden ser utilizados como recurso para sugerir la presencia de bacterias patógenas entéricas en jitomate. Situación similar se ha observado en el caso de la fresa (Alvarez, 2002).

Ante tan reducidas cifras de los tres grupos indicadores, se optó por seleccionar uno más amplio, de manera que aportará niveles significativos de microorganismos para estadísticamente determinar el efecto de las variables de interés que puedan afectar la microbiología del jitomate. Las bacterias mesófilas aerobias (BMA); aplicado a los jitomates, se encuentran variaciones marcadas dentro de los límites para BMA, hongos y levaduras (Tabla 2), que son la expresión de la diversidad de factores ambientales relacionados con la contaminación por polvo en el ambiente principalmente externo a los invernaderos.

Tabla 2

Resumen de seis grupos microbianos en jitomates muestreados en el centro, cruceros y partes laterales procedentes de invernaderos de ventilación superior y lateral, durante los períodos caluroso, frío y lluvioso.

	(log ufc/jitomate)					(NMP/jitomate)
	BMA	<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	Hongos	Levaduras	<i>E. coli</i>
mínimo	<1.2	<0.5	<0.5	<0.9	<0.9	<0.5
mediana	3.2	0.8	<0.5	2.8	1.2	<0.5
máximo	6.5	5.3	3.9	6	5.8	<0.5
media	4.6	3.6	2.1	4.6	3.9	
desv. Estándar	5.5	4.3	3	5.2	4.7	
No. Muestras	122	207	62	146	146	541

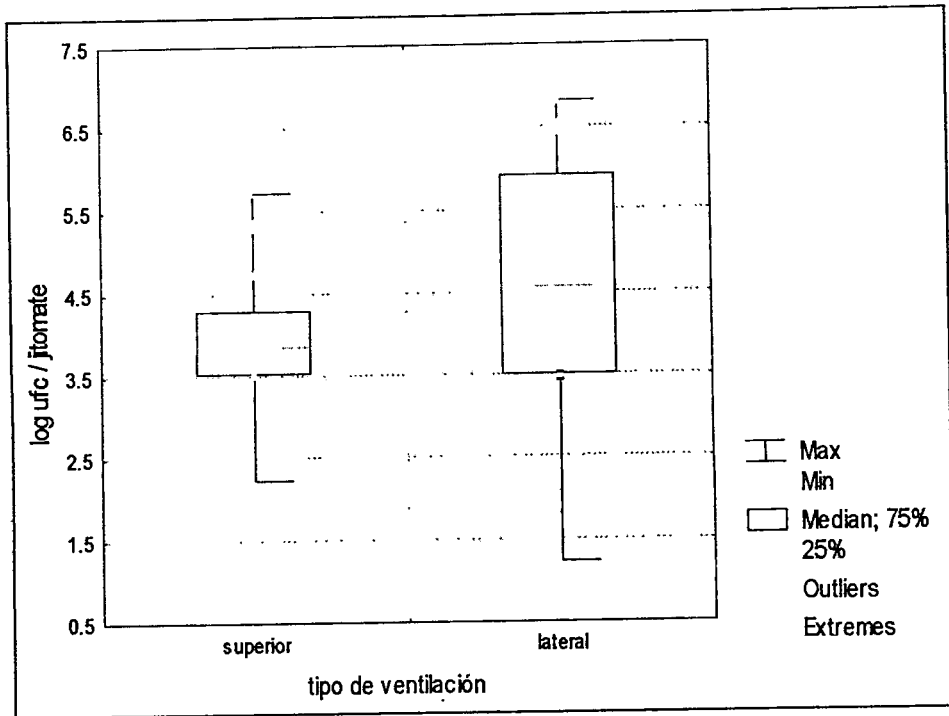
El comportamiento de las BMA en el jitomate en función del nivel de altura, localización, tipo de ventilación y época del año, resultó significativo en función del tipo de ventilación en la época fría (Figura 2) y de la época del año (Figura 3). La comparación de los resultados se realizó en términos de medianas ($p < 0.05$) (prueba de Kruskal-Wallis).

El nivel de probabilidad utilizado fue menor de 0.05. Debido a la amplia dispersión de los datos fue recomendable utilizar las medianas para la toma de decisiones. En el caso de la media, ésta resultaría desplazada drásticamente por algún valor individual extremo.

La época del año fue factor relevante en los niveles de carga microbiana de los jitomates. Durante la época fría hubo un ligero descenso de temperatura y de humedad relativa en el interior de los invernaderos, cambios que no se observaron en la época calurosa. La diferencia repercutió en un ligero incremento (mediana) en el contenido de BMA en los frutos recolectados en la época de calor.

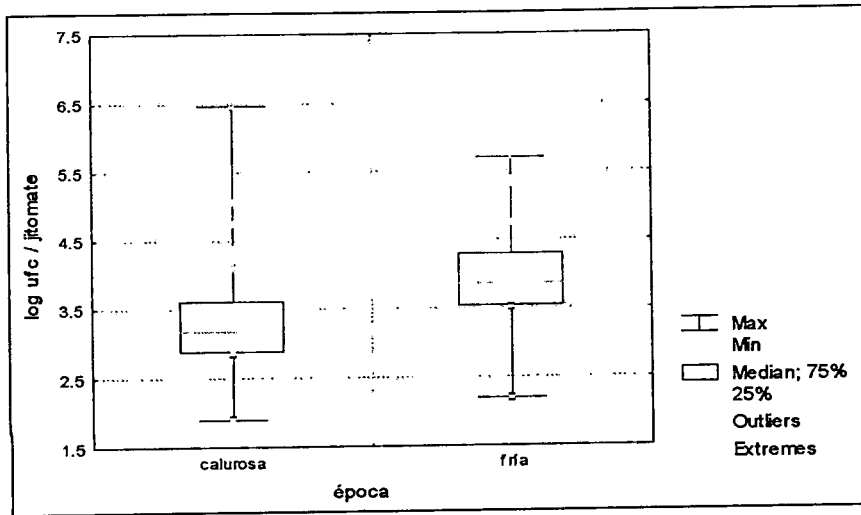
La presencia de patógenos como *Salmonella* fue esporádica en tanto que la *Listeria* spp siempre estuvo ausente (Tabla 3). La incidencia de *Salmonella* en algunas verduras crudas puede variar desde ausente en brócoli ó hasta 68% en lechuga (según recopilación de Fernández, 2000). Nosotros la detectamos en el 2.95% de 541 muestras de jitomate. La positividad no se mantuvo a lo largo del año. En época calurosa, fue de 4.2 %, en la fría de 3.9% y en la lluviosa de 1.6% (Tabla 3), no difiriendo significativamente ($p > 0.05$).

La presencia de *Salmonella* en los jitomate que resultaron negativos a *E.coli* sugiere una mayor capacidad de *Salmonella* para sobrevivir en el medio ambiente y en particular en el jitomate. Se ha reportado que *E.coli* difícilmente sobrevive y más bien tiende a morir en frutas y verduras (Fernández, 2000). Por el contrario, *Salmonella* mantiene mejor su viabilidad en las hortalizas: en hojas de betabel por 21 días, más de 40 días en papas, más de 10 días en zanahorias, más de 5 días en col y de 3 a 20 días en jitomates (Bryan, 1977). En este último existen posibilidades de multiplicación, a pesar de la aparente escasez de nutrientes, bajo contenido de humedad y pH entre 4.0-4.5. Esta última cifra está ligeramente por arriba del pH mínimo para el patógeno (3.8) (Fernández, 2000).

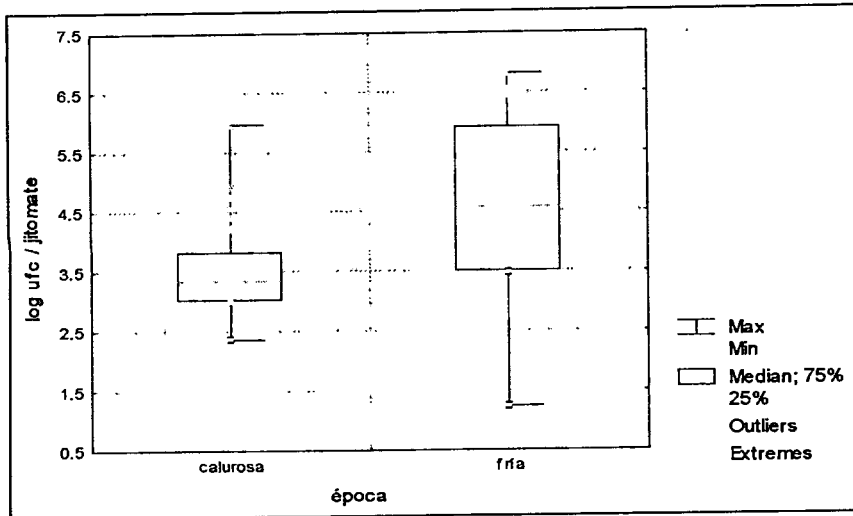


difieren significativamente

Figura 2. Efecto del tipo de ventilación sobre el contenido de bacterias mesófilas aerobias (período frío).



VENTILACIÓN SUPERIOR
(difieren significativamente)



VENTILACIÓN LATERAL
(difieren significativamente)

Figura 3. Efecto del período del año sobre el contenido de bacterias mesófilas aerobias en jitomates en invernaderos de ventilación superior y lateral.

Tabla 3

Positividad a *E.coli*, *Salmonella* y *Listeria* spp en jitomates muestreados en el centro, cruceros y partes laterales procedentes de invernaderos de ventilación superior y lateral, durante los periodos caluroso, frío y lluvioso.

Época		Positividad (+ / n (%))		
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
calurosa		0/164 (0)	7/164 (4.2)	0/164 (0)
fría		0/128 (0)	5/128 (3.9)	0/128 (0)
lluviosa		0/249 (0)	4/249 (1.6)	0 /75 (0)
	total	0 / 541 (0)	16 / 541 (2.95)	0 / 367 (0)

La *Salmonella* ha provocado brotes por consumo de jitomate crudo. El serovar implicado (*S. Montevideo*) fue capaz de crecer en la superficie de jitomates almacenados a 20° (Beuchat, 1995). Resultados similares se han reportado con otros serovares incluidos *S. Enteritidis*, *S. Infantis* y *S. Typhimurium*. Muestran capacidad para desarrollar en jitomates frescos partidos (pH 3.99- 4.37) a 22° y 30° (Beuchat, 1995).

Ante esta singular capacidad de sobrevivencia planteamos la hipótesis de que cepas de *Salmonella* (serovar *S. Typhimurium* y *S. Agona*) identificadas entre las muestras positivas pudieron haber colonizado el ambiente interior de los invernaderos. Tanto el patógeno como el indicador muestran un habitat y una susceptibilidad a la desecación y temperatura muy próximas. Teniendo una fuente de contaminación semejante (la materia fecal humana y de animales) y siendo mucho más abundante la *E.coli*, no era de esperar la presencia del patógeno en ausencia del indicador.

Resulta en consecuencia fundamental prevenir la contaminación con materia fecal de los substratos que pudieran entrar en contacto con las frutas y verduras dentro de los invernaderos, tales como las manos de los trabajadores, la tierra, el agua, y los materiales utilizados durante el desarrollo de la planta, cosecha, empaçado y distribución.

La ausencia de *Listeria* en las muestras examinadas es una situación poco frecuente, debido a la gran ubicuidad que caracteriza a este microorganismo. No es descartable su presencia, si bien podría ser muy esporádica y encontrarse en muy baja densidad. Existen reportes de aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de verduras crudas y ensaladas (García-Gimeno, 1996). Generalmente, la incidencia del patógeno es baja. En un estudio realizado por Farber y col. (1989) sobre la presencia de especies de *Listeria* en verduras, no se aisló en ninguna de las muestras *L. monocytogenes*; y sólo en 1 de 110 muestras se recuperó *Listeria* spp. En remolacha, brócoli, col, zanahorias, coliflor, lechuga, champiñones, papas y jitomates, y verduras congeladas como ejotes, chícharos y espinacas tampoco se detectó *L. monocytogenes* ni *Listeria* spp (Hettmansperger, 1984; Petran y col., 1988). En brócoli crudo se detectó *Listeria* spp y *L.monocytogenes* en un 7 y 3%,

respectivamente (Pérez, 1998). Por el contrario, Heisick y col. (1989) observaron que la positividad de *Listeria* spp. fue significativamente más alta en rábanos y papas que en otros vegetales.

En una planta productora de ensalada de verduras listas para su consumo (lechuga, zanahoria y col roja), se aisló *L. monocytogenes* en el 30% de las muestras (García-Gimeno, 1996). Este porcentaje fue marcadamente elevado en comparación con los hallazgos de otros investigadores, quienes reportaron 7% en muestras de ensaladas de verduras, 1% en col cruda y 9% en lechuga (García-Gimeno, 1996).

Aunque en verduras crudas o procesadas tales como la lechuga, col, espárragos, brócoli y espinacas se ha observado sobrevivencia de *L. monocytogenes*, no existen reportes de sobrevivencia en jitomate (García-Gimeno, 1996).

VI.1.2 Jitomate sin limpiar y limpiado del área de empackado:

Las verduras crudas mínimamente procesadas pueden contaminarse por contacto con el equipo, cuya sanidad no es fácil de implementar con eficacia (Kaneko y col., 1999).

Como se mencionó anteriormente, los jitomates cosechados son sometidos a un tratamiento al limpiado antes de ser empackados. En este punto del proceso se muestrearon jitomates antes y después de ser sometidos a dicho tratamiento. Se investigaron seis grupos microbianos. Los resultados para los jitomates sin limpiar (Tabla 4) y los limpiados (Tabla 5), mostraron una muy amplia dispersión de los valores para los diferentes grupos microbianos estudiados. En consecuencia, al realizar el análisis estadístico en función del contenido de *Enterobacteriaceae* (Figura 4), no se detectaron diferencia significativas al comparar medianas ($p > 0.05$) por efecto de limpiado.

Así, en términos de las poblaciones de *Enterobacteriaceae* entre los jitomates del invernadero (de < 0.5 a 5.3 log ufc/ jitomate) y los que fueron limpiados (de < 0.5 a 6.7 log ufc/ jitomate) del área de empackado, la diferencia de las medianas es de aproximadamente 1.5 log, (0.8 y 1.8 log, respectivamente).

Tabla 4

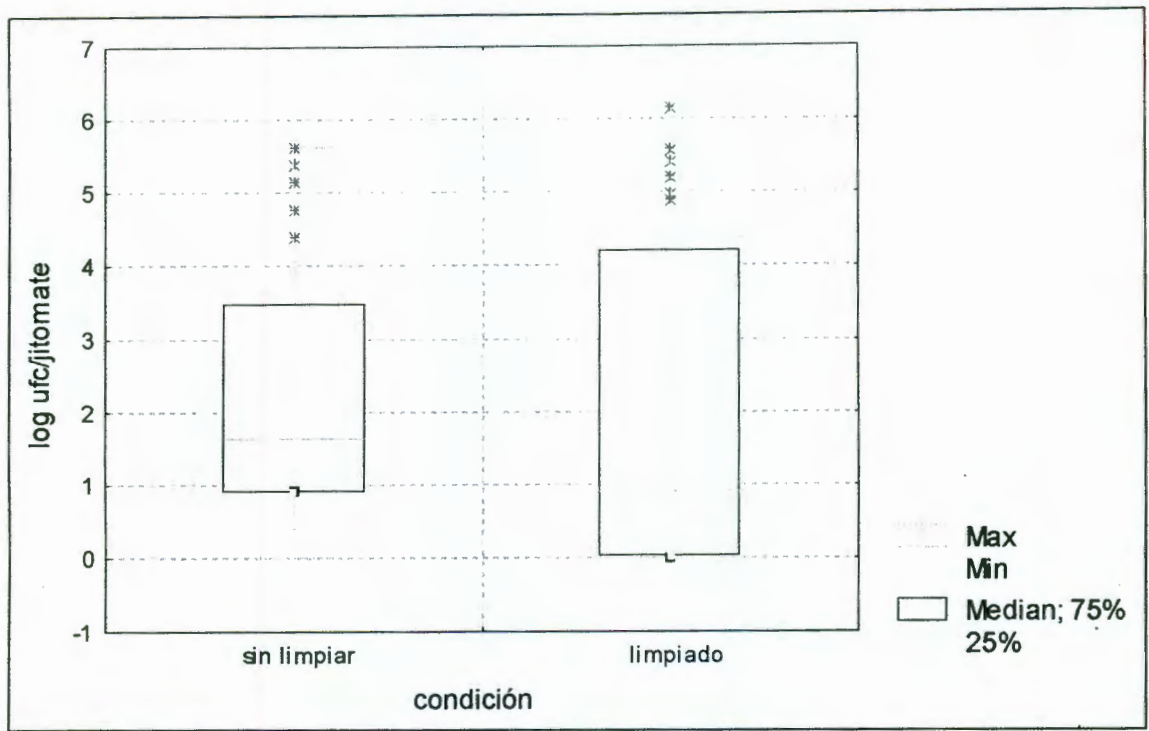
Seis grupos microbianos en jitomates sin limpiar del área de empacado.

	<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	Hongos	Levaduras	<i>E.coli</i>
	(log ufc / jitomate)				(NMP/ jitomate)
mínimo	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.5
mediana	1.6	<0.8	3	2	<0.5
máximo	5	3.7	6.2	4.9	<0.5
media	3.8	2.9	5	3.6	
desv. estandar	4.3	3.3	5.5	4.2	
No. Muestras	32	11	32	32	27

Tabla 5

Seis grupos microbianos en jitomates recién limpiados en el área de empaclado.

