



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Departamento de Investigación y Posgrado
de Alimentos

“Evaluación de la presencia, sobrevivencia y potencial de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en presencia de *Lactobacillus curvatus* en hongos comestibles”

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta
I.B.Q. Cristina Madahí Serrano Payán

Dirigida por
Dra. Sofía M. Arvizu Medrano

Querétaro, Qro. Febrero de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Evaluación de la presencia, sobrevivencia y potencial de
crecimiento de *Listeria monocytogenes* en presencia de
Lactobacillus curvatus en hongos comestibles

por

Cristina Madahí Serrano Payán

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-300245-0323-223



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Evaluación de la presencia, sobrevivencia y potencial de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en presencia de *Lactobacillus curvatus* en hongos comestibles”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta
I.B.Q. Cristina Madahí Serrano Payán

Dirigida por
Dra. Sofía M. Arvizu Medrano

Sinodales

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario

Dra. Yesica Mayett Moreno
Vocal

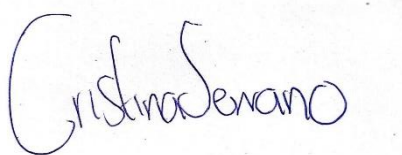
Dr. Ma. Estela Vázquez Barrios
Suplente

M.C. Gustavo Ramírez Barrera
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Febrero, 2023
México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, reading "Cristina Madahí Serrano Payán". The signature is written in a cursive style and is centered on the page.

I.B.Q. Cristina Madahí Serrano Payán

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser siempre la base para forjarme para seguirme superando día con día con el camino que elegí. Gracias por su amor y dedicación.

A Víctor por todo el apoyo, por acompañarme y ser uno de los pilares más grandes en mi vida.

A mis amigos, por ser mi lugar seguro y siempre darme su amistad, amor y motivación para continuar.

A la Dra. Sofía, por confiar en mí, tenerme la paciencia, brindarme su amistad y ser el increíble ser humano que es.

A mis sinodales, Dra. Monserrat, Dra. Yesica, Dra. Estela y M.C. Gustavo por el apoyo y dedicación puestas en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado para realizar este posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por ser mi alma mater y brindarme un espacio donde me he podido desarrollar profesionalmente y personalmente.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.1.1. Generalidades	6
2.1.2. Patogénesis	7
2.2. Brotes causados por <i>L. monocytogenes</i> asociados a frutas y hortalizas	9
2.3. Hongos comestibles	13
2.3.1. Producción	14
2.3.2. Fuentes de contaminación de <i>L. monocytogenes</i> durante la producción de hongos comestibles	15
2.4. Control de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
4. METODOLOGÍA	21
4.1. Detección de <i>L. monocytogenes</i> y cuantificación de grupos indicadores en hongos comestibles que se comercializan en la ciudad de Querétaro	21
4.1.1. Obtención de muestras	21
4.1.2. Preparación de muestras	21
4.1.3. Detección de <i>L. monocytogenes</i>	22
4.1.4. Cuantificación de grupos indicadores	23
4.1.4.1. Bacterias ácido-lácticas (BAL)	24
4.1.4.2. Bacterias mesófilas aerobias (BMA)	24
4.1.4.3. Bacterias mesófilas aerobias positivas (BMA+)	24
4.2. Evaluación del desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> sobre la superficie de hongos comestibles	24

4.2.1.	Obtención de cepas de <i>L. monocytogenes</i> resistentes a rifampicina	24
4.2.2.	Preparación del inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	25
4.2.3.	Inoculación de los hongos comestibles con <i>L. monocytogenes</i>	25
4.2.4.	Empacado y almacenamiento	25
4.3.	Evaluación del efecto de un <i>Lactobacillus curvatus</i> sobre el comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en <i>Agaricus bisporus</i> y sus características de calidad.	25
4.3.1.	Efecto de <i>L. curvatus</i> sobre el comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en hongos comestibles	26
4.3.2.	Evaluación del efecto de <i>L. curvatus</i> sobre la calidad de los hongos comestibles	26
4.3.2.1.	Determinación de la actividad de agua (A_w) de hongos comestibles	26
4.3.2.2.	Medición de color de hongos comestibles	26
4.3.2.3.	Preparación de las muestras y análisis de pruebas de compresión	27
4.4.	Diseño y análisis estadístico	27
5.	<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	28
5.1.	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> y cuantificación de grupos indicadores	28
5.2.	Evaluación del efecto de <i>Lactobacillus curvatus</i> sobre el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en la superficie de hongos comestibles.	31
5.3.	Evaluación de la calidad	34
6.	<i>CONCLUSIONES</i>	39
7.	<i>REFERENCIAS</i>	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Límites de crecimiento y sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i>	7
Cuadro 2. Brotes de listeriosis asociados con productos frescos.....	12
Cuadro 3. Iniciadores utilizados para la detección de <i>L. monocytogenes</i>	23
Cuadro 4. Mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en champiñones y setas provenientes de mercados y supermercados de la ciudad de Querétaro.	28
Cuadro 5. Cambio total de color en champiñones inoculados con <i>L. curvatus</i> a temperatura ambiente (T=25°C) y temperatura de refrigeración (T=10°C) después de 3 y 6 días de almacenamiento respectivamente.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de translocación de <i>L. monocytogenes</i> a través de la barrera intestinal	8
Figura 2. Proceso infeccioso celular	8
Figura 3. Diagrama de producción de hongos comestibles.....	15
Figura 4. Correlación entre muestras de hongos comestibles positivas y negativas a <i>L. monocytogenes</i> con grupos indicadores.....	29
Figura 5. Comparación entre las poblaciones de los grupos indicadores de champiñones y setas que se expenden en mercados y supermercados de la ciudad de Santiago de Querétaro.	31
Figura 6. Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> con inóculo A en presencia de <i>L. curvatus</i> a 10 y 25°C	32
Figura 7. Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> con inóculo B en presencia de <i>L. curvatus</i> a 10 y 25°C.	33
Figura 8. Índice de pardeamiento en champiñones bajo diferentes condiciones de almacenamiento	36
Figura 9. Actividad de agua en champiñones comestibles inoculados con <i>L. curvatus</i> bajo diferentes condiciones de almacenamiento	37
Figura 10. Compresibilidad en champiñones bajo diferentes condiciones de almacenamiento ...	38