	(log ufc / jitomate)				(NMP/ jitomate)
	<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	Hongos	Levaduras	E. coli
mínimo	<0.5	<0.5	1.4	<0.5	<0.5
mediana	2.1	1.9	2.6	1.4	<0.5
máximo	6.1	6.1	5.2	4.7	<0.5
media	4.7	5.2	4.5	3.4	
desv. Estándar	5.4	5.6	4.8	4	
No. Muestras	33	13	33	33	33



	condición del jitomate		
	sin limpiar	limpiado	
	(ufc / jitomate)		
mínimo	< 8	< 8	
mediana	42	8	
máximo	4.2×10^5	1.4×10^6	no difieren significativamente
media	3.9×10^4	7.1×10^4	
desv. estándar	1×10^5	2.3×10^5	
No. Muestras	40	40	

a 4. Efecto del limpiado sobre el contenido de *Enterobacteriaceae* en jitomate del área de empacado.

Garg y col., (1990) han reportado para otras verduras empacadas cifras de 4.8 log para la coliflor, y de 5.2 a 5.9 log para la lechuga, zanahoria y espinaca.

La operación de limpiado de los jitomates no incrementó significativamente su carga microbiana, en consideración a criterios de inocuidad más directos, la atención se debe extender a la posible presencia de *Salmonella* en los jitomates de los invernaderos. El patógeno estuvo presente en el 2.8% tanto entre muestras de jitomates previo o posterior al efecto de limpiado (Tabla 6). La posibilidad de que el trapo usado en esta maniobra puede funcionar como un vehículo de contaminación de los jitomates, al contaminarse con las primeras unidades tratadas y el patógeno es transferido a las unidades subsecuentes no debe descartarse.

Es necesario destacar que la presencia de *Salmonella* no estuvo acompañada de *E.coli*, en los jitomates sin limpiar (Tabla 6), y sólo en 4 muestra de 144 (2.8%) de los limpiados. Una vez más *Listeria* estuvo ausente en ambos tipos de muestras de jitomate.

VI.2. Reservorios de microorganismos

VI.2.1. Tierra

Las muestras de tierra fueron colectadas dentro de los invernaderos y en su periferia exterior. Para determinar los niveles de contaminación microbiana en este sustrato (expuesto a condiciones ambientales diferentes dentro y fuera del invernadero), se investigó su microbiología en función de cinco grupos microbianos (*Enterobacteriaceae*, OCT, *E.coli*, hongos y levaduras) y de dos patógenos (*Salmonella* y *L. monocytogenes*). La representatividad de las muestras colectadas se incrementó retirando porciones de 10 g de tres puntos diferentes para conformar una muestra compuesta, tanto en los cruceros, como en el centro y partes laterales de los invernaderos.

El contenido de *Enterobacteriaceae* en tierra de la periferia exterior a los invernaderos, mostró un mínimo de 1.7 log ufc/ g y un máximo de 6.9 log ufc/ g, con mediana de 4.2 log ufc/ g (Tabla 7); las cifras de OCT fueron 0.7 log ufc,

Tabla 6

Positividad de *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* en jitomates sin limpiar y limpiados de el área de empaclado (resumen de periodo caluroso, lluvioso y frío).

condición del jitomate	No. Muestras	Positividad n (%)		
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
sin limpiar	71	0(0)	2(2.8)	0(0)
limpiado	144	0(0)	4(2.8)	0(0)

n: No. Positivos

(%): porcentaje de positividad.

Tabla 7

Cinco grupos microbianos en tierra colectada en el interior y en la periferia exterior de invernaderos.

Lugar	<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	Hongos	Levaduras	<i>E.coli</i>
	(log ufc / g)				(NMP/ g)
Interior de los invernaderos					
mínimo	<0.7	<0.7	<0.7	<0.7	<2.8
mediana	3.5	<0.7	3.7	2.1	<2.8
máximo	5.9	3.2	5.6	3.3	2.8
No. Muestras	64	14	14	14	14
Laterales exteriores del invernadero					
mínimo	1.7	0.7	4.4	2	< 2.8
mediana	4.1	2	5.1	3.7	< 2.8
máximo	6.6	4.7	6.3	4.6	18
No. Muestras	16	13	13	13	13
sembradio de espárragos					
mínimo	4	2	5.1	3.4	< 2.8
mediana	4.3	3	6.3	4.3	< 2.8
máximo	6.9	4.3	6.4	4.8	18
No. Muestras	5	5	5	5	5

4.5 log ufc y de 2.7 log ufc/ g respectivamente. La carga microbiana de la tierra del interior es notoriamente menor. Estos niveles de bacterias en la tierra son en realidad poco comunes en un substrato tan expuesto a la contaminación ambiental. Tales cifras contribuyen a explicar los reducidos números detectado en los jitomates.

Los factores que influyen en la sobrevivencia de patógenos en el suelo, incluyen el número y tipo de microorganismos (flora microbiana competitiva), el tipo de suelo (contenido de humedad, pH, cantidad de materia orgánica), la temperatura, la cantidad de lluvia, la luz solar, y la protección que le confiere el propio follaje.

Así, la presencia de *E.coli* en la tierra fue doblemente mayor en el exterior (11.4 %)(Tabla 8) que en el interior (6.1%)(Tabla 10). La diferencia (aunque con $p > 0.05$ no difirió estadísticamente) podría asociarse a una mayor contaminación fecal por animales silvestres o aves.

De manera coincidente, también la *Salmonella* mostró mayor incidencia (no significativa estadísticamente) en el exterior (6.1%)(Tabla 8) que en el interior (3.6%)(Tabla 10) de los invernaderos. Como reservorio, la tierra puede ser una fuente de contaminación a las charcas dentro de los invernaderos.

La ausencia de *Listeria* en tierra no es una casualidad; existen reportes en donde se refiere que *L. monocytogenes* se recupera más frecuentemente de tierra de las zonas del campo no cultivadas que de las cultivadas (Dowe y col., 1997; Weis y Seelinger, 1975). Al parecer, las zonas sin cultivar, al tener una vegetación natural más abundante, protegen al patógeno de la radiación solar y de la escasez de agua biológicamente disponible. La bacteria posiblemente sea inhibida en campos de cultivo por mecanismos desconocidos, o quizás su número sea muy reducido. Existen cepas que han fortalecido de alguna manera su capacidad para sobrevivir en la tierra. Welshimer (1960), evaluó la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en dos tipos de suelo, uno árido (nunca había sido cultivado) y el otro fértil. Los resultados mostraron una clara relación entre el nivel de deshidratación y la sobrevivencia del germen. En las muestras de suelo fértil el microorganismo sobrevivió alrededor de 185 días manteniendo un nivel de 10^5

Tabla 8

Positividad de *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* en tierra colectada de la periferia de invernaderos, próximos a donde se cultivan espárragos y maíz.

	No. muestras	Positividad n (%)		
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
laterales del invernadero	59	10 (16.9)	3 (5.1)	0(0)
sembradio de espárragos	54	3 (5.6)	4(7.4)	0(0)
sembradio de maíz	19	2(10.5)	1 (5.3)	0(0)
Total	132	15 (11.4)	8 (6.1)	0(0)

Tabla 9

Cuatro grupos microbianos de agua de encharcamiento dentro de invernaderos de ventilación superior y vivero.

agua de encharcamiento	(log ufc / ml)			
	<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	Hongos	Levaduras
mínimo	1	<0.7	0.7	0.7
mediana	4.9	4.6	1.8	1.9
máximo	8.4	4.7	4.4	4.6
media	7	4.5	3.3	3.5
desv. estandar	7.6	4.4	3.7	3.9
No.muestras	40	31	31	31

Tabla 10

Positividad a *E.coli*, *Salmonella* y *Listeria* spp en solución hidropónica, tierra y agua de encharcamientos durante la etapa de crecimiento y cosecha de jitomate.

material	No. muestras	Positividad n (%)	
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>
Sol. hidropónica (a)	11	0 (0)	0 (0)
Tierra (b)	330	20 (6.1)	12 (3.6)
Encharcamientos	34	15 (44.1)	5 (14.7)

(a) 10 ml

(b) 10 g

ufc/g hasta el final del estudio; por el contrario, en el suelo árido el descenso fue progresivo. Es concebible que la deshidratación del suelo contribuya en alguna medida a la destrucción de los microorganismos.

Dowe (1997), obtuvo resultados que muestran también que *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en particular, son menos comunes en el suelo cultivado que en el no cultivado. El estudio reveló que el 8.3% de los suelos cultivados y el 46.2% de los campos no cultivados resultaban positivos, 8.3% y 30.8% para *Listeria* spp y *L. monocytogenes* respectivamente. Así mismo, en los casos positivos el microorganismo estaba presente en bajas concentraciones (de 4 a 90 NMP/ g). Aunque el contenido de humedad no fue probado directamente, se sabe que el efecto del suelo en la sobrevivencia de *L. monocytogenes* se encuentra en función de la variabilidad con que los diferentes tipos de suelo mantienen la humedad.

VI.2.2. Encharcamientos:

Otro reservorio potencial de patógenos en los invernaderos son los encharcamientos. La recolección de las muestras se realizó de manera semejante a la de la tierra y se investigaron los mismos grupos indicadores y patógenos que en la tierra. Los niveles de *Enterobacteriaceae* y organismos coliformes resultaron muy elevados (Tabla 9) con mínimo de $< 0.7 \log \text{ ufc/ ml}$ (sensibilidad de la técnica) hasta un máximo de $8.4 \log \text{ ufc/ ml}$. La presencia de *E.coli* y *Salmonella* (Tabla 10), fue de 17% y 14.8% entre 88 muestras de encharcamiento, respectivamente. Las cifras sugieren la eventual proliferación de estos microorganismos en el agua.

El mecanismo de contaminación más probable al jitomate por patógenos es directo, cuando el jitomate cae sobre el encharcamiento o sobre la tierra. Ambos materiales son evidentemente reservorios importantes de microorganismos de origen intestinal. Para ilustrar lo anterior, en un estudio particular fue posible apreciar el grado de contaminación que adquieren los jitomates al caer espontáneamente en la tierra (Tabla 11), superficie plástica (Tabla 11) y encharcamientos (Tabla 11). Aquellos que cayeron directamente a las pequeñas charcas presentaban de 4.7 a 5.5 $\log \text{ ufc/ jitomate}$ más *Enterobacteriaceae* que los que cayeron en la superficie de plástico y tierra, respectivamente. Aunque no se

Tabla 11

Enterobacteriaceae, *Salmonella* y *E. coli* en jitomates que espontáneamente caen sobre la tierra, superficie plástica y agua de encharcamiento dentro del invernadero

	jitomate			tierra		
	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/ jitomate)	<i>E.coli</i> (NMP/jitomate)	<i>Salmonella</i> + /n	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc / g)	<i>E.coli</i> (NMP / g)	<i>Salmonella</i> + /n
mínimo	< 1.5	< 7.2	0/8	< 1	<0.3	0/8
máximo	2.3	<7.2		<1	<0.3	
mediana	< 1.5	<7.2		2.9	<0.3	
n	8	8		8	8	
	jitomate			superficie plástica		
	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/ jitomate)	<i>E.coli</i> (NMP/jitomate)	<i>Salmonella</i> + /n	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc / 85cm2)	<i>E.coli</i> (NMP / 85 cm2)	<i>Salmonella</i> + /n
mínimo	< 1.5	<7.2	0/8	< 1.6	<7.2	0/8
máximo	4.8	<7.2		7.7	<7.2	
mediana	1.9	<7.2		3.4	<7.2	
n	8	8		8	8	
	jitomate			agua de encharcamiento		
	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/ jitomate)	<i>E.coli</i> (NMP/jitomate)	<i>Salmonella</i> + /n	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc / ml)	<i>E.coli</i> (NMP / ml)	<i>Salmonella</i> + /n
mínimo	7	< 7.2	0/6	6.5	<0.3	0/6
máximo	9.3	>43.2		7.8	>15	
mediana	7.8	<7.2		7	<0.3	
n	6	6		6	6	

detectó *Salmonella* en los diversos tipos de muestra, *E.coli* estuvo presente en un jitomate que entró en contacto con encharcamientos. A pesar de que el número de muestras fue muy pequeño, disponemos una imagen de la magnitud de la carga microbiana que se transfiere al jitomate cuando entra en contacto con este tipo de fuentes.

El agua de encharcamiento es agua que proviene de la solución hidropónica que derrama de las macetas. Aunque es factible la proliferación de *Listeria* (Ryser y Marth, 1991), en este tipo de substrato en nuestro estudio nunca estuvo presente en este líquido.

VI.2.3. Polvo de la superficie de los pasillos:

La presencia de microorganismos de origen intestinal en un ambiente libre de prácticas agrícolas inadecuadas como la utilización de estiércol como fertilizante, el ingreso de animales domésticos o silvestres, o el uso de aguas residuales crudas o mal tratadas para riego, sugiere la existencia de algún mecanismo alterno de contaminación.

En este apartado nos enfocamos a determinar en que términos los pasillos de concreto del interior del invernadero (por donde frecuentemente circulan los trabajadores y vehículos) son fuentes de microorganismos de interés sanitario. Para obtener una imagen más comprensiva de estos microorganismos determinamos el contenido de *Enterobacteriaceae* (Tabla 12) y *E.coli* (Tabla 13) en el polvo de los pasillos dentro y fuera de un invernadero. Los resultados mostraron que sólo al inicio de la cosecha se mantiene bajo el número ($3.5 \log \text{ufc}/200\text{cm}^2$); la tendencia es hacia el incremento hasta llegar a niveles de $7 \log \text{ufc}/200\text{cm}^2$, lo que sucede al final de la cosecha.

La presencia de *E.coli* sólo ocasionalmente se detectó, y entonces a una concentración de 18 NMP/ 200cm^2 de pasillo al inicio de la cosecha. No parece constituir un problema preocupante dentro de los invernaderos.

Tabla 12

Enterobacteriaceae en polvo de los pasillos de concreto dentro de un invernadero de ventilación superior

		Temporada de la cosecha				
		<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/ 200 cm ²)				
lugar de muestreo		inicio		intermedia		término
		1	2	3	4	5
entrada a la nave del invernadero	mínima		3.1	3.3	<3.1	5.6
	mediana		3.5	4.3	4.8	6.2
	máxima		4.1	5.1	6.1	7
	desv. estándar		3.6	4.6	5.7	3.6
	media		3.7	4.6	5.4	6.5
	No. Muestras	0	7	6	8	8
interior del invernadero	mínima	<3.1	<3.1	3.3	< 3.1	5.2
	mediana	3.6	3.8	4.5	4.6	7
	máxima	4.7	5.3	6.9	6.5	8
	desv. estándar	4.2	4.8	6.4	6.1	7.7
	media	4	4.6	6.1	5.8	7.6
	No. Muestras	8	11	7	11	17

Tabla 13

NMP de *E. coli* en polvo de los pasillos de concreto dentro de un invernadero de ventilación superior.

No. Muestreo lugar		Temporada de la cosecha	
		inicio	término
entrada a la nave del invernadero	mínima	< 0.8	< 0.8
	mediana	< 0.8	< 0.8
	máxima	1.3	< 0.8
	No. Muestras	7	8
interior del invernadero	mínima	< 0.8	< 0.8
	mediana	< 0.8	< 0.8
	máxima	1.3	0.8
	No. Muestras	8	17

VI.3. Fuentes de contaminación en el interior de los invernaderos.

VI.3.1. Materiales utilizados durante la germinación:

Los materiales que entran en contacto con la semilla durante la germinación pueden aportar microorganismos indeseables. Entre los materiales se encuentran: vermiculita, solución hidropónica, encharcamientos, bloque de lana y de manera indirecta la tierra.

Se investigaron cinco grupos de microorganismos indicadores y dos patógenos (Tabla 14). El bloque de lana como materia prima fue una fuente importante de *Enterobacteriaceae*, OCT, hongos y levaduras. La solución hidropónica también aportó ambos grupos Gram negativos. La vermiculita, como materia prima, no contenía microorganismos de nuestro interés.

No se detectó la presencia de *E.coli* ni *Salmonella* (Tabla 15) en la vermiculita y bloque de lana, como materias primas ($< 3 \text{ NMP/g}$), ni en la solución hidropónica. Esta solución se prepara con agua de pozo que ha sido clorada, pero en los tanques de preparación y conservación se encuentra expuesta al ambiente. Sólo se detectó *E. coli* en el 35% de muestras de vermiculita (prueba cualitativa; su concentración es en realidad muy baja, según se observa en la tabla 16). Posiblemente la presencia de este microorganismo de origen intestinal se debe a una inadecuada manipulación por parte del trabajador.

VI.3.2. Trabajadores:

Una de las posibles fuentes de contaminación que entra en contacto directo con el jitomate al momento de la cosecha son las manos de los trabajadores. Esta actividad la realizan, con la mano desnuda. Las manos pueden contribuir en la transferencia de microorganismos desde materiales o alimentos contaminados hacia alimentos inocuos.

La sobrevivencia de bacterias sobre la piel humana depende de factores como la humedad, pH, la presencia de sustancias antibacterianas en las secreciones de la piel y de organismos competitivos. En general, los bacilos Gram negativos son más susceptibles a la desecación que los cocos Gram positivos y

Tabla 14

Cinco grupos microbianos en materiales en contacto con la semilla y plántulas durante la etapa de germinación.

Material	Límites	<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	Hongos	Levaduras	<i>E.coli</i>
		(log ufc)				(NMP)
Vermiculita (a)	Mínimo	< 1	< 1	< 1	< 1	< 3
	Mediana	< 1	< 1	< 1	< 1	< 3
	Máximo	< 1	< 1	1	< 1	< 3
	No. Unidades	4	4	4	4	4
Bloque de lana (a)	Mínimo	3.9	3.6	3.5	< 1	< 3
	Mediana	5.5	4.7	5.1	3.3	< 3
	Máximo	6.9	6.4	6	3.9	< 3
	No. Unidades	4	4	4	4	4
sol. Hidropónica (b)	Mínimo	3	1	< 1	< 1	< 3
	Mediana	3.2	1.1	< 1	< 1	< 3
	Máximo	3.9	1.2	< 1	< 1	< 3
	No. Unidades	3	3	3	3	3
Encharcamientos (b)	Mínimo	6.1	3	3.4	3.1	< 3
	Mediana	6.9	5.4	3.8	3.7	5
	Máximo	7.8	7.7	4	4.6	18
	No. Unidades	14	4	4	4	34

Positividad de *E.coli* en encharcamientos: 35.3 % (12/34).

(a) g.

(b) ml.

Tabla 15

Positividad a *E.coli* y *Salmonella* en materiales en contacto con la semilla y plántulas durante la etapa de germinación.

material	No. muestras	condición	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>
			+ (%)	
vermiculita (a)	21	nueva	0 (0)	0 (0)
	17	húmeda con plántula	6 (35.3)	0(0)
bloque de lana de roca	24	nuevo	0(0)	0(0)
	10	humedecido para usarse	0(0)	0(0)
tezontle	23	expuesto al medio ambiente	0 (0)	0(0)
solución hidropónica (b)	8		0(0)	0(0)
encharcamientos	34		12 (35.3)	0 (0)

(a) 10 g

(b) 10 ml

no sobreviven sobre la piel (Pether y Gilbert .,1971). Diversos reportes refieren que los coliformes pueden recuperarse desde el 3.6% hasta 65%, de manos de individuos sanos y de manejadores de alimentos, respectivamente (Pether y Gilbert .,1971). En un estudio que realizamos con trabajadores que cosechan y empacan jitomate hidropónico se detectó *Enterobacteriaceae* antes y después de lavarse las manos. Las cifras para los cosechadores previo y posterior al lavado fueron de 80 a 85% y de 40 a 55%, respectivamente. Para los empacadores de 90 a 93% y de 67 a 70%, respectivamente. Los niveles de estos microorganismos van desde <1 hasta 4.7 log por trabajador.

La *E.coli* puede estar ausente o detectarse hasta en 38%, de las manos de trabajadores de un laboratorio de salud pública y de las manos de manejadores de alimentos, respectivamente (Pether y Gilbert .,1971). En un estudio, se reportó que el porcentaje de recuperación de *E.coli* a partir de dedos contaminados artificialmente fue del 8.2%, y del 0.5% después de haber estado en contacto con el microorganismo por 5 min y 15 min, respectivamente (Pether y Gilbert.,1971). En nuestro estudio se detectó en el 7.5% y 5.9%, de las manos de cosechadores y empacadores, respectivamente.

Existe información acerca de la facilidad con que *E.coli* y *Salmonella* pueden ser transferidos en varias ocasiones por las manos desde un alimento crudo a otro, o a un cocinado. Un estudio subsecuente muestra que el lavado de manos con jabón y agua, seguido por un secado con toallas de papel, reduce el riesgo de transferencia de microorganismos de la piel hacia los alimentos (Pether y Gilbert .,1971). Aunque la frecuencia de *E.coli* en las manos de los trabajadores no es elevada, si resulta recomendable insistir en un lavado más regular y supervisado a lo largo de las jornadas de trabajo.

VI.4. Fuentes de contaminación externas a los invernaderos

VI.4.1.Esponjas:

Toda superficie que entra en contacto con los alimentos, se convierte en una fuente potencial de contaminación, ya que puede propiciarse la transferencia

de los microorganismos al alimento. Por ello, la eficiencia del tratamiento de lavado y desinfección de estos materiales es primordial en la preservación de la inocuidad de los alimentos.

La empresa prestó especial atención en las condiciones de transporte del jitomate de los invernaderos hacia el área de empacado. El fruto al momento de ser cosechado se colocó en un material plástico, esponjoso y poroso que denominó "esponja". Este material evitó que al ser transportado sufriera daño mecánico por el choque y por la vibración.

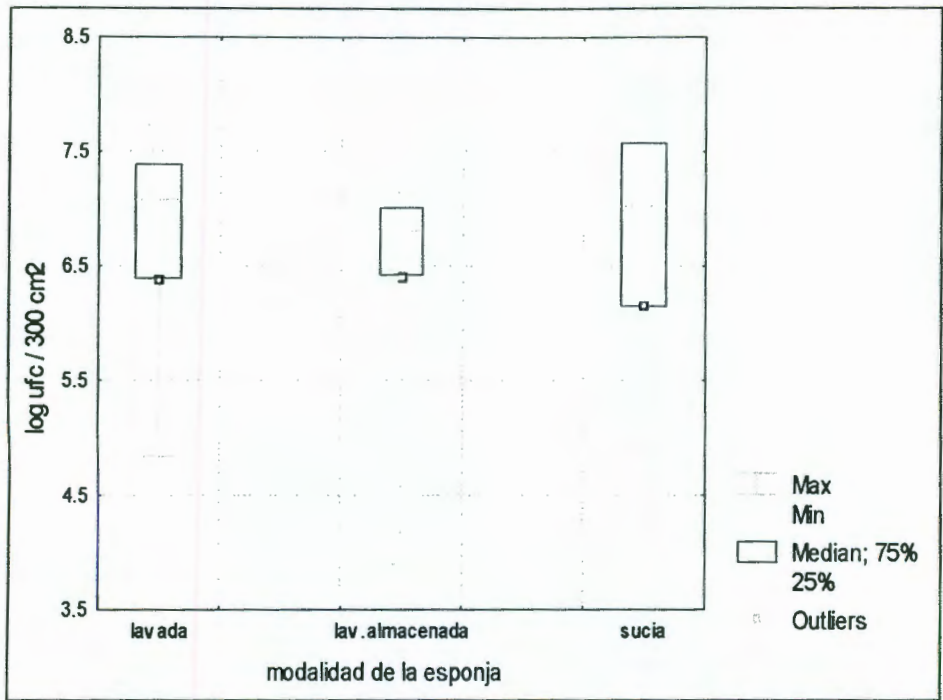
Los términos en los que se realizó el lavado y desinfección de las esponjas no eran motivo de preocupación especial. Su valoración objetiva no parecía considerarse como una necesidad. Esa valoración debía de incluir la definición de los tiempos y temperaturas de los tratamientos, la concentración de detergente y germicida, las condiciones de almacenamiento del material tratado y otras. En la práctica, las medidas y operaciones eran genéricas y vagas. De ahí el interés por las distintas modalidades de esponja: nueva, recién lavada y desinfectada, lavada-desinfectada y almacenada (24-48 h), así como la que fue usada en una jornada de trabajo. Las últimas tres variantes consistieron en esponjas que se sometieron a tratamiento de limpieza y desinfección, y se reutilizaron un sin número de veces. Se determinó el contenido de tres grupos microbianos (Tabla 16). Las poblaciones oscilaron entre 3.9 y 9 log ufc de *Enterobacteriaceae*/ 300 cm² de esponja, y valores ligeramente menores de organismos coliformes totales.

La amplia dispersión de los valores de *Enterobacteriaceae* (Figura 5) en las esponjas sucias y las sometidas a algún tratamiento de limpieza y almacenamiento, no revela alguna diferencia significativa ($p > 0.05$). Lo anterior, puso de manifiesto la deficiencia del proceso de lavado y desinfección. La porosidad del material es un inconveniente para la remoción de microorganismos y la penetración del germicida. Algunos microorganismos poseen la facultad de adherirse activa y tenazmente a las superficies (Mustapha y Liewen, 1989; Zottola y Sasahara, 1994). Este proceso interfiere con la eficiencia del lavado y desinfección aplicado.

Tabla 16

Tres grupos microbianos en esponjas nuevas, y que han sido sometidas a tratamiento de lavado y almacenado. utilizadas durante la cosecha.

Descripción de la muestra		(ufc x 10 E 4 / 300cm2 de esponja)		(NMP/300 cm2 de esponja)
		<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	<i>E. coli</i>
Esponja nueva	mínimo	< 0.0017	< 0.0017	< 17
	mediana	< 0.0017	< 0.0017	< 17
	máximo	0.21	0.003	<17
	No. Muestras	6	6	8
Esponja usada	mínimo	8.1	0.067	< 17
	mediana	1402	76	< 17
	máximo	13000	2500	17
	No. Muestras	24	24	24
Esponja lavada-desinfectada (sin almacenar)	mínimo	7	5	< 17
	mediana	9900	7200	< 17
	máximo	54000	12000	17
	No. Muestras	16	16	16
Esponja lavada-desinfectada (almacenada 24-48 h).	mínimo	0.81	0.22	< 17
	mediana	7800	3400	< 17
	máximo	94000	75000	17
	No. Muestras	16	16	16



no difieren significativamente

Figura 5. *Enterobacteriaceae* en esponjas usadas, lavadas y almacenadas

Ante la ineficiencia del proceso de lavado y desinfección, no es de extrañar la esporádica presencia de *E.coli* y *Salmonella* aún en esponjas recién lavadas y desinfectadas (Tabla 17). Por otro lado, la presencia de *Salmonella* en esponjas nuevas sugieren mecanismos de contaminación cruzada ocasionado por el propio empleado, que maneja indiscriminadamente tanto esponjas sucias como recién lavadas, así como por un almacenamiento inadecuado.

VI.4.2. Trapos sucios y limpios:

En el área de empaçado los jitomates se limpian con un trapo para eliminar el polvo. Este material consiste en una toalla de tela (30 x 30 cm²). Y lo emplea cada trabajador durante 2 a 6 horas; posteriormente se lavan, desinfectan y secan en lavadora y secadora automáticas. Las condiciones de estos tratamientos eran imprecisas e inconstantes.

El estudio se efectuó con trapos sucios y limpios, colectados del área de empaçado. En ellos se determinaron cinco grupos microbianos y dos patógenos. El contenido de *Enterobacteriaceae* nos proporcionó información que podría asociarse con el grado de suciedad residual en el trapo. Los valores de este grupo indicador fueron de < 2 a 3.9 log de ufc/ trapo, con mediana de 2 log ufc/ trapo (Tabla 18). También el contenido de hongos fue significativo. Los resultados revelan claras deficiencias en el proceso de lavado y desinfección o un inadecuado manejo post-lavado. En general, son elevados los niveles de *Enterobacteriaceae*, coliformes totales, hongos y levaduras en los trapos sucios (Tabla 18). Funcionan entonces como una fuente potencial de contaminación hacia el fruto y las diversas superficies que entran en contacto con él. Adicionalmente, se investigó la presencia de *E.coli*, *Salmonella* y *Listeria*; únicamente se detectó *Salmonella* con cifras de 7.5 % entre los trapos limpios y 7.7% entre los sucios.

Los resultados subrayan la necesidad de evaluar e implementar tratamientos de lavado y desinfección efectivos, así como de establecer las condiciones de uso del trapo y manejo ulterior.

Tabla 17

Positividad de *Salmonella* y *E.coli* en esponjas nuevas osucias, lavadas, almacenadas y sin almacenar utilizadas durante la cosecha.

Descripción		(300 cm2 de esponja)	
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
Esponja nueva	+/ n	0 / 12	2 / 12
	(%)	0	16.7
	No. Muestras	12	12
Esponja usada	+/ n	1 / 64	1 / 64
	(%)	1.6	1.6
	No. Muestras	64	64
Esponja lavada-desinfectada (sin almacenar)	+/ n	1 / 48	1 / 48
	(%)	2.1	2.1
	No. Muestras	48	48
Esponja lavada-desinfectada (almacenada 24-48 h)	+/ n	1 / 34	0 / 34
	(%)	2.9	0
	No. Muestras	34	34

Tabla 18

Cinco grupos microbianos en trapos sucios y limpios utilizados en el limpiado del jitomate en el área de empaclado.

Condición del trapo		<i>Enterobacteriaceae</i>	OCT	Hongos	Levaduras	<i>E.coli</i>
		(log ufc / unidad)				(NMP/ unidad)
sucio	mínimo	<2	<2	<2	<2	<5
	mediana	4.5	4.3	4.9	3.7	<5
	máximo	8.8	8.1	6.9	7.8	<5
	media	6.4	7.4	5.8	6.7	
	desv. estandar	6.5	7.7	6.2	7.2	
	No. Muestras	32	26	26	26	26
limpio	mínimo	<2	<2	<2	<2	<5
	mediana	2.3	2.1	2	<2	<5
	máximo	3.9	3.7	3.7	3.3	<5
	media	3	2.8	2.1	2.1	
	desv. estandar	1.6	1.3	2.1	1.6	
	No. Muestras	20	20	20	20	10

Ambos materiales deben ser manejados y almacenados en sitios independientes. La persona que los maneja no debe hacerlo simultáneamente; ha de lavarse y desinfectarse las manos cuando pase de un tipo de material a otro.

VI.4.3. Polvo del piso del área de almacenamiento de jitomates:

A lo largo del almacenamiento se debe tener control sobre el ambiente donde se conserva el alimento. La higiene es un factor primordial que evitará contaminaciones y alargará su vida de anaquel. En esta empresa el fruto se almacena en un área con temperatura controlada (13°). Diariamente se barre el local lo que genera la contaminación del jitomate a través del polvo que se suspende por esta acción y que se mantiene suspendido por efecto de los ventiladores. El jitomate llega a esta zona en cajas de cartón sin cubrir, exponiéndose al ambiente contaminado del cuarto.

En dicho polvo se investigó *E. coli* y *Salmonella* en 14 muestras colectadas a lo largo de un mes. Sólo se detectó *E.coli* pero su presencia fue constante.

VI.5. Monitoreo de las prácticas de trabajo

VI.5.1. El lavado de manos de cosechadores y empacadores de jitomate:

Se planeó un esquema para evaluar la eficiencia del lavado y desinfección de las manos, corrientemente en uso. Los materiales utilizados para esta actividad fueron el agua y el shampoo. Este último contenía compuestos germicidas como sales cuaternarias de amonio o paracloroxilenol, ambos a 200 ppm.

Debido a la escasez de OCT en casi todos los materiales estudiados, se decidió seguir el comportamiento de la familia *Enterobacteriaceae*, lo que se efectuó en 2 ocasiones, bajo tres condiciones de higiene (Tabla 19): antes y después de lavarse, así como después de 3 horas de trabajo. Los recuentos en las manos de los cosechadores, presentaron una variación desde < 1 hasta 4.4 log de ufc/ trabajador antes de lavarse, y de < 0.6 hasta 2.6 log de ufc/ trabajador después de lavarse, con medianas de 1.9 y < 0.6 log de ufc/ trabajador,

Tabla 19

Efecto de tres condiciones de trabajo sobre el contenido de *Enterobacteriaceae* de manos de cosechadores y empacadores de jitomate hidropónico.

		<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/ trabajador)		
		condiciones		
		antes de lavarse	después de lavarse	después de 3 h de trabajo
cosechadores	mínimo	<1	<0.6	<0.6
	mediana	1.9	<0.6	1.3
	máximo	4.4	2.6	3.9
	media	3	1.6	2.4
	desv. estandar	3.6	1.9	3.1
	No. muestras	40	39	40
empacadores	mínimo	<1	<0.6	<0.6
	mediana	2.6	1.7	1.7
	máximo	4.7	3.5	4.1
	media	3.4	2.6	2.8
	desv. estandar	3.9	2.9	3.3
	No. muestras	34	32	40

respectivamente. Las manos de los empacadores antes de lavarse mostraron una carga mayor (Tabla 19), aproximadamente un logaritmo (mediana), respecto a la de los cosechadores. En ambos estudios se observó el abatimiento de hasta 2 log de ufc de *Enterobacteriaceae* por efecto del lavado y desinfección, disminución que resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$) haciendo uso de las medianas (Figura 6). Debe señalarse que dentro de la empresa se hace especial énfasis en la capacitación y adiestramiento de los trabajadores especialmente en lo referente a la práctica de la higiene personal. Las manos de los trabajadores no parecen tener un papel relevante como fuentes de contaminación de microorganismos indicadores objetables hacia los jitomates.

En ambas áreas, interior del invernadero como en la de empacado, presentaron una incidencia de *E.coli* (Tabla 20) discreta y similar en las manos de los trabajadores antes de su lavado.

VI.5.2. La utilización de tapetes sanitarios:

Una práctica muy común en las industrias de alimentos que pretende controlar la contaminación de los zapatos de los trabajadores es la utilización de tapetes sanitarios, los cuales se sitúan a la entrada de cada área de producción. Su utilización en esta empresa más que una protección contra patógenos humanos, persigue un beneficio relacionado con la fitosanidad.

La evaluación de la efectividad de los tapetes sanitarios en la desinfección de las suelas de zapatos, se llevó a cabo comparando el contenido de *Enterobacteriaceae* (Tabla 21) y la presencia de *E.coli* (Tabla 21), en las suelas antes y después del tratamiento.

Se estudio el efecto del agua y de la solución germicida colocada sobre los tapetes. Esta última contenía sales cuaternarias de amonio a una concentración de 800 ppm. Se comparó así el efecto mecánico de remoción (agua) y el poder de desinfección.

Cada condición se estudió sólo en una ocasión. No se detectó diferencia significativa (Figura 7) al comparar medianas (prueba de Kruskal–Wallis) ($p > 0.05$) entre el contenido bacteriano de los zapatos muestreados. Tales resultados eran

Tabla 20

Contenido de organismos coliformes fecales y *E. coli* en las manos de los trabajadores de un invernadero y en el área de empacado.