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno de hábitat ambiental, por lo que puede contaminar con facilidad vegetales frescos y procesados para el consumo humano. Las alternativas que se han propuesto para evitar la sobrevivencia y desarrollo del patógeno se han limitado a la aplicación de sustancias químicas y algunos procesos físicos. Por lo anterior, el presente trabajo busca evaluar la presencia de *L. monocytogenes* en dos tipos de hongos comestibles, así como la sobrevivencia y potencial crecimiento en presencia de *Lactobacillus curvatus* (*Latilactobacillus curvatus*) en *Agaricus bisporus*. Se recolectaron 100 muestras de dos tipos de hongos comestibles de mercados y supermercados de la ciudad de Querétaro y se investigó la presencia de *L. monocytogenes* mediante PCR y cultivo y se cuantificaron grupos indicadores (Bacterias mesófilas aerobias, bacterias mesófilas aerobias positivas y bacterias ácido lácticas). Se evaluó la sobrevivencia y eventual desarrollo de *L. monocytogenes* (activada a 10 y 30°C) en la superficie de *Agaricus bisporus* almacenado a 10 y 25°C por 144 y 72 h respectivamente, así como el efecto antimicrobiano de *L. curvatus* en las mismas condiciones de almacenamiento. *L. monocytogenes* se detectó en el 4% de las muestras de champiñones y setas analizados, sin encontrar alguna relación con los grupos indicadores cuantificados. El patógeno fue capaz de desarrollar (1-2 Log UFC/champiñón) en el alimento en ambas temperaturas, independientemente de la forma de activación del patógeno. *L. curvatus* es una buena estrategia de bioconservación debido a que logra un efecto inhibitorio de 5.5 y 4.5 Log UFC de *L. monocytogenes*/champiñón almacenados a 10 y 25°C, respectivamente. La aplicación de *L. curvatus* no modifica significativamente el color, la textura y la actividad de agua del alimento durante el almacenamiento a 10 y 25°C. Los resultados nos muestran que esta estrategia de bioconservación puede controlar el crecimiento de este patógeno en vegetales como son los champiñones sin afectar negativamente las principales características de calidad.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, bioconservación, hongos comestibles, *Latilactobacillus curvatus*.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogen with environmental habitat, so it can easily contaminate fresh and processed vegetables for human consumption. The alternatives that have been proposed to avoid this pathogen survival and growth have been limited to the application of chemical substances and some physical processes. Therefore, the present work seeks to evaluate the presence of *L. monocytogenes* in two types of edible mushrooms, as well as the survival and potential growth in the presence of *Lactobacillus curvatus* (*Latilactobacillus curvatus*) on *Agaricus bisporus*. Two types of edible mushrooms were collected from markets and supermarkets of Querétaro city and the presence of *L. monocytogenes* was investigated by PCR and culture method and indicator groups were quantified. The survival and eventual growth of *L. monocytogenes* (activated at 10 and 30°C) on the surface of *Agaricus bisporus* stored at 10 and 25°C was evaluated, as well as the antimicrobial effect of *L. curvatus* under the same storage conditions. *L. monocytogenes* was detected in 4% of the samples of mushrooms analyzed, without finding any relationship with the quantified indicator groups. The pathogen was able to grow (1-2 Log CFU/mushroom) on the food at both temperatures, regardless of the pathogen activation way. *L. curvatus* is an efficient biopreservation strategy because it achieves an inhibitory effect of 5.5 and 4.5 Log CFU of *L. monocytogenes*/mushroom stored at 10 and 25°C, respectively. The application of *L. curvatus* does not modify the color, texture and water activity of the food during storage at 10 and 25°C. The results show that this biopreservation strategy can control the growth of this pathogen in vegetables such as mushrooms without negatively affecting the main quality characteristics.

Key words: *Listeria monocytogenes*, biopreservation, edible mushrooms, *Latilactobacillus curvatus*.

1. INTRODUCCIÓN

L. monocytogenes es una bacteria ampliamente distribuida en el medio ambiente que se presenta en el suelo, las plantas, las aguas subterráneas y la vegetación. En las últimas dos décadas, *L. monocytogenes* se ha asociado con muchas enfermedades transmitidas por los alimentos en humanos debido a que esta puede desarrollar a temperaturas tanto de refrigeración como ambiente (Letchumanan et al., 2018). Estudios han demostrado que esta bacteria se puede encontrar en las instalaciones de producción de hongos y setas comestibles y también se ha detectado en el mismo producto (M. Chen et al., 2018; Pennone et al., 2018); lo cual ha generado once retiros del mercado de estos productos desde 2013 según la base de datos de European Commission's Rapid Alert System for Food (RASFF). En EUA se presentó en 2020 un brote causado por *L. monocytogenes* asociado al consumo de hongos enoki con 36 casos reportados en total y 4 fallecimientos (CDC, 2020).

La capacidad de un microorganismo patógeno para desarrollar en un alimento incrementa el riesgo para el consumidor. Existen estudios sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en varios vegetales; sin embargo, hay muy poca información sobre el desarrollo de este patógeno en los hongos y setas comestibles; las investigaciones se han limitado a champiñón (*Agaricus bisporus*), que permitió el desarrollo del patógeno en muestras almacenadas a 4 y 10 °C (González-Fandos et al., 2001b). Otros autores han reportado que *L. monocytogenes* solo es capaz de sobrevivir y no de desarrollar en el champiñón (Leong et al., 2013).

En México se ha estimado que podrían haber alrededor de 200,000 especies de hongos comestibles, de las cuales, sólo se conocen 7,000 aproximadamente (Cano-Estrada & Romero-Bautista, 2016). Las especies más comercializadas son el champiñón (*Agaricus bisporus*) y las setas (*Pleurotus ostreatus*) en el mercado mexicano (Martinez-Carrera et al., 2022).

La temperatura de comercialización recomendada de estos productos es de 2°C (Day, 1992); sin embargo, cuando la venta es a granel, suelen permanecer a temperatura ambiente (25 °C) aproximadamente durante 72 h. Estas condiciones podrían favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* en el alimento.

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de *L. monocytogenes* en *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, así como la sobrevivencia y potencial crecimiento en presencia de *L. curvatus* en *Agaricus bisporus*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Listeria monocytogenes*

2.1.1. Generalidades

L. monocytogenes es un patógeno facultativo intracelular con forma de bacilo, Gram positivo. La temperatura óptima de crecimiento se ha reportado de 30°C, aunque se sabe que puede desarrollar desde 1°C a 45°C, es decir a temperaturas de refrigeración comercial por lo que se le considera una bacteria psicotrofa. Crece en un amplio rango de pH que va de 4.4 a 9.6 y también ante altas concentraciones de cloruro de sodio (10%). Tiene motilidad a 28°C debido a sus flagelos peritricos, pero la mayoría de las cepas de esta especie tienen una motilidad reducida cuando se expone a temperaturas superiores (McMullen & Freitag, 2014; Muñoz, 2012).

L. monocytogenes se divide en 13 serovares, de los cuales 4b, 1/2 a y 1/2 b presentan la mayoría de los casos en humanos (McMullen & Freitag, 2014). *L. monocytogenes* es una bacteria ubicua, por lo que la podemos encontrar en tierra, suelo, agua, forrajes, estiércol que se emplea como fertilizante, entre otros, por lo que puede contaminar frutas y hortalizas con facilidad. También ha sido aislada de alimentos que no se les ha aplicado algún tratamiento térmico, de igual forma puede estar presente en alimentos procesados (Martí, 2008). En la Tabla 1 se muestran los límites de crecimiento y sobrevivencia para *L. monocytogenes* (FSAI, 2005).

L. monocytogenes es causante de la listeriosis, la cual es una enfermedad que presentan los seres humanos donde los síntomas pueden ser desde una gastroenteritis hasta afecciones en el sistema nervioso central. La listeriosis presenta una tasa de letalidad variante que va del 20% al 50% en personas inmunocomprometidas. En mujeres embarazadas la enfermedad se llega a manifestar con sintomatología leve o como una infección asintomática; sin embargo, las embarazadas tienen un riesgo mayor de contraer listeriosis que el público en general, y el feto puede verse seriamente afectado. El mayor problema lo presentan los neonatos con una tasa de letalidad entre el 20% y 45% (Kim et al., 2018).

Cuadro 1. Límites de crecimiento y sobrevivencia de *L. monocytogenes*

Variables	Desarrollo			Sobrevivencia (no desarrollo)
Temperatura (°C)	-1.5 a 3	30 a 37	45	-18
pH	4.2 a 4.3	7.0	9.4 a 9.5	3.3 a 4.2
Actividad de agua	0.90 a 0.93	0.97	>0.99	<0.90
Sal (%)	<0.5	2	10	>20

(FSAI, 2005)

2.1.2. Patogénesis

L. monocytogenes siendo un patógeno transmitido por alimentos, ingresa al ser humano a través del tracto intestinal, atraviesa las barreras intestinales, la hematoencefálica y la placentaria. Al cruzar la barrera intestinal (Figura 1), se absorbe en el lumen intestinal para atravesar las células epiteliales, en este punto, si el sistema inmune no puede controlar la infección, el patógeno se seguirá multiplicando, éste puede pasar al torrente sanguíneo y llegar a los ganglios linfáticos. *L. monocytogenes* puede llegar a alcanzar el cerebro e incluso infectar la placenta lo que sería letal para el feto (Sauer et al., 2019; Vera et al., 2013).

Una vez que *L. monocytogenes* se encuentra dentro de la célula, la toxina listeriolisina O (LLO) así como dos fosfolipasas C (PLC), lisan con rapidez la vacuola fagocítica, y gracias a la ayuda de LLO la bacteria escapa de las vacuolas primarias y secundarias (Figura 2), esto debido a la capacidad que tiene para formar poros en las membranas de los fagosomas (Vera et al., 2013).

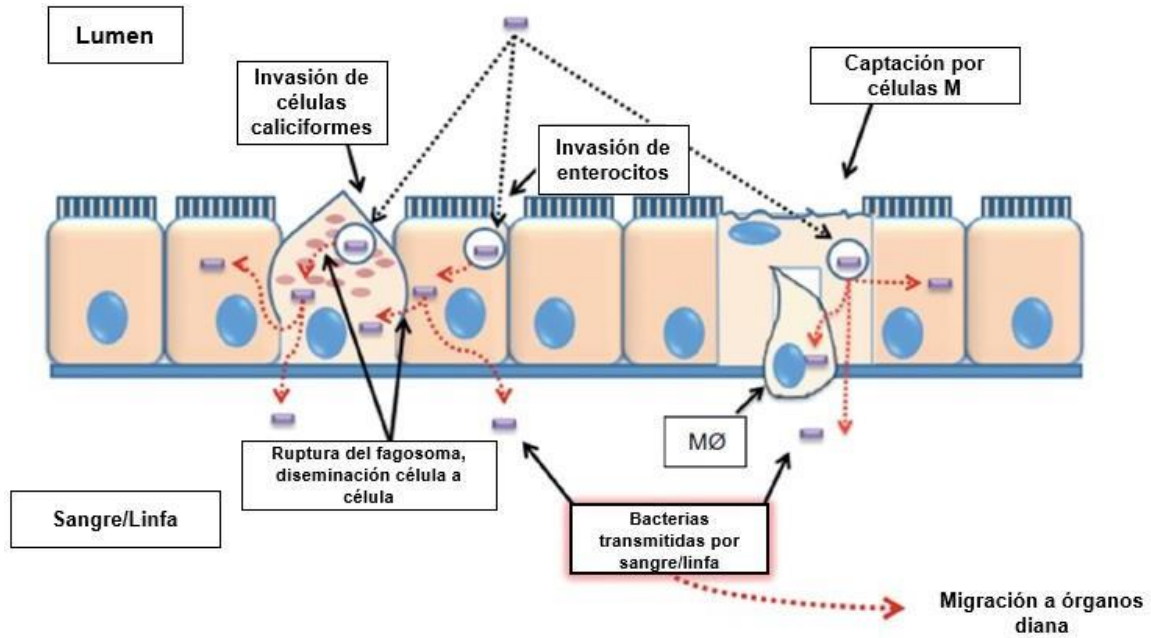


Figura 1. Mecanismos de translocación de *L. monocytogenes* a través de la barrera intestinal (McMullen & Freitag, 2014).

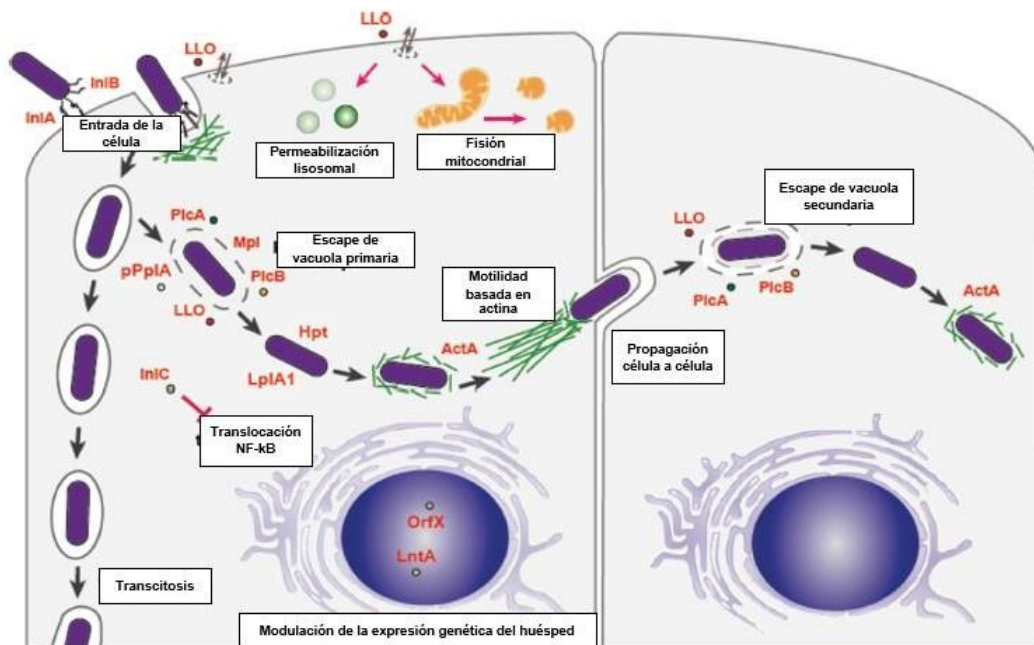


Figura 2. Proceso infeccioso celular de *L. monocytogenes* (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2019)

Una vez que *L. monocytogenes* se encuentra libre en el citosol expresa los genes necesarios para obtener nutrientes para llevar a cabo la multiplicación intracelular, entre los cuales tenemos la proteína p60 que es producto del gen *iap*, es secretada por todas las cepas del género *Listeria* y participa en los últimos pasos de la división celular. También se tienen evidencias que *L. monocytogenes* propicia las modificaciones de las histonas para remodelar la cromatina, lo que se considera una regulación epigenética (Vera et al., 2013).