Área	condición	1° ocasión		2° ocasión	
		OCF	<i>E.coli</i> n/m	OCF	<i>E.coli</i> n/m
invernadero de ventilación superior	antes de lavarse	1 / 20	2 / 20	0 / 20	1 / 20
	después de lavarse	0 / 20	1 / 20	0 / 20	1 / 20
	después de 3 h de trabajo	0 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
empacado	antes de lavarse	1 / 20	1 / 20	2 / 14	1 / 14
	después de lavarse	0/20	0/20	0/12	0/12
	después de 3 h de trabajo	0/20	0/20	0/20	0/20

Tabla 21

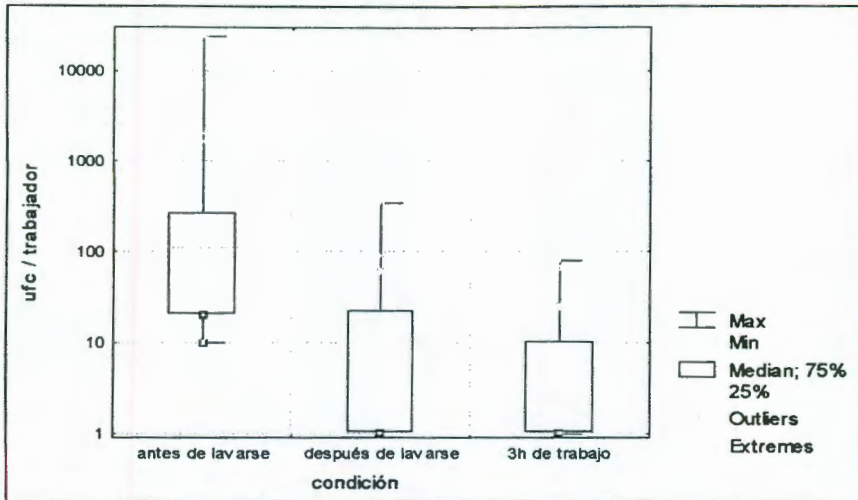
Enterobacteriaceae y *E.coli* en suelas de zapatos de trabajadores que pisan o no el tapete sanitario.

			<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. coli</i>	
			(log ufc/ suela)	/n	%
agua	sin pisar	mínimo	4.8	21/ 30	70
		mediana	6.3		
		máximo	7.7		
		media	6.9		
	pisando	mínimo	4.7	23/ 30	76.6
		mediana	6.7		
		máximo	8.1		
		media	7.1		
SCA (800 ppm)	sin pisar	mínimo	3.7	21/ 30	70
		mediana	5.7		
		máximo	8.1		
		media	5.8		
	pisando	mínimo	4.3	24/ 30	80
		mediana	5.4		
		máximo	8.1		
		media	5.2		

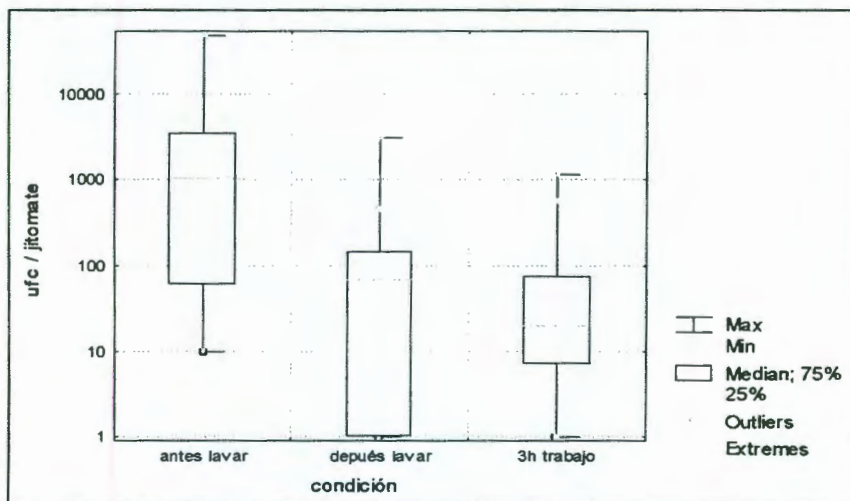
Nota:

SCA: sales cuaternarias de amonio.

No. Muestras: 30 trabajadores/ tratamiento

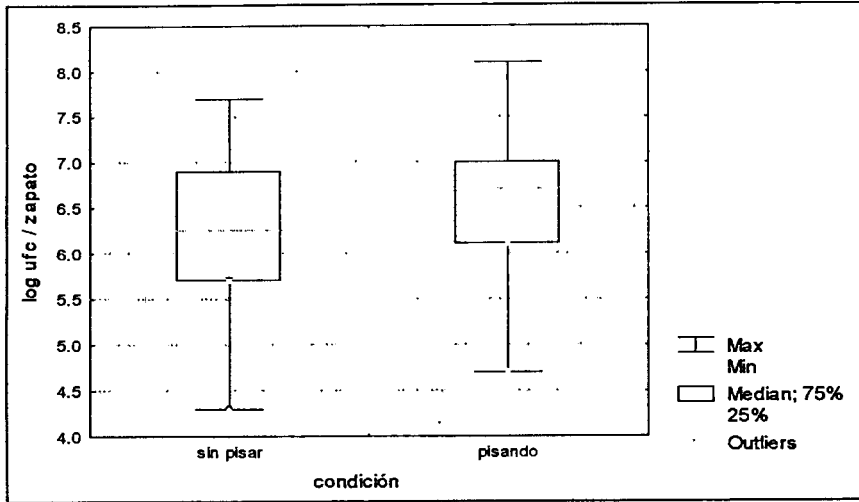


COSECHADORES
(difieren significativamente)

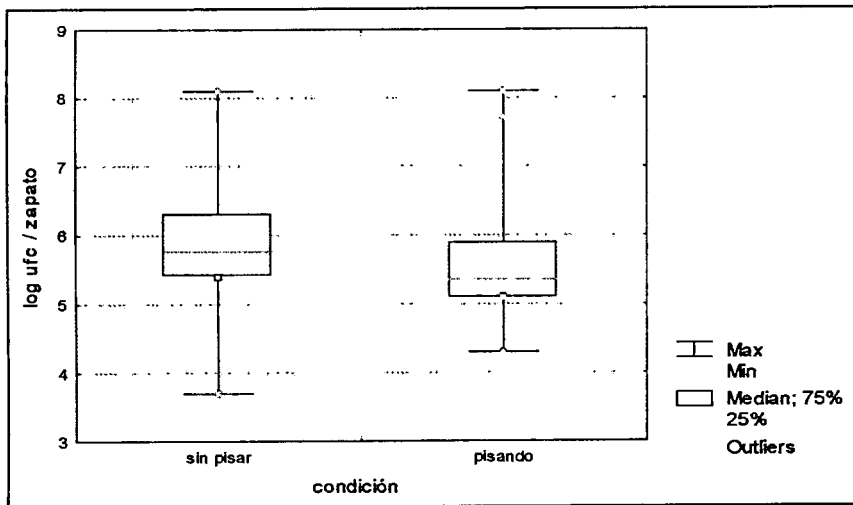


EMPACADORES
(difieren significativamente)

Figura 6. Efecto de tres condiciones de trabajo sobre el contenido de *Enterobacteriaceae* en manos de cosechadores y empacadores de jitomate hidropónico.



TAPETE CON AGUA
(no difieren significativamente)



TAPETE CON 800 PPM DE SCA
(no difieren significativamente)

es cuaternarias de amonio.

7. *Enterobacteriaceae* en las suelas de zapatos de trabajadores, cuando se pisa o no el tapete sanitario (800 ppm de sal cuaternaria de amonio).

de esperar; la inactivación de los microorganismos en las suelas, no se presenta en forma inmediata al contacto con la solución germicida, y menos aún ante el elevado contenido de materia orgánica que trae consigo la suela.

El ambiente rural o semirural en el que viven la mayoría de los trabajadores, incrementa la probabilidad de encontrar materia fecal diseminada en las diversas superficies que entran en contacto con las suelas de los zapatos. La detección de un indicador de contaminación fecal adquiere más importancia, si se considera la fuente de contaminación más constante y activa hacia los invernaderos.

La positividad de *E.coli* (Tabla 21) fue de 60-70% en suelas que no pisaron el tapete y de 60-80% en las que si lo pisaron. La presencia de *E.coli* puede no ocurrir en ambos zapatos de la misma persona; alrededor del 43-53% de las personas resultaron positivas en ambos zapatos, en 13-26% sólo un zapato resultó positivo, en tanto que del 3-23% resultaron negativos en ambos zapatos.

Es evidente que los zapatos del trabajador tienen una contribución importante en la introducción de materia fecal a los invernaderos. Esa contaminación difícilmente puede ser abatida por la utilización de un tapete sanitario. Su función en el control de la contaminación fue desmerecida.

VI.5.3. Tratamiento térmico para desinfectar esponjas

La detección de *Salmonella* en las esponjas que estuvieron involucradas en la cosecha reveló la necesidad de aplicar un tratamiento terminal. Este tratamiento no debe afectar el carácter esponjoso del material. Por esta razón se probaron diversos tratamientos térmicos (65°/10 min, 70°/5 min, 70°/10 min, 75°/5 min) tan sólo se sumergió la esponja en agua. Así ocurrió en efecto, en todos los casos, y por su acentuado efecto antibacteriano constituyen una alternativa confiable para abatir hasta 5 logaritmos de *Enterobacteriaceae* (Tabla 22). El material se libera prácticamente de microorganismos (< 25 ufc de *Enterobacteriaceae* / 300 cm² de esponja).

Tabla 22

Inactivación de *Enterobacteriaceae* en esponjas sucias sometidas a 4 tratamientos térmicos con agua.

tratamiento térmico		<i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/ 300 cm ² de esponja)
sin tratamiento	mínimo	5.4
	mediana	6.3
	máximo	6.8
	n	4
65°/10'	mínimo	<1.4
	mediana	<1.4
	máximo	<1.4
	n	4
70°/5'	mínimo	<1.4
	mediana	<1.4
	máximo	<1.4
	n	4
70°/10'	mínimo	<1.4
	mediana	<1.4
	máximo	<1.4
	n	4
75°/5'	mínimo	<1.4
	mediana	<1.4
	máximo	<1.4
	n	4

VI.5.4. La práctica de limpiado de jitomate en el área de empackado:

Ordinariamente, los jitomates que llegan al área de empackado se frotan con un trapo asperjado con solución germicida (hipoclorito de sodio, 200 ppm) durante 2-3 seg. Su finalidad es proveer una mejor presentación del jitomate. Atiende variables como volumen y lapso de tiempo entre aspersiones de la solución germicida al trapo, así como el período de uso del trapo (condición subjetiva en la que cada trabajador determinó cada cuándo era necesario cambiar el trapo sucio por uno limpio). Estas variables no han sido estandarizadas en la empresa; se aplican con el criterio de cada trabajador.

Una cierta proporción (entre 30 y 40%) de los jitomates fueron sometidos a frotamiento con trapos humedecidos con solución de cloro activo (100 ppm).

Se realizó el muestreo a lo largo del proceso, en dos ocasiones.

Las muestras se tomaron después de 1 y 2 h de iniciado el trabajo, y consistió en jitomates limpiados, trapos y manos de los trabajadores. Los resultados demostraron que tanto el trapo como las manos después de la primera hora de trabajo se convirtieron en una fuente de contaminación (Tabla 23). La carga microbiana que pueden llegar a transferir sería de casi 6 log. El trapo recibe y aporta una diversidad de microorganismos. Sin embargo, no se observó un incremento significativo en el contenido de *Enterobacteriaceae* del jitomate limpiado con respecto al no limpiado (muestreado en el área de empackado). Aunque se mejora su presentación, implica un riesgo potencial de contaminación.

VI.5.5. El lavado de trapos empleados para limpiar los jitomates:

El procedimiento de lavado de trapos consiste en: blanquear, lavar, enjuagar y secar.

En el blanqueado se sumergen los trapos sucios en una solución germicida de hipoclorito de sodio (700-800 ppm). Durante 4 horas se mantienen en remojo y sin agitación y se transfieren a una lavadora donde se agregan dos soluciones que contienen como agente activo: peróxido de hidrógeno y nonilfenol etoxilado. El lavado se extiende por 10 minutos y se transfieren entonces a otra lavadora donde se enjuagan con solución de hipoclorito de sodio (150-160 ppm) por 10 min.

Tabla 23
Enterobacteriaceae en jitomates, trapos y manos de trabajadoras durante el proceso de limpiado en el área de empackado
 (resumen de 2 estudios)

tiempo de uso (hr)	material	<i>Enterobacteriaceae</i>			desv.estandar	no.muestras
		(log ufc)				
		mínimo	mediana	máximo		
1	jitomate	<0.9	2.4	6.7	6	16
	trapo sucio	3.7	5.8	7.6	7	16
	manos	<1.3	3.9	5.5	4.9	16
2	jitomate	<0.9	2.4	5.8	4.2	14
	trapo sucio	<2.2	5.4	7.2	6.7	15
	manos	1.9	3	4.3	3.7	15

El exprimido es manual y el secado se aplica en una máquina secadora que mantiene aproximadamente a 48° (temp. promedio). El trapo alcanzó una temperatura promedio de 42°, por un lapso de 1.3 h. El trapo seco se almacena en bolsas de plástico. Por último, se traslada al área de empacado.

El lavado de los trapos sobre el contenido de organismos coliformes (Tabla 24), muestra que entre los trapos sucios y los recién lavados-secados existe diferencia significativa en términos de las medianas. Es posible concluir que el proceso de lavado resulta eficiente para la remoción de la carga microbiana del trapo sucio (Tabla 24). Lo importante es destacar la presencia de coliformes totales en algunos trapos que habían sido sometidos al proceso de lavado, pero que se encontraban almacenados (colectados en el área de empacado) (Tabla 24), evidencia clara de una contaminación post-lavado.

La contaminación cruzada no se descarta, debido a que la persona encargada del área de lavado maneja indistintamente los trapos sucios y limpios. Adicionalmente hay que anotar lo inadecuado de su almacenamiento.

Se investigó la presencia de *E.coli* y *Salmonella* en los trapos (Tabla 25). Sólo se detectó *E.coli* en el 3.2 % de 31 trapos sucios. En los recién lavados-secados ambos microorganismos estuvieron ausentes.

VI.6. Evaluación de la técnica de la USDA para el aislamiento de *Salmonella* spp

Salmonella spp. fue aislada a partir de diversas muestras cuando se siguió la técnica de la USDA: preenriquecimiento en CL y enriquecimiento en CSC Y CTT. El aislamiento se efectuó en ASB y AVB, que son los más comúnmente utilizados. La sensibilidad de la técnica se incrementó incluyendo los medios de XLD y SS.

El CTT es más selectivo que el CSC, y puede llegar a tener un efecto inhibitorio contra *Salmonella* (Vanderzant y Ssplittstoesser, 1992). En la mayoría de las placas de medios selectivos (AVB, ASB, XLD, SS) previa transferencia del CTT, tanto la presencia de colonias sospechosas del patógeno como el desarrollo

Tabla 24

Persistencia de coliformes en trapos, utilizados en el área de empaçado, sometidos a lavado-desinfección (resumen de tres estudios)

condición	descripción de muestra	n	organismos coliformes (ufc x 10 E 3)			desv. estándar
			mínimo	mediana	máximo	
sucio (una jornada de trabajo)	trapo	31	< 0.1	1000	65000	14000
recién lavado y secado	trapo	30	<0.025	< 0.025	<0.025	0
lavado, secado y almacenado (área de empaçado)	trapo	30	<0.025	<0.025	0.35	0.055

Tabla 25

Positividad a *E.coli* y *Salmonella* en trapos sucios, recién lavados y secados, y secados y almacenados (resumen de tres estudios)

condición	descripción de muestra	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
		+ / n (%)	
sucio (una jornada de trabajo)	trapo	1/31 (3.2)	0/31 (0)
recién lavado y secado	trapo	0/30 (0)	0/30 (0)
lavado, secado y almacenado (área de empacado)	trapo	0/30 (0)	0/30 (0)

de la flora asociada fueron nulos. Los medios de aislamiento más eficientes fueron el medio XLD seguido del ASB.

Se confirma el beneficio de recurrir a dos medios selectivos de aislamiento y a dos caldos de enriquecimiento como mínimo, para incrementar la mayor sensibilidad de la técnica y evitar resultados falsos negativos.

Se analizaron así 289 muestras diversas, de las cuales 43 resultaron positivas (Tabla 26). La mayoría de las veces el aislamiento se logró en ASB y XLD.

Por lo anterior, se optó por investigar la *Salmonella* a través de la vía CSC, ASB y XLD, cuando el número de muestras se incrementó ya que resultaba muy laborioso analizar 1603 muestras por ambas vías (CSC Y CTT con los 4 medios selectivos). Esta vía permitió la mayor recuperación de *Salmonella* a partir de jitomate.

En un estudio preliminar se probó la sensibilidad de la técnica, logrando la recuperación del patógeno con ambas vías (CTT Y CSC y los 4 medios selectivos). Se logró una recuperación cualitativa a partir de muestras de jitomate que se habían inoculado con aproximadamente 5 células / muestra.

Tabla 26

Recuperación de *Salmonella* spp. de diversas muestras en dos caldos de enriquecimiento (CSC, CTT) y cuatro medios selectivos (AVB,ASB,XLD,SS)

caldo de enriquecimiento			positivas (%)							
			CSC				CTT			
medio de aislamiento			AVB	ASB	XLD	SS	AVB	ASB	XLD	SS
material	No. Muestras analizadas	No. Muestras positivas								
tierra	82	11	3 (27.3)	7 (63.6)	8 (72.7)	7 (63.6)	3 (27.3)	0 (0)	1 (9.1)	1 (9.1)
esponja	39	4	0 (0)	2 (50)	4 (100)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	1 (25)
jitomate	138	23	7 (30.4)	16 (69.5)	21 (91)	13 (56.5)	5 (21.7)	4 (17.4)	5 (21.7)	2 (8.7)
trapos	30	5	0 (0)	1 (20)	4 (80)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
total	289	43								

nota: 289 muestras analizadas por estas vías , resultando 43 positivas.

VI. 7. Microbiología del aire

El aire es considerado una fuente importante de contaminación para transportar microorganismos provenientes del suelo. Las turbulencias naturales en la atmósfera cargan al aire de microorganismos cuya naturaleza está determinada por los materiales de donde se liberan. La naturaleza (bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos) y abundancia de los microorganismos es muy variable (Fernández, 2000).