La regulación de esta virulencia se da cuando la bacteria invade un hospedero y pasa de ser un saprófito a un parásito intracelular. La proteína PrfA regula genes de virulencia (como *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inIA*, *inIB*, *inIC* y *hpt*), esta proteína se encuentra directamente ligada con la expresión de los genes y puede actuar como un activador o represor de los mismos (Vera et al., 2013).

2.2. Brotes causados por *L. monocytogenes* asociados a frutas y hortalizas

Durante los últimos 30 años se han relacionado los serotipos 1/2 a y 4b como los principales causantes de la mayoría de los brotes de listeriosis en el mundo, donde la incidencia para esta enfermedad está entre 0,1 y 11,3 casos por cada millón de habitantes al año (Lomonaco et al., 2013; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Se han producido once retiros del mercado de alimentos como verduras y vegetales desde 2013 según la base de datos de European Commission's Rapid Alert System for Food (RASFF), donde la mayoría fueron importados de Asia (Dygico et al., 2020). Durante el 2011 un brote asociado a melón cortado produjo un total de 147 personas afectadas, un aborto espontáneo y 33 muertes en 28 estados diferentes de EUA (CDC, 2012). Durante ese mismo año, otro brote asociado con lechuga romana picada provocó 84 enfermos y 15 muertes, la FDA analizó las muestras dando positivo para *L. monocytogenes* (Shrivastava, 2011). Por otro lado, se reportó un brote en hongos enoki contaminados con *L. monocytogenes* donde se tuvo un total de 36 personas infectadas en 17 estados de los EUA, dicho producto provenía de dos empresas ubicadas en la República de Corea (CDC, 2020). Es importante resaltar que muchos de los brotes que se han reportado están relacionados con servicios de comida comunitaria, como hospitales o programas de comida a

domicilio, donde la mayoría de los consumidores eran personas de la tercera edad (Gaul et al., 2013; Little et al., 2010; Smith et al., 2011). El cuadro 2 muestra una lista de brotes de listeriosis causados por consumo de frutas y hortalizas frescas entre 2010 y 2020 en E.U.

En E.U., la política de regulación para los alimentos impide la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos que están listos para su consumo y en alimentos en los que puede crecer esta bacteria, así como todos aquellos alimentos que se les aplicó un tratamiento de cocción; esto es, debido a la seriedad de la listeriosis.

Por otro lado, en México no existen estimaciones precisas que nos indiquen la prevalencia de este patógeno, ni del costo monetario que esta enfermedad representa, esto es debido a la falta de diagnóstico adecuado, así como la falta de registro y seguimientos de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) por parte de las instituciones gubernamentales (Castañeda-Ruelas et al., 2014). Se cuenta con poca información sobre *L. monocytogenes* y su intervención clínica, a pesar de que se cuentan con estudios que muestran a la bacteria en una amplia variedad de alimentos, debido a esto, en ciertos campos de la industria alimenticia la determinación de *L. monocytogenes* ha ido ganando relevancia. Sin embargo, solo se cuentan con normas oficiales como NOM-091-SSA1-1994 y NOM-121-SSA1-1994 que establecen la ausencia de *L. monocytogenes* solamente en productos como el queso y la leche pasteurizada, aunque en otros alimentos no se ha implementado una regulación (Castañeda-Ruelas et al., 2018). Siendo México un país con millones de habitantes de los cuales casi la mitad se encuentra en situación de pobreza donde se concentra más la vulnerabilidad alimentaria en comparación con zonas más urbanizadas. Entre el 2012-2013, se reportaron 10,9 millones de casos de diarrea en infantes teniendo muertes ocasionadas por las infecciones intestinales, que se consideran una de las principales causas de morbilidad en el país. Teniendo en cuenta esta situación, se debe de tener más presente la seguridad alimentaria en México, ya que ha sido reportado como el mayor importador agroalimentario de América Latina y uno de los cinco países del mundo que cumple con todas las certificaciones para la exportación de alimentos, las normas y certificaciones alimentarias no son obligatorias para los productores mayoristas,

intermediarios y minoristas. Por lo que se debe tomar la responsabilidad en cuestiones de seguridad alimentaria no solo por parte de los productores, sino también de las instituciones encargadas para garantizar el bienestar de la población (Mayett-Moreno & Oglesby, 2018).

Cuadro 2. Brotes de listeriosis asociados con productos frescos.

Ubicación del brote/año	Muertes/casos (% de letalidad)	Vehículo de comida	Referencias
Texas, Estados Unidos, 2010.	5/10 (50)	Apio picado	(Gaul et al., 2013)
Colorado, Estados Unidos, 2011.	33/147 (22)	Melones enteros	(CDC, 2012)
Illinois y Michigan, EE.UU., 2014.	2/5 (40)	Brotes de frijol mungo	(Garner & Kathariou, 2016)
California, Estados Unidos, 2014.	1/32 (3)	Manzanas acarameladas	(CDC, 2014)
Ohio, Estados Unidos, 2016.	1/19 (5)	Ensaladas empaquetadas	(CDC, 2018)
California, Estados Unidos, 2020.	4/36 (11)	Hongos enoki	(CDC, 2020b)
Estados Unidos, 2017	7/35 (20)	Manzanas	(CDC, 2017)
Estados Unidos, 2017	2/5 (40)	Germen de soja	(CDC, 2017)
Estados Unidos, 2017	33/147 (22)	Melón Cantaloupe	(CDC, 2017)

2.3. Hongos comestibles

Los hongos comestibles son considerados vegetales que no contienen clorofila ni producen flores, suelen desarrollarse en sitios húmedos y frescos (Barbado, 2003). Su consumo está relacionado con el alto valor alimenticio que éstos proporcionan, por su sabor y fácil digestión, contienen 90% de agua y 10% de materia seca, de la cual el 27-48% representa el contenido total de proteína, el 60% está dado por carbohidratos destacando la fibra dietética y el 2-8% son lípidos. Por otro lado, el contenido de minerales ronda entre el 6% y 11% dependiendo de la especie de hongo; finalmente, los hongos comestibles son ricos en vitaminas especialmente las del complejo B (Roncero-Ramos, 2015; Sánchez, 2004; Santa Catarina Del Monte et al., 2006).

En México existen una gran variedad de especies de hongos comestibles y algunas de ellas se han consumido desde tiempos prehispánicos. Basándose en la diversidad vegetal mundial, reportaron que posiblemente existían entre 1 500 000 a 2 500 000 especies de hongos. En este país se estimó que pueden haber 200 000 especies, de las cuales, sólo se conocen 7 000 aproximadamente (Cano-Estrada & Romero-Bautista, 2016). Son 6 las especies más comercializadas, de las cuales el champiñón (*Agaricus bisporus*) y las setas (*Pleurotus ostreatus*) tienen más demanda en el mercado mexicano (Martínez-Carrera et al., 2022).

Aunque originalmente la producción de hongos solamente se daba por temporadas, ha sido gracias a la agroindustrialización que se pueden producir miles de toneladas de éstos para satisfacer las necesidades de la población durante todo el año. Debido a que este alimento puede consumirse crudo sin algún tratamiento térmico previo, se llega a llegado a considerarlo un alimento listo para el consumo; se estima un consumo anual *per cápita* de 0.620 kg al año (Martínez-Carrera & Mayett-Moreno, 2016). La producción anual de hongos frescos en México representa un volumen de 62,374 toneladas por año, siendo México el 13° lugar de producción a nivel mundial, representando alrededor del 59% del total producido en Latinoamérica, generando una ganancia económica en exportaciones de más de 4 millones de dólares anuales, mientras que su comercio genera un monto anual aproximado de 150 000 000

dólares, generando empleos tanto en la producción como en la comercialización de este alimento (Cano-Estrada & Romero-Bautista, 2016; Martínez-Carrera & Mayett-Moreno, 2016).

2.3.1. Producción

La preparación del inóculo o “semilla” es la base principal para el cultivo comercial de setas, y se refiere a la propagación o desarrollo masivo del hongo en granos de gramíneas. Es necesario adaptar o construir un espacio que tenga las condiciones ambientales necesarias para el hongo. Para su cultivo se necesita someter a pasteurización el suelo que se va a utilizar para así poder disminuir la carga microbiana, posteriormente este se coloca en bolsas de plástico, se siembra la “semilla” y por último se incuba a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo aproximado de 2-3 semanas en completa oscuridad. El hongo se podrá obtener 30 días posteriores a la siembra como se ilustra en la Figura 3 (Gaitán-Hernández, 2017).

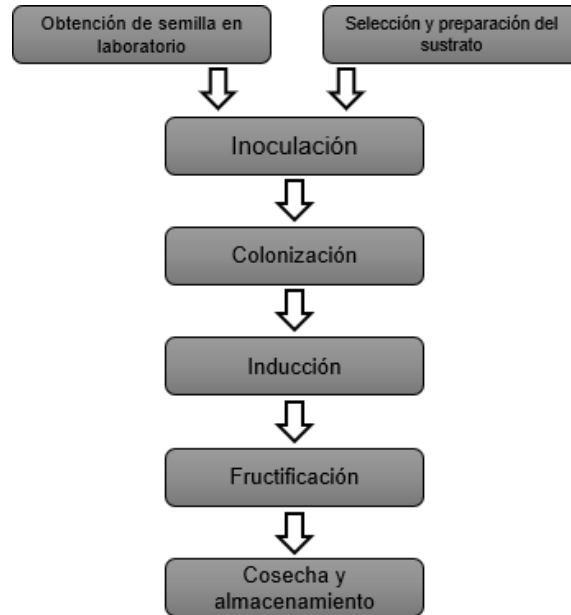


Figura 3. Diagrama de producción de hongos comestibles (Silva et al., 2010)

Posterior a la cosecha, los hongos son comercializados de manera inmediata o son almacenados en refrigeración. Estos se pueden comercializar a granel o pueden ser colocados en charolas pequeñas que estén cubiertas con un plástico adherente. Los hongos suelen perder por día del 1-2% de su peso inicial, por lo que lo ideal es comercializarlos justo después de su recolección (Gaitán-Hernández, 2017).

2.3.2. Fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* durante la producción de hongos comestibles

La contaminación con bacterias patógenas puede suceder en cualquier punto del desarrollo, cosecha y clasificación de los hongos comestibles, siendo el suelo o sustrato donde crecen un importante nicho de bacterias (Chikthimmah, 2006). Algunos hongos se desarrollan en ecosistemas forestales donde el ganado pasta y este tipo de ecosistemas provee una gran cantidad de animales o insectos que pueden llegar hasta el hongo comestible y contaminarlo con bacterias ya sea directa o indirectamente (Venturini et al., 2011); estos hongos generalmente son recolectados a mano.

Debido a propiedades fisiológicas como la alta tasa de respiración y a propiedades químicas como el alto contenido de humedad, actividad de agua aproximada de

0.98 y pH neutro, los hongos comestibles podrían ser en un medio ideal que permita el crecimiento microbiano. Debido a estas características y a su carga microbiana antes del procesamiento, estos productos tienden a tener una vida de anaquel de tan solo unos pocos días (Kader, 2002; Martínez-Carrera et al., 1998). Generalmente los hongos que se comercializan están cultivados y cosechados a mano, estos son procesados en una planta donde se empaican en pequeños contenedores sin haber pasado por un proceso previo de lavado o desinfección, y una vez comercializados se mantienen a temperatura ambiente lo que propicia el crecimiento de microorganismos patógenos (Doores et al., 1987; González-Fandos et al., 2001b).

Hay diversos factores que pueden favorecer la contaminación de *L. monocytogenes* durante el procesamiento de alimentos, entre ellos tenemos las condiciones de higiene de toda la materia prima que entra a la planta, así como también las condiciones higiénicas en las que se encuentran las mismas instalaciones, la calidad de agua utilizada durante todo el procesamiento. Iwu & Okoh (2020) reportaron que se encontró *L. monocytogenes* en el agua de riego y en suelos agrícolas por lo que esta bacteria podría contaminar con facilidad a productos frescos durante su producción. Por otro lado, hay factores que de igual manera podrían favorecer el crecimiento del patógeno después del procesamiento como son las propias características del alimento (actividad de agua, pH, nutrientes, entre otros) y las condiciones de temperatura/tiempo empleadas para distintas etapas en el proceso, como el almacenamiento, lavado, y escaldado (Koutsoumanis et al., 2020).