En esta investigación se generó información acerca de la microbiología del aire dentro y fuera de los invernaderos, como fuente de microorganismos al jitomate. Se ha reportado (Hedrick y Heldman, 1969) que dentro de las plantas procesadoras el contenido microbiano en el aire se encuentra muy afectado por la circulación de personas que transitan cerca de los sitios donde se ha instalado un muestreador de aire. En dicha comunicación se mencionan las siguientes fuentes de aportación de microorganismos al aire en orden decreciente: tráfico humano, ropa del personal, polvo, aire exterior que rodea al edificio y sistemas de ventilación.

Debe advertirse que las poblaciones de microorganismos en la atmósfera se modifican fácilmente y de manera transitoria cuando se generan corrientes de aire. Los resultados de los monitoreos que se realizaron en las diferentes áreas de trabajo revelaron sin embargo, que en general el aire ambiental no constituyó una fuente significativa de microorganismos, en tanto las actividades que ahí se llevaban a cabo no se vean perturbadas por operaciones como excesivo movimiento del aire, barrer, o descargar materiales que liberaran cantidades considerables de polvo.

VI.7.1. Área de almacenamiento:

En el área de almacenamiento la temperatura se mantiene mediante un sistema de enfriamiento a base de ventiladores. Estos están situados en la parte superior del área. El aire se muestreo antes y después de barrer a dos niveles de altura (nivel bajo 10cm y nivel alto 1.5 mt).

Los ventiladores dispersan las partículas de polvo, pero también contribuyen a homogenizar la carga microbiana en toda el área. En efecto antes de barrer se detectaron diferencias en las poblaciones de microorganismos según altura en la que se coloca el muestreador. La diferencia no se presentó después de barrer.

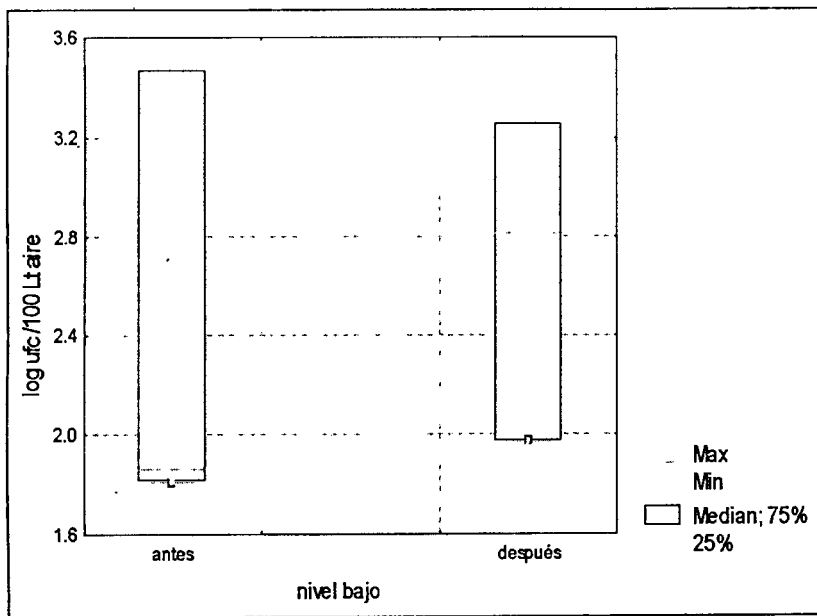
Los recuentos de microorganismos monitoreados a 10 cm del piso no mostraron diferencia significativa antes y después de barrer (Figura 8a), lo que no ocurrió cuando el muestreo se realizó a 1.5 mts de altura (Figura 8b).

Al observar que no existió diferencia significativa entre ambos niveles de altura después de barrer el área de almacenamiento, se optó por realizar los muestreos en el nivel alto de la periferia (7 zonas) y en el centro (Figura 9a). No se presentó diferencia en el contenido microbiano ($p > 0.05$), independientemente del lugar donde se muestreo.

VI.7.2. Área de Empacado:

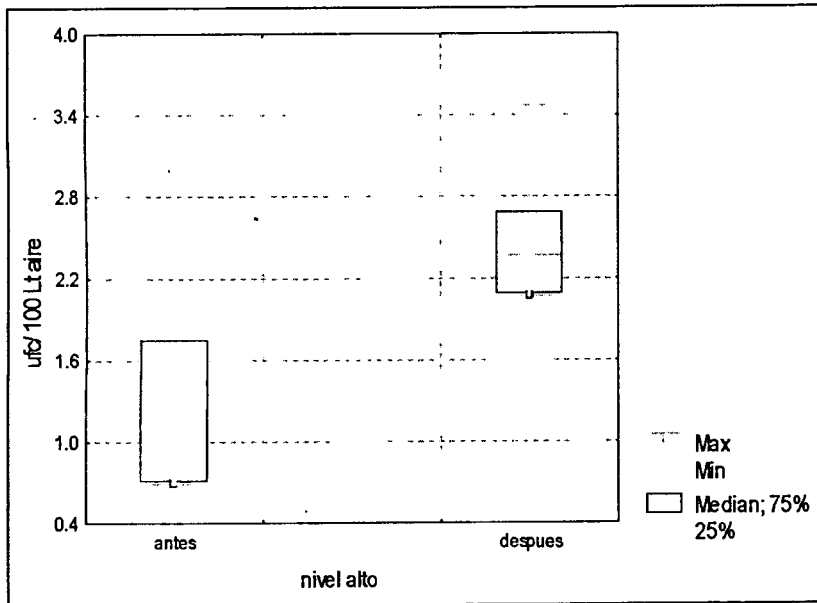
El muestreo en esta área se realizó al cabo de 1 hora del inicio de las actividades, y a un nivel de 1.5 mts en 9 zonas del interior del cuarto de empacado. El muestreador se ubicó a la entrada, entre los pasillos donde se empaca, y en el centro, donde se encuentra la banda transportadora del jitomate empacado. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en el contenido microbiano entre las diferentes zonas, ni aún de la puerta de acceso al montacargas (Figura 9b). Aunque el área de empacado se consideró el lugar con mayor actividad, el contenido microbiano no difirió mucho del observado en otras áreas.

En condiciones ordinarias de trabajo la población de microorganismos mostró límites entre 1.5 y 2.8 log ufc/ 100 Lt de aire con mediana de 2.2 log ufc/ 100 Lt de aire.



	condición	
	antes	después
	BMA	
	(ufc/ 100 Lt aire)	
mínimo	65	95
mediana	73	647
máximo	3000	3000
media	1046	1371.2
desv. estándar	138.2	1344.6
No. Muestras	3	5

no difieren significativamente



	condición	
	antes	después
	BMA	
	(ufc / 100 Lt aire)	
mínimo	5	120
mediana	56	232
máximo	57	3000
media	39.3	864
desv. estándar	24.3	1091.1
No. Muestras	3	5

difieren significativamente

8. Bacterias mesófilas aerobias en aire al nivel del piso (a) y a 1.5 mts de altura (b), antes y después de barrer dentro del área de almacenamiento de jitomate hidropónico.

VI.7.3. Área de lavado esponjas:

El área de lavado de esponjas está comunicada con el área de empaqueo mediante una puerta que permanentemente esta abierta. En este sitio se lavan las esponjas sucias y también sirve de almacén de las mismas.

Se muestreó el aire junto a la puerta, y a las tres estanterías, donde se encuentran las esponjas sucias, recién lavadas-desinfectadas y lavadas-desinfectadas almacenadas, respectivamente.

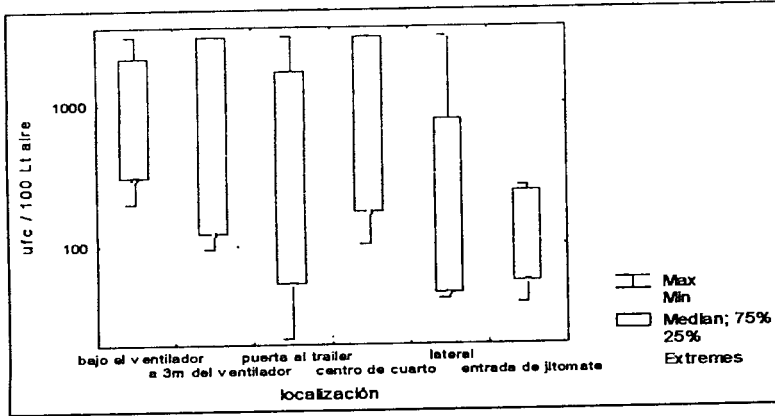
Se esperaba un mayor contenido de BMA en el aire de la zona donde se manipulan las esponjas sucias, pero una vez analizados los resultados no se detectó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre medianas (Figura 9c).

VI.7.4. Invernaderos:

Los invernaderos fueron las áreas con mayor control en el ambiente, un factor importante en el control es el tipo de instalación implementado. El muestreo se realizó en dos invernaderos uno de ventilación superior y otro de ventilación lateral. Los muestreos se realizaron 3 horas después de que los trabajadores iniciaron su jornada de trabajo. Se comenzaba el muestreo en el centro de cada parcela a dos niveles de altura, con respecto al suelo (Figuras 10a-10b). No se detecto diferencia significativa en función del nivel de altura. Según la localización sólo se detecto diferencia entre zonas del invernadero de ventilación lateral (Figura 11a) y no en el de ventilación superior (Figura 11b). Esto ocurrió por un efecto directo del aire sobre dos laterales del invernadero. Esta condición origino una ventilación más activa, pues se generan corrientes de aire. En cambio, la ventilación por la parte superior es más pasiva.

Los contenidos microbianos tendieron a ser más elevados en la zona de empaque y almacén frío que en los invernaderos. Esto guarda relación con la intensidad de la actividad de los trabajadores en cada localidad.

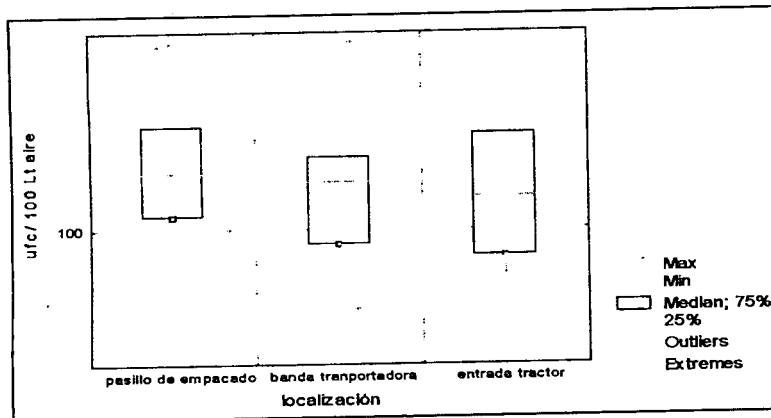
(a)



	BMA (ufc / 100 Lt aire)
mínimo	18
mediana	285
máximo	3000
media	800
desv. Estándar	1063.5
No. datos	57
No. Muestras	5

no difieren significativamente

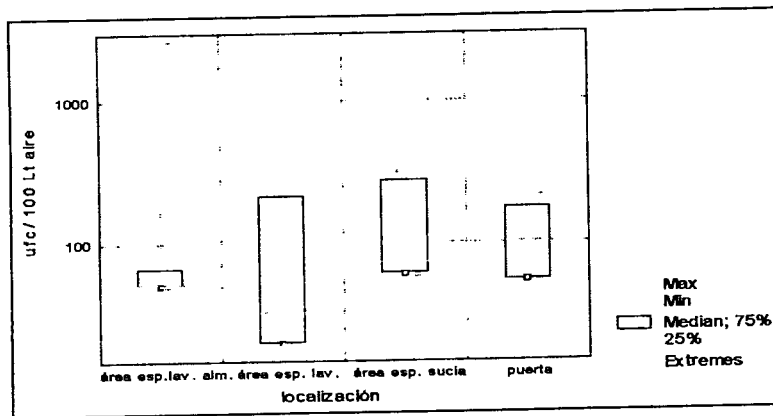
(b)



	BMA (ufc/100 Lt aire)
mínimo	31
mediana	163
máximo	652
media	209
desv. Estándar	145.2
No. datos	82
No. Muestras	6

no difieren significativamente.

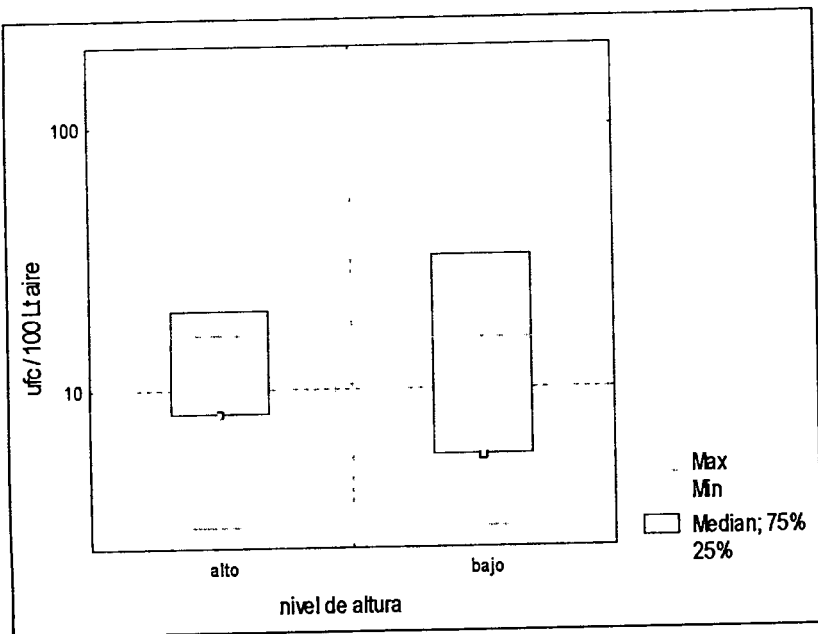
(c)



	BMA (ufc/ 100 Lt aire)
mínimo	20
mediana	61
máximo	2628
media	286
desv. Estándar	654.9
No. datos	15
No. Muestras	4

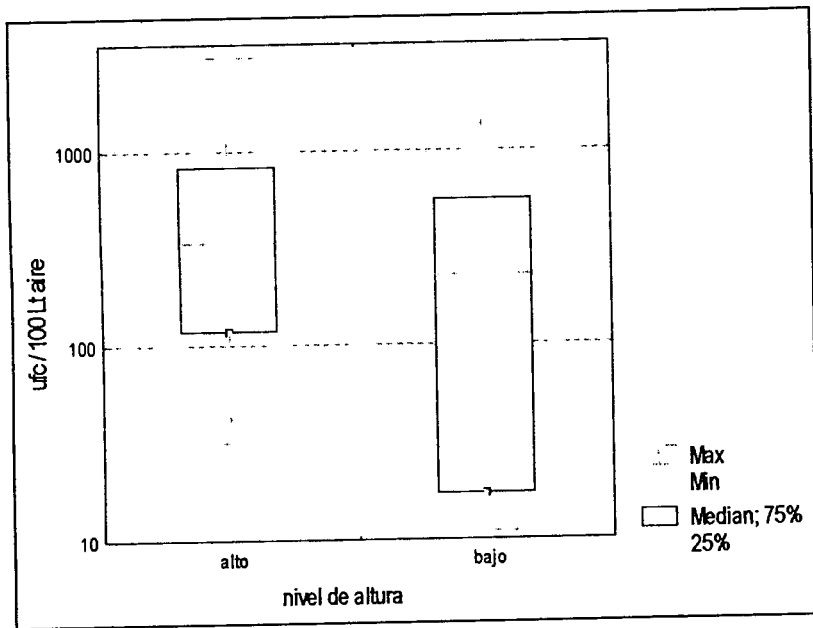
no difieren significativamente

Figura 9. Bacterias mesófilas aerobias en aire colectado de diversas zonas dentro del área de almacenamiento (a), de empaqueo (b) y de lavado de esponjas (c).



	alto	Nivel bajo
	BMA (ufc/100 Lt aire)	
mínimo	3	5
mediana	16	24
máximo	181	63
media	28.6	27.6
desv. estándar	44.25	19.26
No. datos	15	16
No. Muestras	8	8

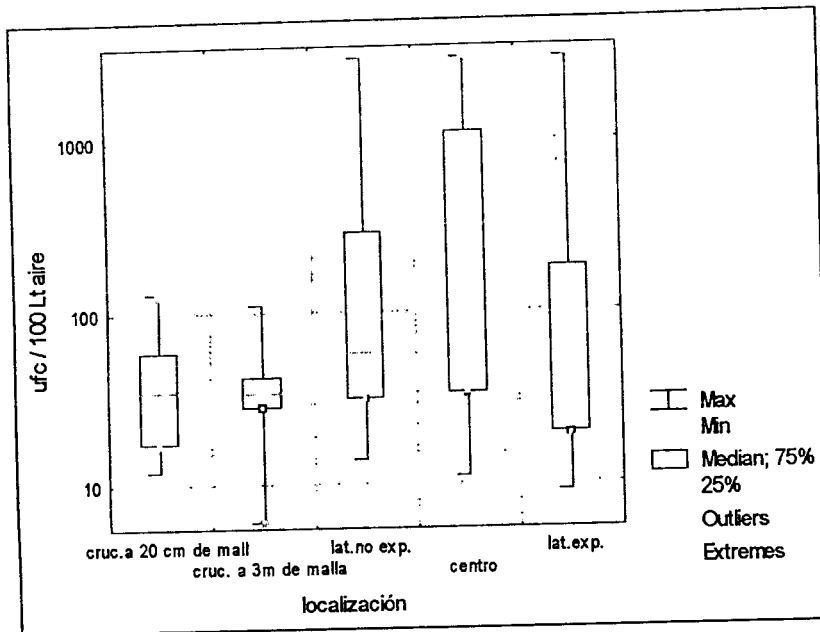
no difieren significativamente



	alto	Nivel bajo
	BMA (ufc/ 100 Lt aire)	
mínimo	32	11
mediana	335	225
máximo	3000	3000
media	1147.5	765
desv. estándar	1210.2	1134
No. Muestras	10	10

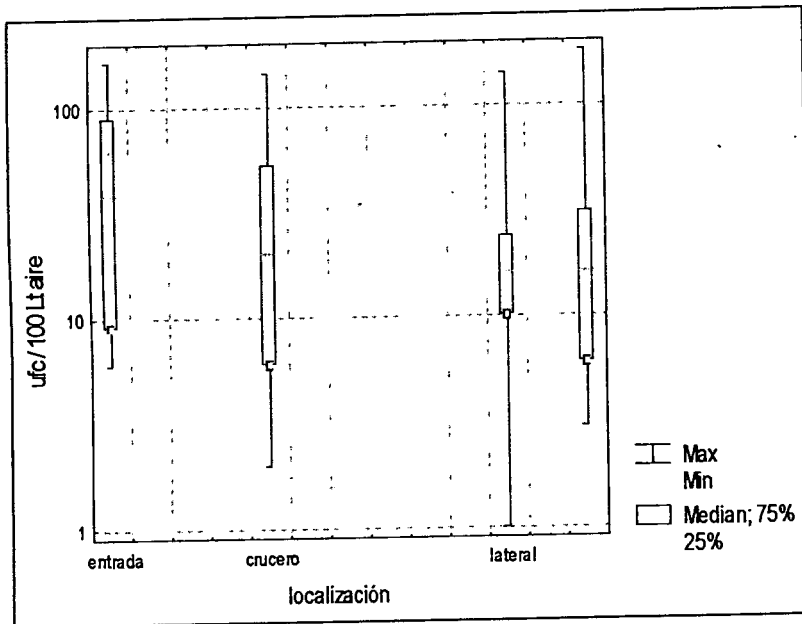
no difieren significativamente.

ra. 10. Bacterias mesófilas aerobias en aire a dos niveles de altura en el centro de un invernadero de ventilación superior (a) y ventilación lateral (b).