Debido a la corta vida que presentan los hongos, éstos son empacados utilizando atmósferas modificadas (Permeabilidad de O₂ de 25·000 cm³ m⁻² por 24 h y de vapor de agua de 200 g m⁻² por 24 h a 25°C), esto con la finalidad de alargar su vida poscosecha, retrasar senescencia del producto; así como inhibir el crecimiento de microorganismos aerobios presentes. Sin embargo, el uso de atmósferas modificadas en empaado o envasado puede estimular el crecimiento de bacterias patógenas microaerofilicas o anaerobias incluso antes de que el producto se perciba deteriorado; regularmente este tipo de productos se llegan a almacenar en condiciones de refrigeración (4-10°C), donde *L. monocytogenes* tiene la capacidad de crecer en bajas concentraciones de O₂ y temperaturas bajas

Leong et al., (2013) reportaron que, aunque en el sustrato utilizado en el crecimiento de hongos no apoya el desarrollo de *L. monocytogenes*, sí permite la sobrevivencia de las células propiciando su transferencia a los hongos comestibles durante su crecimiento. Por otro lado, se observó que durante el almacenamiento del hongo comestible, la población de *L. monocytogenes* disminuyó durante el tiempo analizado, a pesar de las condiciones de pH (7.3) y el contenido de agua (83%). No obstante, se reportó que *L. monocytogenes* permaneció viable a un periodo de 20 días, lo que nos dice que el patógeno podría sobrevivir en el alimento hasta el consumo (Leong et al., 2013).

2.4. Control de *L monocytogenes* en alimentos

Debido a que microorganismos patógenos pueden llegar al ser humano a través de los alimentos, se deben tener medidas de higiene para asegurar que estos alimentos estén libres de agentes patógenos o se encuentren dentro de los límites aceptables, si fuera el caso (Warriner & Namvar, 2009). Para el control de *L. monocytogenes* en una planta productora de alimentos se necesita un uso eficaz de desinfectantes, calidad microbiana de la materia prima o productos entrantes y procesos antimicrobianos eficientes y oportunos, una falla en estos puede comprometer la inocuidad y frescura de los alimentos. El uso inapropiado de los desinfectantes puede permitir la sobrevivencia y adaptación de cepas del patógeno en las instalaciones durante largos periodos de tiempo (Tompkin, 2002). La detección de fuentes de contaminación del patógeno es fundamental para lograr el control en el proceso y reducir el riesgo para la población (Fox et al., 2015).

Entre los principales desinfectantes utilizados en hongos (champiñón), encontramos el peróxido de hidrógeno que se ha demostrado que reduce la carga microbiana mientras que a su vez minimiza el pardeamiento cuando éste es utilizado en combinación con algunos agentes antioxidantes como el ácido ascórbico (Sapers et al., 2001). De igual forma, se cuenta con métodos para tratar las superficies de los alimentos basados en rayos ultravioleta que pueden ser aún más eficaces si se combinan en un proceso más avanzado con peróxido de hidrógeno (Hadjok et al., 2008). Actualmente se aplica el peróxido de hidrógeno (3% v/v) para el procesamiento de champiñones, aunque no resulta ser tan viable su uso debido a que es fácilmente degradado por la actividad de la catalasa endógena. Por otro lado, existen agentes desinfectantes alternativos que usan agua ácida electrolizada y ozonizada que tienen la ventaja de no generar ni dejar residuos o subproductos (Ding et al., 2011; Sapers et al., 2001). Otra opción es la aplicación de tratamientos físicos con efecto antimicrobianos, como calor, altas presiones, luz pulsada, pulsos eléctricos, que pueden coadyuvar a la inocuidad del alimento; sin embargo, algunos alimentos se afectan cuando se exponen a estos tratamientos (García et al., 2010).

Entre las técnicas de conservación de alimentos se encuentra la bioconservación o bioconservación, que se define, según lo reportado por Stiles, (1996), como:

“extensión de la vida de anaquel e inocuidad de un alimento a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos”. La bioconservación hace que los microorganismos aumenten su potencial antimicrobiano en los alimentos con un uso seguro, un ejemplo de bioconservación de alimentos más común es la fermentación, que es un proceso basado en el crecimiento de microorganismos añadidos o propios del alimento (Ananou et al., 2014; García et al., 2010). Uno de los grupos microbianos más usados para la bioconservación son las bacterias ácido lácticas, estas producen ácidos orgánicos, bacteriocinas, péptidos, competencia por espacio y nutrientes, entre otros (Camargo et al., 2018). *L. curvatus* es productora de la bacteriocina llamada curvatina, lo cual puede llevar a una reducción considerable de *L. monocytogenes* sin modificar la calidad sensorial y también previniendo el crecimiento de bacterias deterioradoras en el alimento. Este *lactobacillus* es capaz de producir su bacteriocina a temperaturas de refrigeración, lo que esta bacteria puede ser utilizada para la bioprotección de alimentos o productos refrigerados, sobre todo en productos cárnicos donde su eficacia ya está demostrada (Stahnke et al., 2008).

Con base a la información anterior, se percibe la necesidad de contar con una estrategia de control de *L. monocytogenes* en productos frescos como los hongos comestibles, que no dependa de la aplicación de calor, ni afecte las características de calidad del alimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la presencia de *L. monocytogenes* en *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, así como la sobrevivencia y potencial crecimiento en presencia de *L. curvatus* en *Agaricus bisporus*.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Detectar *L. monocytogenes* y cuantificar microorganismos indicadores en champiñones (*Agaricus bisporus*) y setas (*Pleurotus ostreatus*) que se comercializan en la ciudad de Querétaro.
- 2) Evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* en *Agaricus bisporus* almacenados a 10 y 25°C.
- 3) Evaluar el efecto de *L. curvatus* sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en la superficie de *Agaricus bisporus* a 10 y 25°C.

4. METODOLOGÍA

4.1. Detección de *L. monocytogenes* y cuantificación de grupos indicadores en hongos comestibles que se comercializan en la ciudad de Querétaro

4.1.1. Obtención de muestras

Se recolectaron hongos que se expenden en mercados y en supermercados en las siete delegaciones de Santiago de Querétaro, México. Para la determinación del número de muestras a obtener de cada mercado, se consideró el número de habitantes de la delegación en donde se encontraba el mercado, posteriormente, se seleccionó un supermercado que se encontraba en cada una de las delegaciones de los mercados seleccionados de la ciudad; se colectó un número similar de muestras en mercados y supermercados. Los puntos de recolección fueron 3 mercados (La cruz, Presidentes, Satélite) y 4 supermercados (Comercial Mexicana, Walmart Plaza de toros, Walmart Uptown, City Market) localizados en las diferentes delegaciones de la ciudad de Querétaro.

Inmediatamente después de la recolección, las muestras de champiñones y seta se transportaron en hielera con geles refrigerantes al laboratorio donde se mantuvieron en frío (4°C) hasta su análisis (≤ 8 h).

4.1.2. Preparación de muestras

A partir de cada muestra se pesaron 50 ± 5 g de hongo y se colocaron en 50 mL de diluyente de peptona (peptona de caseína 0.1%). Se homogenizó manualmente durante 1 minuto. A partir de la suspensión se realizó la detección de *L. monocytogenes* y el recuento de microorganismos indicadores. El resto del líquido se almacenó a 4°C hasta obtener el resultado de la prueba de PCR. Si ésta resultaba positiva se procedió a detectar a *L. monocytogenes* mediante cultivo como se describe en el Bacterial Analytical Manual (FDA, 2015)

4.1.3. Detección de *L. monocytogenes* en hongos comestibles.

De los 50 mL de la suspensión obtenida en la sección 4.1.2, se tomaron 25 mL y aproximadamente 25 g de los hongos (1/4 de muestra), se adicionaron con 25 mL de caldo LEB (BioRad, EUA) a doble concentración de citrato de amonio férrico (2xFAC)(20 g/L), piruvato sódico y se llevó a incubar durante 4 h a 30°C. Finalmente se añadieron 200 mL de caldo BLEB, se homogenizaron las muestras y se incubaron durante 44 h más.

La detección de *L. monocytogenes* en las muestras previamente enriquecidas, se realizó mediante una prueba de PCR de punto final utilizando un termociclador (Techne 512, Reino Unido) (Godinez-Oviedo et al., 2017).

Se centrifugaron alícuotas de 1mL de las muestras enriquecidas a 8500 g durante 10 min, descartando los sobrenadantes. El ADN se extrajo usando el Kit mericon DNA Bacteria Plus Kit (Qiagen, EUA) según las indicaciones del fabricante. Para la reacción de amplificación se usaron los iniciadores y condiciones de amplificación que se muestran en el Cuadro 3, una mezcla de reacción All Taq Master Mix, 1 µL de ADN y 1 µmol de cada iniciador (Aznar & Alarcón, 2003; Godinez-Oviedo et al., 2017; Lee et al., 2020)(Cuadro 3). Las muestras positivas a la prueba de PCR se confirmaron por cultivo siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para la detección de *L. monocytogenes*.

Primer	Gen blanco	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicón de PCR (bp)	Condiciones de amplificación	Referencia
LM1 LM2	<i>hlyA</i>	F: CCTAAGACGCCAATCGAA R: AAGCGCTTGCAACTGCTC	702	94°C/5 min 35 ciclos: 94°C/30 s 50°C/45 s Extensión final: 72°C/5min	Godinez-Oviedo et al., 2017

Se estriaron los enriquecimientos del caldo BLEB en el agar selectivo cromogénico Harlequin® *Listeria* Chromogenic Agar (Ottaviani & Agosti) (Neogen, EUA) y en Agar Oxford modificado (Neogen, EUA) (basado en la utilización de esculina). Todas las placas se incubaron por 48 h, revisándolas tanto a las 24 h como a las 48 h. Se seleccionaron al menos 5 colonias típicas de cada placa y se purificaron en agar de soya tripticasa (BioRad, EUA) con extracto de levadura al 0,6% (TSAYE), incubando las placas a 30°C durante 24-48 h y las colonias sospechosas se identificaron mediante una prueba de PCR usando los iniciadores y condiciones que se describen en cuadro 3. Adicionalmente los aislados de *L. monocytogenes* se tipificaron serológicamente usando antisuero para *Listeria* polivalente (BD Difco, USA) (Hitchins et al., 2017).

4.1.4. Cuantificación de grupos indicadores

A partir de la suspensión obtenida en 4.1.2 se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona (0.1%) y el recuento de los grupos indicadores basado en la metodología del Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2015) como se señala a continuación.

4.1.4.1. Bacterias ácido-lácticas (BAL)

El recuento de BAL se efectuó mediante la técnica de extensión en superficie en agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (BioRad, EUA) y se incubaron a 30°C por 48 h. Las colonias desarrolladas se les evaluó la respuesta al Gram y la producción de catalasa mediante agua oxigenada.

4.1.4.2. Bacterias mesófilas aerobias (BMA)

El recuento se efectuó mediante la técnica de vertido en placa en agar de cuenta estándar (BioRad, EUA) e incubación a 35°C por 24 h.

4.1.4.3. Bacterias mesófilas aerobias positivas (BMA+)

El recuento se efectuó mediante la técnica de vertido en placa en agar de cuenta estándar (BioRad, EUA) adicionado de inhibidores (100 mg/L ácido nalidixico y 100 000 U/L polimixina B) de las bacterias Gram negativas y se incubaron a 35°C por 24 h.

4.2. Evaluación del desarrollo de *L. monocytogenes* sobre la superficie de hongos comestibles

4.2.1. Obtención de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a rifampicina

Las cepas de *L. monocytogenes* aisladas del presente trabajo se activaron en caldo soya tripticasa adicionada de extracto de levadura 0.6% (CSTEL), durante 24h a 30°C y se transfirió a 100µL a caldo MRS con rifampicina (100 ppm) y se incubó nuevamente por 24h a 30°C, finalmente, se sembraron mediante hisopo en placas de agar MRS con rifampicina (100 ppm). Las colonias que desarrollaron se aislaron y almacenaron a congelación (-20°C) en caldo soya tripticaseína adicionado con 15% de glicerol (Loo, 2017). Estas cepas fueron confirmadas por PCR.

4.2.2. Preparación del inóculo de *L. monocytogenes*

Se utilizaron cuatro cepas de *L. monocytogenes* aisladas en el presente trabajo y que mostraron resistencia a rifampicina. Se realizaron dos tipos de activación de las cepas: para el inóculo A, se activaron las cepas en caldo soya tripticasa durante 24 h a 30°C, posteriormente se tomó una alícuota de este cultivo para realizar un subcultivo que se dejaría incubando durante 18 h a la misma temperatura. El inóculo B se realizó activando las cepas en caldo soya tripticasa a 10°C durante 24 h, posteriormente, se tomó una alícuota de este cultivo para realizar un subcultivo e incubarlo durante 3 días bajo la misma temperatura. Cada inóculo se diluyó en una proporción 1:10 usando solución salina isotónica (SSI 0.85%) para inocular los champiñones, también se colocaron 100 µl de diluciones apropiadas de cada tipo de inóculo en agar soya tripticasa con rifampicina para determinar la concentración del patógeno.

4.2.3. Inoculación de *Agaricus bisporus* con *L. monocytogenes*

Champiñones adquiridos en un supermercado enteros, empacados, sin daño aparente y de aproximadamente 50 g cada uno se inocularon con 10 gotas de 10µl c/u de las suspensiones de células de *L. monocytogenes* y se esparcieron con la ayuda de un asa bacteriológica (~9 Log UFC/mL)(4.2.2). Las muestras se pusieron en campana de flujo laminar por 30 min para permitir que el inóculo secase. La concentración del inóculo fue determinada por cultivo.

4.2.4. Empacado y almacenamiento

Los champiñones inoculados fueron empacados de manera comercial; en charolas de unicel cubiertas con un plástico adherente. Las muestras inoculadas fueron almacenadas a dos temperaturas diferentes de incubación: 1) temperatura de refrigeración (4°C) y 2) temperatura que simule la ambiente (25°C) por un periodo de 144 y 72 h respectivamente.