BMA (ufc/100 Lt aire)	
mínimo	6
mediana	44
máximo	3000
media	381
desv. Estándar	862.6
No .datos	75
No. Muestras	9

difieren significativamente



BMA (ufc/100 Lt aire)	
mínimo	1
mediana	18
máximo	181
media	32
desv. Estándar	38.9
No. Muestras	9

no difieren significativamente.

a 11. Bacterias mesófilas aerobias en aire de diversas zonas dentro del invernadero de ventilación lateral (a) y ventilación superior (b).

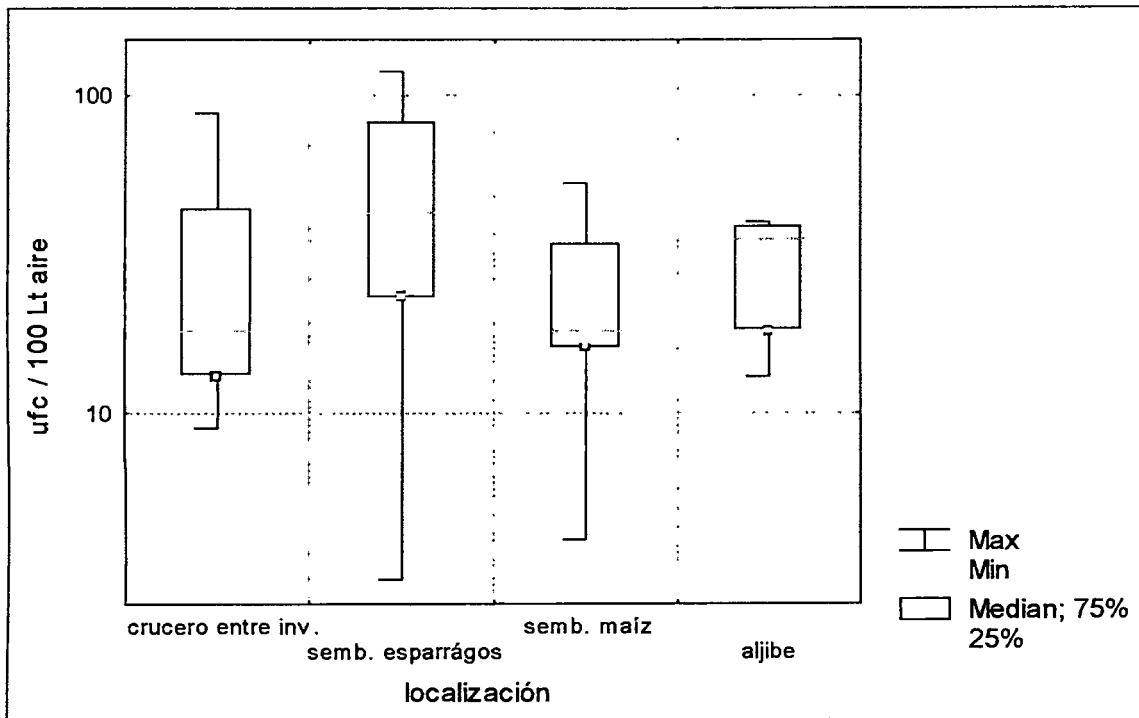
VI.7.5. Ambiente externo:

Con la finalidad de conocer la variabilidad del contenido de BMA según la zona de la periferia exterior de los invernaderos y su influencia sobre el ambiente interior de los mismos, se muestreo aire de 3 zonas alrededor de ambos invernaderos. El invernadero de ventilación superior colinda con dos campos de cultivo y un invernadero de ventilación lateral. El invernadero de ventilación lateral esta rodeado por invernaderos del mismo tipo y un aljibe descubierto que expone el agua al medio ambiente.

A pesar de la diferencia física entre zonas no se presento diferencia significativa en el contenido de BMA en el exterior de ambos invernaderos. Se presentaron valores límites entre 0.5 y 3.5 log ufc/ 100 Lt de aire. En general, se puede inferir cierta homogeneidad microbiana entre las zonas que rodean a ambos invernaderos (Figura 12).

Se esperaba que difiriera el contenido de BMA del exterior del invernadero con respecto al interior, pero eso no ocurrió. No se detectó diferencia significativa ($p>0.05$) entre el exterior y el interior de ambos tipo de invernadero (Figura 13).

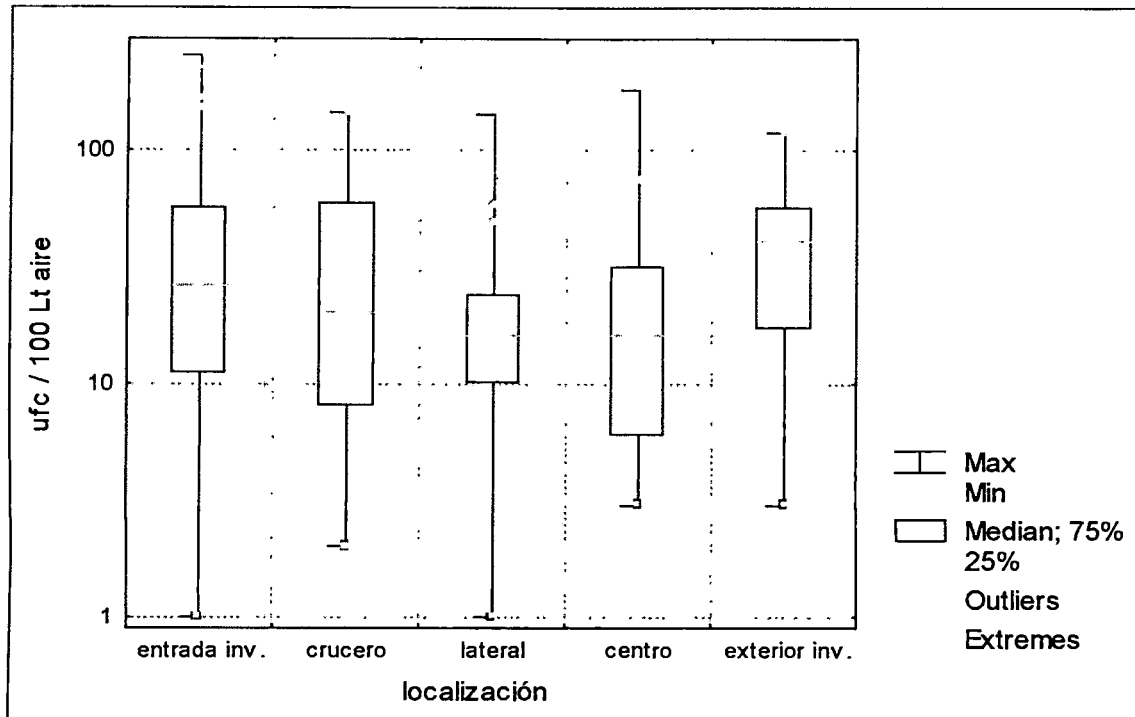
Es importante resaltar la similitud del contenido de BMA en dos ambientes tan distintos. En el interior del invernadero se mantiene una amplia vigilancia y control de las instalaciones, y en el exterior la exposición a una diversidad de factores modifican drásticamente el ambiente.



	BMA (ufc/100 Lt aire)
mínimo	3
mediana	35
máximo	3000
media	240.1
desv. Estándar	685.7
No. datos	126
No. Muestreos	7

no difieren significativamente.

Figura 12. Bacterias mesófilas aerobias en aire de diversas zonas externas a los invernaderos.



	BMA (ufc/ 100 Lt aire)	
mínimo	1	no difieren significativamente.
mediana	18	
máximo	185	
media	32.5	
desv. estándar	36.5	
No. datos	152	
No. Muestreos	9	

Figura 13. Bacterias mesófilas aerobias en aire colectado en 4 localidades del interior y del exterior de un invernadero de ventilación superior.

VI.8. Microbiología de jitomates del comercio.

Los microorganismos con mayor significado epidemiológico asociados a frutas y verduras, son los de origen fecal. En muchos países (principalmente los industrializados), no se recurre a la aplicación de estiércol como fertilizante, ni se practica el fecalismo al aire libre o el riego con aguas residuales crudas o mal tratadas. Todas estas acciones son reconocidos mecanismos de contaminación de verduras crudas (Beuchat., 1995). En nuestro país, todavía se observan estas prácticas. Es de esperar, que las verduras puedan ser vehículo de microorganismos patógenos que se encuentren participando en brotes de ETAs, si bien no se cuenta con información al respecto.

Como una extensión al estudio de la microbiología del jitomate hidropónico, se incluyó el de jitomates maduros que se expenden en mercados públicos y supermercados. El producto se colectó durante las épocas calurosa, lluviosa y fría del año.

Dentro de la época calurosa no se presentó diferencia significativa en el contenido de *Enterobacteriaceae* al contrastar ambos tipos de expendio (Figura 14a). Es importante destacar que la apariencia general de los jitomates de ambos lugares fue muy similar y con un buen grado de madurez. Los jitomates de mercado eran expuestos para su venta en cajas de madera de apariencia poco higiénica. Los jitomates en los supermercados pueden llegar a ser limpiados por empleados del propio lugar. Esto confiere mejor apariencia. Se depositan en contenedores de madera en mejores condiciones de limpieza.

En contraste el contenido de *Enterobacteriaceae* difirió significativamente ($p < 0.05$) entre ambos tipos de expendio tanto en la época lluviosa (Figura 14b) como en la fría (Figura 14c). La carga microbiana fue mayor en las muestras colectadas en supermercados.

Los resultados de la microbiología de los jitomates muestreados en mercados y supermercados están resumidos en la tabla 27.

En realidad, es difícil proponer factores específicos ambientales, de manejo comercial e incluso de naturaleza microbiana, para explicar la influencia del clima

Tabla 27

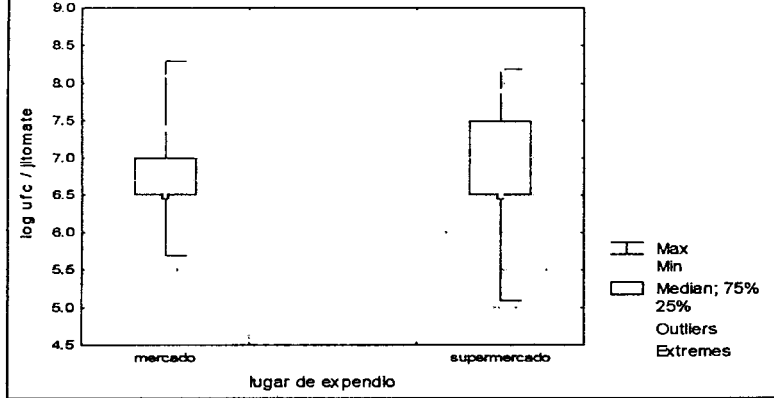
Cinco grupos microbianos en jitomate "saladette" colectado en mercados y supermercados en período frío, caluroso y lluvioso.

Lugar	Época		<i>Ebc a</i>	CT a	H a	L a	<i>E.c b.</i>
Mercado Público	fría	mín.	2.2	< 0.5	2.6	3.3	< 0.5
		med.	4.4	2.5	4.2	4.6	< 0.5
		máx.	7	5.4	4.7	5.3	6
		No. Muestras	30	15	15	15	30
	calurosa	mín.	5.7	2.4	4.2	4.4	< 7
		med.	6.7	4.9	5	5.3	< 7
		máx.	8.3	6.4	6.3	7.7	220
		No. Muestras	15	15	15	15	15
	lluviosa	mín.	6				
		med.	6.8				
		máx.	7.8				
		No. Muestras	12				
Supermercado	fría	mín.	3.2	< 0.9	2.1	3.1	< 0.5
		med.	5.7	4.6	3.2	4.1	< 0.5
		máx.	7.5	6.1	4.2	6.1	6
		No. Muestras	30	15	15	15	30
	calurosa	mín.	3.1	2.1	3.4	3.9	< 7
		med.	5.9	5.7	5.4	6.1	< 7
		máx.	8.2	7	6.9	7.9	> 950
		No. Muestras	15				
	lluviosa	mín.	6.9				
		med.	8				
		máx.	8.9				
		No. Muestras	12				

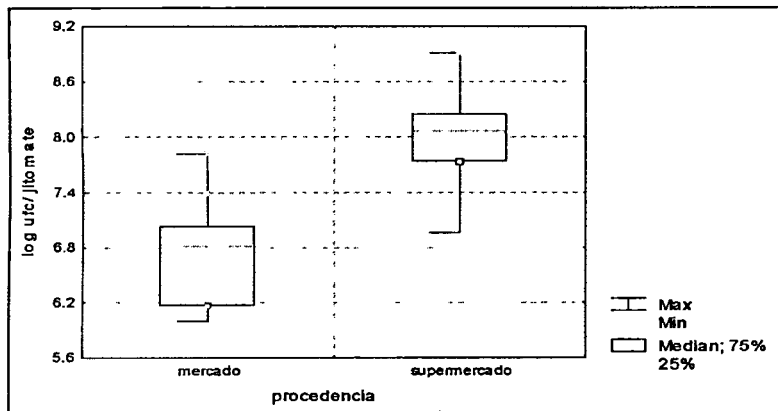
a log₁₀ ufc/ jitomate

b NMP/ jitomate.

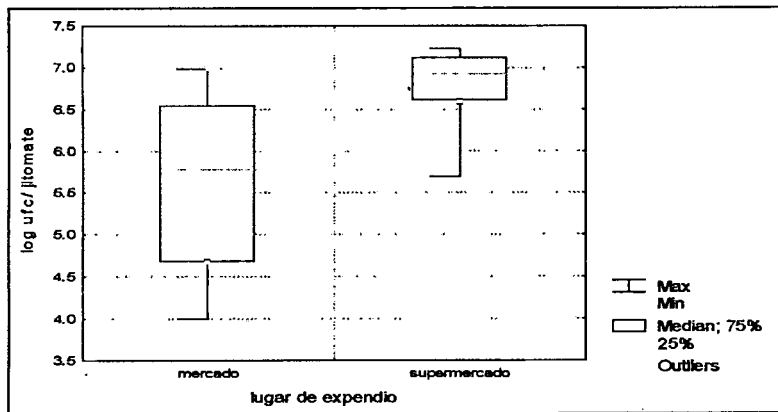
* Cada muestra contiene 6 jitomates.



no difieren significativamente



difieren significativamente



difieren significativamente

14. *Enterobacteriaceae* en jitomate "saladette" muestreado en mercados y supermercados en período caluroso (a), lluvioso (b) y frío (c).

en la distribución y abundancia de microorganismos en los jitomates de una y otra fuente. Las causas y factores determinantes del problema podrían encontrarse a través de estudios especialmente diseñados para ese fin.

Otra variedad de jitomate analizado fue el "bola". Sólo se obtuvieron muestras en la época lluviosa (Tabla 28). Presentó resultados similares a los obtenidos para el jitomate "saladette". Se detectó diferencia significativa ($p < 0.05$) según el lugar de expendio (Figura 15). Se obtuvo una mediana ligeramente mayor en muestras colectadas de supermercados que en las de mercados. De la misma forma la apariencia general del jitomate de supermercado, era más deplorable. Presentó mayor grado de deterioro así como una apariencia sumamente grasosa.

El efecto de la época del año se determinó al comparar los datos obtenidos de muestras del mismo lugar de expendio pero que diferían en la época. Se detectó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras de supermercado que provenían de la época de fría con respecto a las épocas lluviosa y calurosa (Figura 16a). Las dos últimas épocas no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$). La dispersión de los datos fue mayor en la época calurosa, a pesar de que la apariencia entre los jitomates fue muy similar.

El comportamiento de las *Enterobacteriaceae* en los jitomates de mercado de la época calurosa y fría no difirió significativamente (Figura 16b). La diferencia se obtuvo al confrontar con la época lluviosa. Presentan una mayor dispersión los valores de la época calurosa.

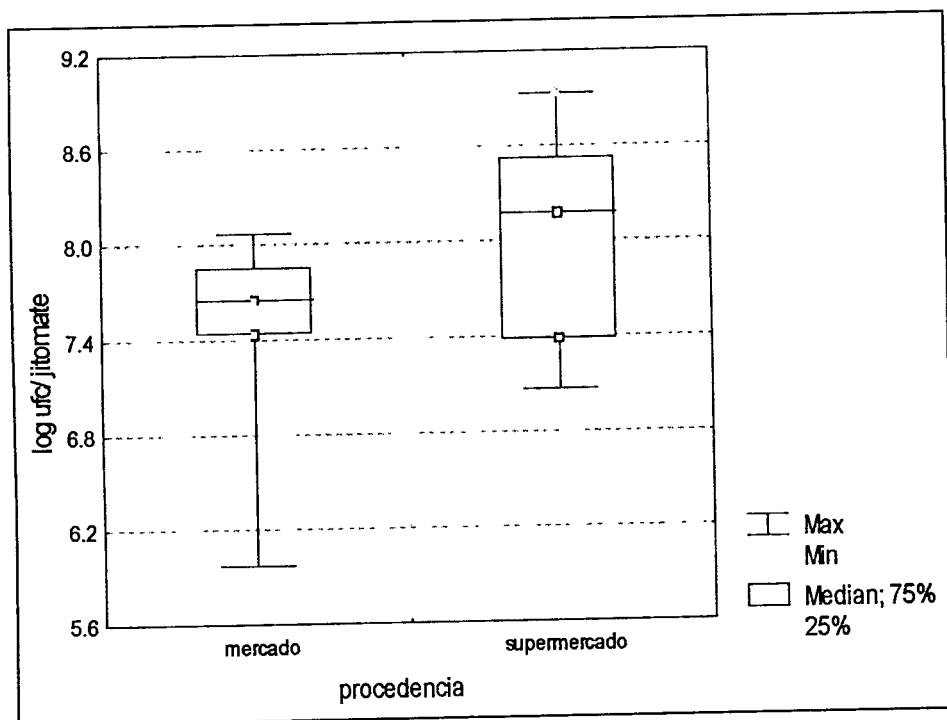
El efecto de la época de colecta sobre el contenido de *Enterobacteriaceae* de jitomate es modificado por el grado de manipulación a que fue sometido en cada lugar de expendio. Las condiciones del jitomate en cuanto al grado de madurez y apariencia, manejo y condiciones de almacenamiento contrastan en gran medida.

La incidencia de *E.coli* en jitomate "saladette" (Tabla 29) fue mayor en muestras provenientes de supermercado, independientemente de la época. Es evidente las deficientes prácticas de sanidad que aún persisten en el cultivo y manejo posterior de frutas y verduras. Se han reportado niveles de *E. coli* (en log

Tabla 28

Enterobacteriaceae de jitomate "bola" comercial colectado en mercados y supermercados durante el período lluvioso.

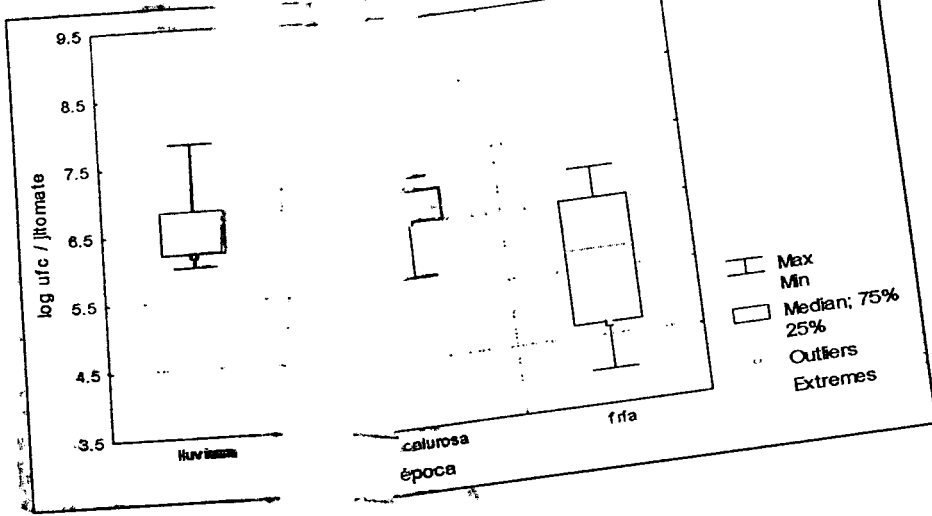
lugar de expendio		Población (log ufc / jitomate)
mercado público	mínimo	5
	mediana	7.7
	máximo	8.1
	desv.estandar	7.5
	n	16
supermercado	mínimo	6.1
	mediana	7.2
	máximo	8.9
	desv.estandar	8.4
	n	16



difieren significativamente

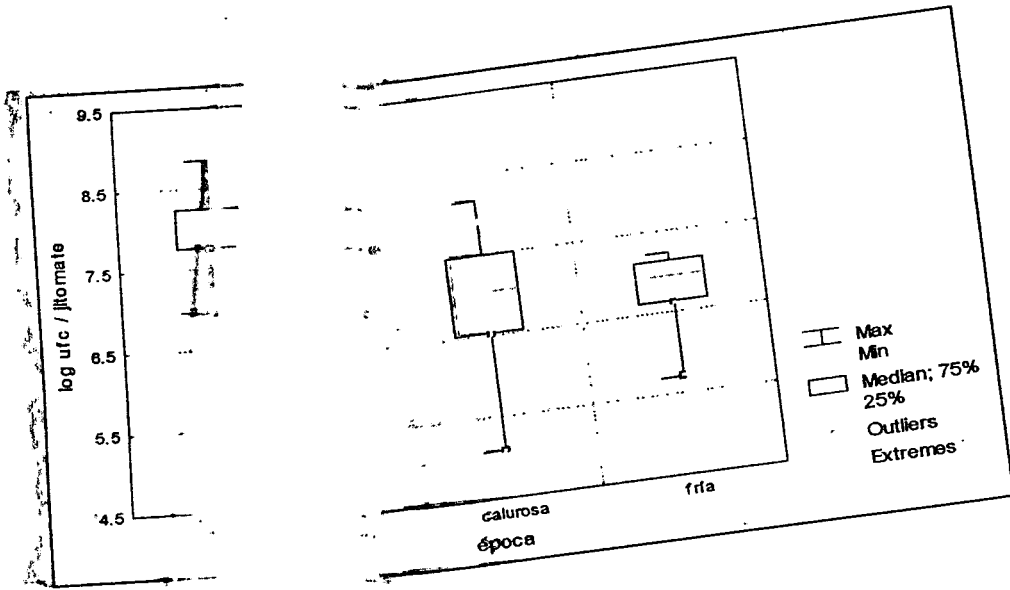
Figura 15. *Enterobacteriaceae* en jitomate "bola muestreado en mercados y supermercados en el período lluvioso.

a)



SUPERMERCADOS
difieren significativamente

b)



MERCADOS
difieren significativamente

Figura 16) Enterobacter y mt. en jtomate "saladette" muestreado en supermercados (a) y en los periodos lluvioso, calurosa y frío.

NMP/ g) en verduras crudas de mercados, de 2-3 para col, 3 para zanahoria, 3-6 para hojas de cilantro, 4-5 para lechuga, 3-4 rábanos y 1-2 jitomates (cit. en Fernández, 2000). Se detectó en mercados desde <0.1 a 2.3 log NMP/ jitomate y en supermercados desde <0.1 a >3 log NMP/ jitomate.

Para la variedad "bola", las muestras colectadas sólo fueron de la época lluviosa (Tabla 30), *E. coli* tuvo mayor presencia en muestras de mercado.

La presencia de *Salmonella* (Tabla 29-30) en jitomate "saladette" y "bola", fue muy baja independientemente de la época y lugar de expendio. *Listeria* estuvo ausente (Tabla 29-30) en las diversas muestras colectadas

A pesar de que el número de muestras de cada expendio y para cada época fue bajo, permitió tener una visión de la carga microbiana y la incidencia de patógenos presentes en este fruto. Con la información obtenida podemos inferir sobre el riesgo que representa esta hortaliza si es consumida en forma cruda.

Al contrastar valores de *Enterobacteriaceae* de los jitomates hidropónicos y los del comercio nos damos cuenta que el jitomate hidropónico aporta valores que distaron en mucho a los presentados por jitomate de comercio (Tabla 31). La superficie expuesta a la contaminación por parte de los jitomates del comercio fue 2 veces más pequeña que la del hidropónico. Lo importante ha considerar es el efecto de la comercialización que puede modificar los valores obtenidos de productos de campo, si no se procura control durante el manejo, almacenamiento y venta.

Tabla 29

Positividad de *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* en jitomate "saladette" colectado en mercados y supermercados en períodos frío, caluroso y lluvioso.

Lugar	Época	No. muestras	Positividad n (%)		
			<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
Mercado Público	fría	30	2 (6.6)	1 (3.3)	0 (0)
		15			0 (0)
	calurosa	15	3 (20)	0 (0)	0 (0)
	lluviosa	12	0(0)	1(8.3)	0(0)
	total	57	5(8.8)	2(3.5)	0(0)
Supermercado	fría	30	4 (13.3)	2 (6.7)	0 (0)
		15			0 (0)
	calurosa	15	8 (53)	1 (6.7)	0 (0)
	lluviosa	12	4(33.3)	0(0)	0(0)
	total	57	16(28.1)	3(5.3)	0(0)
	TOTAL	114	21(18.4)	5 (4.4)	0(0)

n: muestras positivas

* Cada muestra contiene 6 jitomates.

Tabla 30

Positividad de *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* en jitomate "bola" colectado en mercados y durante y supermercados en período lluvioso.

Lugar	No. muestras	Positividad n (%)		
		<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
Mercado Público	16	9(56.25)	1(6.25)	0(0)
Supermercado	17	2(11.8)	0(0)	0(0)

n: muestras positivas

* Cada muestra contiene 6 jitomates.

Tabla 31

Resumen del contenido de *Enterobacteriaceae* en jitomate.

lugar de procedencia	No. muestras	mínimo	mediana	máximo	desv. Sta.
		(log ufc/ jitomate)			
empresa productora	346	< 0.5	0.8	6.7	5.5
comercio	114	2.2	6.7	8.9	0.75
contenido general:	460	< 0.5	1.5	8.9	2.7

VI.9. Identificación de cepas aisladas de los diversos materiales

Las cepas consideradas de importancia sanitaria fueron *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E.coli* y otros miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*. Ambos patógenos se identificaron en función de su morfología microscópica, de cultivo, pruebas bioquímicas y aglutinación con antisueros comerciales. Para los serovares se utilizaron los antisueros 1 y 4 contra *L.monocytogenes* y polivalentes para *Salmonella* ; las cepas positivas se enviaron al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica para la identificación del serovar.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 32) se aislaron a partir de colonias desarrolladas sobre las placas de agar bilis rojo violeta con 1% de glucosa usadas en el recuento de *Enterobacteriaceae*. Consisten en 200 cepas provenientes de 220 muestras colectadas dentro de la empresa y 60 de jitomates del comercio; se siguieron las técnicas tradicionales para las pruebas bioquímicas (Bergey's, 1994).

Los géneros con mayor presencia fueron *Enterobacter*, *Rahnella* y *Klebsiella*. Se trata de bacterias que se distribuyen ampliamente en tierra, agua, plantas, vegetales, heces de animales y humanos (Manual Bergey's, 1994).

Géneros como *Enterobacter*, *Hafnia*, *Cedecea* y *E.coli*, tienen significado clínico, toda vez que como patógenos oportunistas, pueden llegar a provocar infecciones en humanos.

Además de la asociación de algunas de estas especies con las plantas, tierra, agua y otros substratos que pertenecen al ambiente natural en donde desarrollan las frutas y verduras, se aíslan también de los propios alimentos. De jitomates de mercado se aisló *E. agglomerans*, *E. cloacae* y *Serratia marcescens*. Probablemente estos microorganismos provenían de la tierra (Senter y col., 1985).

Los géneros mencionados estuvieron presentes en jitomate colectado del comercio, así como del cultivado de forma hidropónica. Es muy posible que éstos géneros formen parte de la flora nativa del jitomate.

Concluido el periodo de muestreo, ninguna cepa sospechosa de pertenecer a *L. monocytogenes* fue identificada como tal. Incluso el género *Listeria* no fue

detectado (Tabla 33). No es de extrañar la ausencia de éste microorganismo aún siendo muy ubicuo, ya que presenta una amplia dispersión en cuanto a los valores de incidencia registrados. Puede desde no estar presente hasta detectarse en el 67% de muestras de ensalada de verduras (Beuchat, 1995). *Salmonella* se recuperó de 56 muestras diversas jitomates y materiales asociados) en la planta productora, y en 6 muestras de jitomate del comercio a partir de 1443 y 160 muestras examinadas respectivamente.

Se identificaron cuatro serovares (*S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Thompson* y *S. C1* monofásica)(Tabla 33). El mayor porcentaje lo presentó *S. Typhimurium* (61.3%), seguida de *S. Agona* (24.2%), lo que sugiere una fuente común de contaminación.

Tabla 32

Enterobacteriaceae identificadas de diversos materiales durante la producción de jitomate hidropónico y de jitomate comercial saladette

Material	<i>Enterobacteriaceae</i>
tierra interior y exterior invernadero trabajadores polvo del piso de andadores esponjas sucias y lavadas	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Klebsiella terrigena</i> <i>Enterobacter sakazaki</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Cedecea davisae</i> <i>Rahnella aquatillis</i> <i>Escherichia coli</i>
jitomate hidropónico trapos limpios	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Klebsiella terrigena</i> <i>Enterobacter sakazaki</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Cedecea davisae</i> <i>Rahnella aquatillis</i>
jitomate saladette de mercado y supermercado.	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Escherichia coli</i>

Tabla 33

Salmonella y *Listeria* recuperadas de diversos materiales durante la producción de jitomate hidropónico y en jitomate comercial ("saladette").

No. muestras analizadas	material	muestras positivas (%) (b)	<i>Salmonella</i> (serotipos)			
			Typhimurium	Agona	Thompson	C1 monofásica
			muestras positivas (%) (a)			
541	jitomate (6 unidades/ muestra) invernadero empaque	16 (2.97)	10(1.8)	2(0.37)	1(0.18)	3(0.6)
144	limpiado	4(2.8)	3(2.1)	1(0.7)		
71	sin limpiar	2(2.8)	2(6.3)			
72	comercio					
72	saladette de supermercado	3(4.2)	3(4.2)			
72	saladette de mercado	2(2.8)	2(2.8)			
16	bola de mercado	1(6.25)			1(6.25)	
40	trapo (400 cm ²) limpio	3(7.5)	1(2.5)	1(2.5)	1(2.5)	
66	sucio	2(3.0)	2(3.0)			
12	esponja (300 cm ²) nueva	2(16.7)	1(8.3)		1(8.3)	
64	sucia	1(1.6)	1 (1.6)			
48	recién lavada	1(2.1)	1(2.1)			
462	tierra (10 g)	20(4.35)	7(1.5)	11(2.4)	2(0.4)	
34	encharcamientos (10ml)	5(14.7)	5(14.7)			
1603		62 (3.9)	38(61.3)	15(24.2)	6(9.7)	3(4.8)

a: No se aislo una sola cepa de *Listeria*.

Las cepas son tipificadas en SSA.

(a) con respecto a las positivas a *Salmonella*

(b) con respecto al total de muestras.

VII. Conclusiones

Los jitomates hidropónicos presentan niveles de contaminación microbiana significativamente más reducidos que los jitomates obtenidos del comercio.

A lo largo de 20 meses, *Salmonella* spp se recuperó globalmente del 3.9% de 1603 muestras de jitomate hidropónico, jitomate comercial y diversos materiales relacionados al cultivo hidropónico. *Listeria* spp y *L. monocytogenes* no se aislaron de ninguna de las 1603 muestras analizadas.

La incidencia de *Salmonella* spp fue de 16.7% en las esponjas, 14.7% en los encharcamientos, 7.7% en los trapos sucios y 7.5% en los trapos limpios (7.5%), 6.3% en los jitomates sin limpiar.

La positividad a *Salmonella* fue independiente de la época del año.

Salmonella spp estuvo presente en ausencia de *E.coli*; en las muestras de jitomate hidropónico.

Grupos indicadores como la familia de *Enterobacteriaceae* y organismos coliformes no se asoció con la presencia de *Salmonella* spp.

E. coli no fue un buen indicador de la presencia de *Salmonella* spp. Del 3.9% global de muestras positivas a *Salmonella*, el 2.4% no contenían *E.coli*.

Los jitomates hidropónicos provenientes de los invernaderos presentaron los siguientes valores: la mediana de BMA en 222 muestras de jitomate fue de < 4 log, con límites de < 1.2 hasta < 7 log ufc/ jitomate respectivamente. Las cifras respectivas para el grupo *Enterobacteriaceae* fueron 0.8 log ufc, y de < 0.5 hasta < 6 log ufc/ jitomate. Para los OCT la mediana fue de < 0.5 log ufc/ jitomate, con límites ligeramente inferiores a los las *Enterobacteriaceae*.

Salmonella spp fue recuperada del 2.95% de 541 muestras de jitomate, en tanto que *E. coli* resultó negativa. No se detectó *Listeria* spp o *L.monocytogenes* en 367 muestras.

Tomando en cuenta que tanto *Salmonella* como *E. coli* tienen una fuente común de contaminación (materia fecal humana y de animales), aunque con mayor abundancia de *E.coli* , y que por otra parte ambas muestran en general una susceptibilidad a la desecación y temperaturas muy próximas la presencia de *Salmonella* en ausencia de *E.coli* en las muestras de jitomate, sugiere que las cepas del patógeno (serovar *S. typhimurium* y *S.agona*) pudieron colonizar el ambiente interior de los invernaderos.

Para explicar la presencia de *Salmonella* spp. en los jitomates hidropónicos es fundamental caracterizar molecularmente las cepas del patógeno, y evaluar su capacidad para sobrevivir a la desecación y colonizar la tierra y agua de encharcamientos de los invernaderos.

El contenido de BMA en jitomate hidropónico, proveniente de invernaderos, no difiere significativamente según el nivel de altura o diferente localización dentro del invernadero.

Existe una diferencia significativa entre el contenido de BMA de los jitomates en invernaderos de dos tipos de ventilación en época de fría (Noviembre a Enero), lo que no ocurre en época de calor (Febrero a Mayo). La época del año modifica significativamente los niveles de BMA en el jitomate.

La incidencia de *E. coli* y *Salmonella* en tierra exterior a los invernaderos (11.3% y 6.1%, respectivamente) resultó dos veces mayor a la que se presentó en la tierra del interior de los invernaderos (6.1% y 3.6%).

En ninguna ocasión se detectó *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en jitomates, tierra, encharcamientos, y otros materiales provenientes de los cultivos hidropónicos.

Las esponjas recién lavadas-desinfectadas, lavadas-desinfectadas-almacenadas y sucias presentan niveles de 3.9 a 9 log ufc de *Enterobacteriaceae*/ 300 cm² de esponja, y valores ligeramente menores de OCT.

La porosidad de las esponjas puede interferir en la acción germicida del desinfectante, una vez que el contenido de *Enterobacteriaceae* es similar entre esponjas lavadas y desinfectadas respecto a la sucias, no difiriendo significativamente ambos valores.

Es posible lograr una desinfección efectiva para las esponjas mediante tratamientos térmicos (se redujeron hasta 5 log de *Enterobacteriaceae*) sin afectar las características del material.

El lavado de manos por parte de los trabajadores abate hasta 2 log el nivel de *Enterobacteriaceae* en sus manos mientras están en estrecho contacto con el jitomate.

El contenido de organismos coliformes en trapos sucios se reduce hasta en 5 log por efecto del mismo lavado.

La utilización de tapetes sanitarios a la entrada de los invernaderos no mejora los niveles de *Enterobacteriaceae* en los zapatos. El 60 a 80% de personas todavía mostraban *E. coli* en uno o ambos zapatos.

El jitomate de mercado y supermercado se encontró contaminado por *E. coli* (15.2%), en oposición a lo observado con el jitomate hidropónico.

La diferencia en el contenido de *Enterobacteriaceae* en jitomate de mercado público y supermercado en la época calurosa no fue significativa, contrario a lo observado durante la época lluviosa y fría.

Se observó una diferencia significativa en las poblaciones microbianas de los jitomates por efecto de las siguientes variables *Enterobacteriaceae* de mercado público y supermercado en la época lluviosa y fría, pero no en la calurosa.

El jitomate del comercio presentó baja incidencia de *Salmonella* (4.4%), a pesar de que las condiciones de cultivo y de comercialización no son las más favorables para evitar la contaminación con este patógeno. La ausencia de *Listeria* spp y *L. monocytogenes* fue persistente.

E. agglomerans, *E. cloacae* y *Serratia marcescens* forman parte de la flora nativa del jitomate; estuvieron presentes tanto en jitomate hidropónico como en el del comercio.

Se identificaron cuatro serovares de *Salmonella* (*S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Thompson*, *S. C1* monofásica). El mayor porcentaje lo presentó *S. Typhimurium* (6.1%), seguida de *S. Agona* (2.4%), lo que sugiere una fuente común de contaminación.

La actividad de barrer aunado a la presencia de ventiladores en el área de almacenamiento de jitomate contribuyó a dispersar las partículas de polvo por todo el cuarto frío y así contaminar los jitomates. En las 14 muestras de polvo del piso del cuarto frío, colectadas en diversas ocasiones siempre estuvo presente *E. coli*.

La técnica para investigar *Salmonella* resultó ser más sensible siguiendo la vía CSC, XLD y ASB. Mediante este procedimiento se analizaron 1603, lo que permitió recuperar al patógeno en el 3.9% de las muestras.

de especial significado, la exclusión de los zapatos del interior de los invernaderos, un lavado más frecuente la desinfección de los materiales que contactan con cualquier etapa y el monitoreo periódico para estudiar los materiales implicados como un recurso de verificación.

de los trabajadores
ante de las manos,
con el producto en
microbiológicos de los

VIII. Bibliografía

Alvarez, H. S.. 2002. Microbiología de la fresa obtenida de expendios en la ciudad de Querétaro. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Asociación Hidropónica Mexicana. 1999. Artículos. La hidroponía, la forma de producción del futuro, plantas sin tierra. <http://www.hidroponia.org.mx/info.htm>.

Bartz, J.A. 1999. Washing fresh fruits and vegetables: Lessons from treatment of tomatoes and potatoes with water. Dairy Food Environ. San. 19:853-864.

Bean. N. H., Goulding. J. S, Daniels. M.T., and Angulo F. J. 1997. Surveillance for foodborne disease outbreaks- United States, 1988-1992. J. Food Protection. 60(10): 1265-1286.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994. 9° Edición. Williams & Wilkins. pp: 175-222.

Beuchat, L.R. 1995. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot. 59:204-216.

Bringas, L. 1999^a. Ventanas del año 2000. Análisis y perspectivas de las exportaciones de hortalizas en México. Productores de Hortalizas. Año 8 (10):24-30.

Bringas, L., 1999^b. Tiempos de invernadero. Reportes del crecimiento y la diversificación de los invernaderos de NAFTA. Productores de Hortalizas. Marzo. pp: 62-64.

Brackett, R. E. 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Technology. April. 182-184.

Brackett, R. E. and Splittstoesser, D. F. 1992. Fruits and vegetables. In Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. 3th Ed. American Public Health Association. Washington. D. C.

Brackett, R. E. 1997. Fruits, vegetables and grains. In food microbiology, Fundamentals and Frontiers. Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. Ed. ASM-Press. Washington D. C.

Bryan, F. L. 1977. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. J. Food Protection. 40(1): 45-56.

Castro, A. M. 1999. E.T.A. Enfermedades transmitidas por alimentos, el caso de frutas y hortalizas. <file:///AI/brotetom.htm#E.T.A>.

D'Aoust, J. Y. 1994. *Salmonella* and the international food trade, Review paper. Inter. J. Food Microb. vol. 24. pp: 11-31.

De Boer, E. 1998. Update on media for isolation of *Enterobacteriaceae* from foods. International Journal Food Microbiology. 45: 43-53.

Difco. 1975. Serological. Identification of *Listeria*. Laboratories. Detroit Michigan U.S.A.

Donnelly, C. W., Brackett, R.E., 1992. In compendium of methods for the microbiological examination of foods. Vanderzant. And Solittstoedder . 3- Ed. American public health association (APHA). U.S.A.

- Dorais, M., Papadopoulos, A. P., and Goseelin, A. 2001. Greenhouse tomato fruit quality. *Horticultural Reviews*. 26:239-319.
- Dowe, M., E. D. Jackson, J. G. Mori y C. R. Bell. 1997. *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *J. of Food Protection*. 60(10):1201-1207.
- Ennis, J. 1999. Importación de tecnología y exportación de hortalizas. *Productores de Hortalizas*. Año 8(10):6.
- FAO. 2000. Anuario de la producción de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://apps.fao.org/>
- Farber, J. M., Sanders, G. W. and Johnston, M. A. 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.* 52(7):456-458.
- Fernández, E. E. 1981. *Microbiología sanitaria del agua y alimentos*. vol.1. EDUG/ Universidad de Guadalajara, México.
- Fernández, E. E. 1998. Riesgos microbianos relacionados con el consumo de alimentos. Más allá del síndrome diarreico. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. 18*(3): 130-136.
- Fernández, E. E. 2000. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro. México. pp: 30-37, 55-57.
- FDA y USDA. 1991. *Listeria monocytogenes*. Recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criterio for Foods. The human infectious dose of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 14:185-246.

FDA y USDA. Centers for Disease Control and Prevention. 1998. Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, en el caso de Frutas y verduras crudas. <http://www.foodsafety.gov/~mow/sprodgui.html>.

Flowers, R. S., D' Aoust, J. Y., Andrews, W. H. and Bailey, J.S. 1992. *Salmonella*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (Eds.). 3th. Ed., American Public Health Assoc. Washington, D. C. pp: 371-422.

Francis, G. A., Thomas C., O'Beirne D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. International Journal of Food Science and Technology. 34: 1-22.

García -Gimeno, R. M. 1996. Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready to use mixed vegetable salads in Spain. J. Food Safety. 16: 75-86.

Garg, N., Churey, J. J. and Splittstoesser, D. F. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. J. Food Protection. 53: 701-703.

Gatzionis, B. T. 2000. Situación de la oferta hortícola para exportación. Hortalizas, Frutas y Flores. Agosto , (31):9-13.

Gázquez, G. R. 2000. Manejo de cultivos hortícolas en sustratos vs suelo, Técnicas de cultivo sin suelo o hidropónicas. Hortalizas, Frutas y Flores. Marzo 31. pp: 20-23.

Gene-Trak ® *Listeria* Assay . DNA Hybridization Test for Detection of *Listeria*. © 1992. Gene- Trak Systems Corporation.

Greenberg, A. E., Clesceri, L. s., and Eaton, A. D. 1992. Standard Methods for the examination of water and wastewater, Multiple-tube Fermentation Technique for members of the coliform group. 18th Ed., American Public Health Association. pp:9-45 a 9-50.

Hedrick, T.I. and Heldman, D. R. 1969. Air quality in fluid and manufactured milk products plants. J. Milk Food Technol. 32: 265-269.

Heisick, J. E., Wagner, D. E., Nierman, M. L. and Peeler, J. T. 1989. *Listeria* spp. found on fresh market produce. Appl. Environ. Microbial. 55:1925-1927.

Hernández V. L.1981. Inducción de síntomas por carencias nutricionales en crisantemo (*chrysanthemum morifolium*) por el sistema de cultivo hidropónico. Tesis de Licenciatura, UNAM.

Hettmansperger, T. P. 1984. Statistical interference based on ranks. John Wiley & Sans, Inc., New York.

Hitchins, A. D., Hartman, P. A. and Todd, E.C. D. 1992. Coliforms, *Escherichia coli* and its toxins. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (Eds.). 3th. Ed. American Public Health Assoc. Washington, D. C. pp: 325-369.

Hitchins, A. D., Feng, P., Watkins, W. D., Rippey, S. R. and Chandler, L. A. 1995a. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. 8th Ed. AOAC International.

Hitchins, A. D. 1995b. *Listeria monocytogenes*. In: Food and Drug Administration. Bacteriological Analitical Manual. 8th Ed. AOAC International.

IFT. 2001. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh Produce and Fresh-Cut Produce. Institute of Food Technologists U.S. Dept. of Health and Human Services Food and Drug Administration.

INEGI. 1997. Cultivos anuales de México VII. Censo agropecuario. México. pp: 350-351.

Jaquette, B. C., Beuchat, L. R. and Mahon, E. B. 1996. Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella* Stanley inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. Applied and Environmental Microbiology. 62(6): 2212-2215.

Kamat, A. and Madhusudanan, P. N. 1995. Gamma Irradiation as a Means to Eliminate *Listeria monocytogenes* from Frozen Chicken Meat Journal of the Science of Food and Agriculture. 69 (4): 321-327.

Kaneko, K. I., Hayashidani, H., Takahashi, K., Shiraki, Y., Wongpranee, S.L., and Ogawa, M. 1999. Bacterial contamination in the environment of food factories processing ready-to eat fresh vegetables. J. Food Protection. 62(7):800-804.

Leyer, G. J. and Jonson, E. A. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp in cheese. Applied and Environmental Microbiology. 58(6):2075-2080.

López, F. 2000. Falta planeación en la siembra de hortalizas. Hortalizas, Frutas y Flores. Marzo. 31: 40.

Madden, M. J. 1992. Microbial pathogens in fresh produce- the regulatory perspective. Journal of food protection. 55: 821-823.

Manzano, M., Cocolin, L., Ferroni, P., Cantón, C. and Comi G. 1997. A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 74(1): 123-230.

McClelland, R. G. and Pinder, A. C. 1994. Detection the *Salmonella* Thyphimurium in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(12):4255-4262.

McUntey, G. J., Wilbur, A. G. 1971. *Practical Food Microbiology and Technology*. AVI. Published by Van Nostrand. N. Y. 3a. Ed.

Mercuri, A. J. and N. A. Cox. 1979. Coliforms and *Enterobacteriaceae* isolates from selected foods. *J. Food Protection*. 42(9): 712-714.

Mislivec, P. B., Beuchat, L. R. and Cousin, M. A. 1992. Yeasts and moulds. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (Eds.). 3th. Ed. American Public Health Assoc. Washington, D. C. pp: 239-249.

Mohd-Som, F., Art Spomer, L., Martin, S. and Schmidt, S. 1995. Microflora changes in misted and nonmisted broccoli at refrigerated storage temperatures. *J. Food Quality*. 18:279-283.

Morgan, L. 2000. Organic Hydroponics, Do we have an option?. *Practical Hydroponics & Greenhouses*. July-August. pp:46-59.

Mossel, D. A. A., I. Eelderink, M. Koopmans and F. Van Rossem. 1979. Influence of carbon source, bile salts and incubation temperature on recovery of *Enterobacteriaceae* from foods using MacConkey type agars. *J. Food Protection*. 42(6): 470-475.

Mountney, G. J., and Wilbur, A. G. 1971. Practical Food Microbiology and Technology. 3^o Edition. Published by Von Nostrand R. New York. pp. 249-259.

Mustupha, A., Liewen, B. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and Quaternary Ammonium sanitizers. J. Food Protection. 52(5):306-311.

Nguyen-the, C. and Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit. Revs. In Food. Sci & Nutr. 34:371-401.

Oblinger, J. L., Kennedy, J. E., and Langston, D. M. 1982. Microflora recovered from foods on violet red bile agar with and without glucose and incubated at different temperatures. J. Foods Prot. 45(10): 948-952.

Park, M. C. 1999. Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and naturally occurring microorganism on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus, Dairy Food and Environmental Sanitation. 19(12):842-847.

Peeler, J. T. and Maturin, L.J. 1992. Aerobic plate count. In: Food and Drugs Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual. 7- ed., AOAC. International, pp. 17.

Pérez, B. R. 1998. Contaminación y Dinámica de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* en Brócoli. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. .

Pether, J. V. and Gilbert, R. J. 1971. The survival of salmonellas on fingers-tips and transfer of the organisms to foods. J. Hyg. 69:673-681.

- Petran, R. L., Zottola, E. A. Y Gravani, R. B. 1988. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. J. Food Sci. 53: 1238-1240.
- Riser, C., Grabowski, J. and Gleen, E. 1984. Microbiology of hydroponically-grown lettuce. J. Food Prot. 47(10):765-769.
- Riser, C., Grabowski, J. and Gleen, E. 1985. Effect of the normal microflora on survival of *Salmonella* Typhimurium inoculated into a hidroponic nutrient solution. Journal of Food Protection. 48(10):879-882.
- Ryser, E.T. and Marth, E. H. 1991. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Marcel Dekker. Inc. New York, U.S.A.
- Samish, Z., and R. Etinger-Tulczynska. 1963. The microflora within the tissue of tomatoes. Appl. Microbiology. Vol.II. pp: 7-10.
- Senter, S. D., Cox, N. A., Bailey, J. S., and Forbus Jr. W. R. 1985. Microbiological changes in fresh market tomatoes during packing operations. J. Food Sci. 50:254-255.
- Serrano, C. Z. 1978. Tomate, pimiento y berenjena en invernadero. Ministerio de Agricultura. Ed. Publicaciones de extensión agraria. Madrid, España.
- Steinbreugge, E. G., Maxey, R. B. and Liewen, M. B. 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. J. Food Prot. 51:596-599.
- Steta, M., 2000. Perspectivas en la industria de invernaderos. Hortalizas, Frutas y Flores. Marzo. 31:40-41.

- Tietjen, M. and Fung, D. C. 1995. *Salmonella* and Food Safety. Critical Reviews in Microbiology. 21(1):53-83.
- Vanderzant, C. and Splittstoesser, F. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Third edition. American Public Health Association. pp. 325-344.
- Wei, C. I., Huang, T.S., Kim, J. M., Lin, W. F., Tamplin, M. L., and Bartz, J.A. 1995. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on Tomatoes and Disinfection with Chlorinated Water. Journal of Food Protection. 58:829-836.
- Weis, J. and Seeliger, H. P.R.. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30:29-32.
- Wells, J. M. and J. E. Butterfiel. 1999. Incidence of *Salmonella* on Fresh and Vegetables Affected by Fungal Rots or Physical Injury. Plant Disease. 83:722-726
- Welshimer, H. J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J. Bacteriology. 80:316-320.
- Will.R.B., McGlasson W.B.,Graham D., Lee T.H. and Hall E.G. 1989. Postharvest an introduction fo the physiology and handling of fruit and vegetables. An AVI Book. New York Published by Van Nostrand Reinhold. Cap.9. pp:102-105.
- Woo, R., Digiulio, K., Crawford, L. 1997.
<http://www.jrc.es/iptsreport/vol17/spanish/MED3S176.htm>.
- Yáñez, R. 2000. Análisis del comportamiento de las hortalizas. Hortalizas, Frutas y Flores. Agosto. 31:14-18.

Zagory, D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology*. 15:313-321.

Zhuang, R., Beuchat, L. R. and Ángulo, F. J. 1995. Fate of *Salmonella* Montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*. 6(6):2127-2131.

Zottola, E., Sasahara, K. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry- Should they be a concern?. *International Journal of Food Microbiology*. 23:125-148.