4.3. Evaluación del efecto de un *Lactobacillus curvatus* sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en *Agaricus bisporus* y sus características de calidad.

4.3.1. Efecto de *L. curvatus* sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en hongos comestibles

Para la aplicación de la cepa de *L. curvatus* (CHR Hansen) se utilizó la metodología de (Sørensen et al., 2016) con modificaciones. Se prepararon los inóculos de *L. monocytogenes* como se señala en la sección 4.2.2 y se inocularon champiñones (*Agaricus bisporus*) con el patógeno como se describe en la sección 4.2.3. El inóculo de *L. curvatus* se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante, posteriormente se inoculó por aspersion, la suspensión se aplicó mediante un atomizador tratando de cubrir toda la matriz con una sola aspersion. Las muestras fueron empacadas como se señala en la sección 4.2.4 y se almacenaron a 10 y 25°C. Periódicamente se tomó una porción de aproximadamente 50 g de hongo y se cuantificó el contenido de *L. monocytogenes* en agar soya tripticasa adicionado de 100 ppm de rifampicina y el contenido de *L. curvatus* en agar MRS. De manera simultánea se inocularon champiñones con *L. curvatus* para evaluar los cambios que pudiera tener *L. curvatus* en la calidad del alimento como se describe adelante.

4.3.2. Evaluación del efecto de *L. curvatus* sobre la calidad de los hongos comestibles

Se inocularon champiñones con *L. curvatus* para conocer el efecto que este pudiese tener en la calidad de los champiñones, se incubaron a temperatura de refrigeración (10°C) durante 144 h y otro par de muestras se incubó a 25°C durante 72 h. Se midieron los diferentes parámetros de calidad a champiñones sin *L. curvatus* tomándolos como control, champiñones inoculados al tiempo cero (t=0) y a los champiñones transcurridos su periodo de incubación.

4.3.2.1. Determinación de la actividad de agua (Aw)

Se trituró la muestra previo a la medición de la actividad de agua usando el equipo Aqualab (Decagon, EUA), la muestra se colocó en la celda del equipo procurando ocupar como límite $\frac{3}{4}$ de su capacidad. Preparada la muestra, se abrió el porta-celda para colocar en ésta la celda con el alimento triturado y se permitió que el equipo indicara el valor de la medición.

4.3.2.2. Medición de color

Para la medición de color se utilizó un colorímetro CM-600D (Konica Minolta, Japón).

El colorímetro se calibró previamente a la lectura con los respectivos filtros blanco y negro.

4.3.2.3. Preparación de las muestras y análisis de pruebas de compresión

Se evaluó la textura en el hongo completo centrado respecto a la base del texturómetro. Se utilizó un texturómetro modelo TA-RT-KIT con una celda de carga 25000g y un punzón cilíndrico de punta plana (longitud 37.47 mm y altura 54.20 mm). La velocidad de descenso fue de 2 mm/s y un porcentaje de compresión del 80% con respecto al tamaño inicial de la muestra. (Chen et al., 2001; Medina-Torres et al., 2003). Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.4. Diseño y análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y en dos ocasiones. Las poblaciones de grupos indicadores se compararon entre punto de venta y presencia/ausencia de *L. monocytogenes* utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. En la evaluación del efecto de *L. curvatus* sobre la sobrevivencia de *L. monocytogenes* se aplicó un diseño unifactorial completamente al azar teniendo como factor la presencia de *L. curvatus* sobre la sobrevivencia o desarrollo de *L. monocytogenes*. Se aplicó la prueba de Tukey para establecer diferencias con el control sin *L. curvatus*. Se empleó el programa JMP versión 8.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Detección de *L. monocytogenes* y cuantificación de grupos indicadores

Un total de 100 muestras de hongos comestibles fueron analizadas, de las cuales 67 fueron champiñones y 33 fueron setas. Estas se obtuvieron de mercados y supermercados de la ciudad de Querétaro. Ambos alimentos mostraron valores mínimos, máximos y medianas similares en los diferentes grupos microbianos, por ello se decidió analizarlos en conjunto. El Cuadro 4, muestra la distribución de la frecuencia para cada grupo indicador analizado (Bacterias Mesófilas Aerobias o BMA; Bacterias Mesófilas Aerobias positivas o BMA+ y Bacterias Ácido Lácticas o BAL),, encontrando que para las bacterias mesófilas aerobias (BMA) se encontró un máximo de 1.2×10^{12} UFC/50 g de alimento lo que se encuentra por arriba según lo establecido en el apéndice B de la Norma Oficial Mexicana (NOM-093-SSA-1994) (DOF, 1994), donde se reporta que alimentos listos para el consumo y vegetales crudos no debe exceder de 1.5×10^5 UFC/g para la cuenta total de BMA. Cabe señalar que esta norma no considera a las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y no se cuenta con un valor referencia con el cual contrastar. Se incluyó en este estudio buscando si este grupo tuviera alguna asociación con la presencia de *L. monocytogenes*, dado que tienen cercanía taxonómica. Con la misma intención se propuso el grupo de las Bacterias Mesófilas Aerobias Positivas (BMA+) como un posible indicador de la presencia de *L. monocytogenes*.

Cuadro 4. Mínimos, medianas y máximos de microorganismos indicadores en champiñones y setas provenientes de mercados y supermercados de la ciudad de Querétaro.

Grupo indicador	Mínimo	Media UFC/50 g	Máximo
BMA	3.1×10^3	2.9×10^8	1.2×10^{12}
BMA+	1×10^3	1×10^5	1×10^7
BAL	7.9×10^2	7.2×10^4	4.6×10^7

Del total de las muestras analizadas (100), a partir del muestreo en mercados y supermercados, 4 de estas fueron positivas a *L. monocytogenes* lo que corresponde al 4%, 3 de estas muestras provinieron de mercados y 1 de supermercado, lo que sugiere una mejor calidad sanitaria en muestras recolectadas de supermercados que las que fueron recolectadas en mercados locales.

Chen et al. (2018) realizaron un estudio de prevalencia de *L. monocytogenes* en un total de 665 hongos comestibles de diversas variedades incluidas *Agaricus bisporus*, *Pleurotus nebrodensis*, *Auricularia auricula*, *Coprinus comatus*, *Cordyceps militaris*, *Chanterellus sp.*, y *Agrocybe cylindracea* recolectadas de mercados chinos reportando que aproximadamente el 21.10% de sus muestras fueron positivas a este patógeno, esta diferencia entre el porcentaje de positividad de este patógeno en el presente estudio y en el reportado por los autores se pudiera deber a la cantidad y variedad de muestras analizadas, a las condiciones de empaque y al proceso poscosecha que tuvieron. La correlación entre los grupos indicadores y las muestras positivas y negativas a *L. monocytogenes* se muestra en la Figura 4.

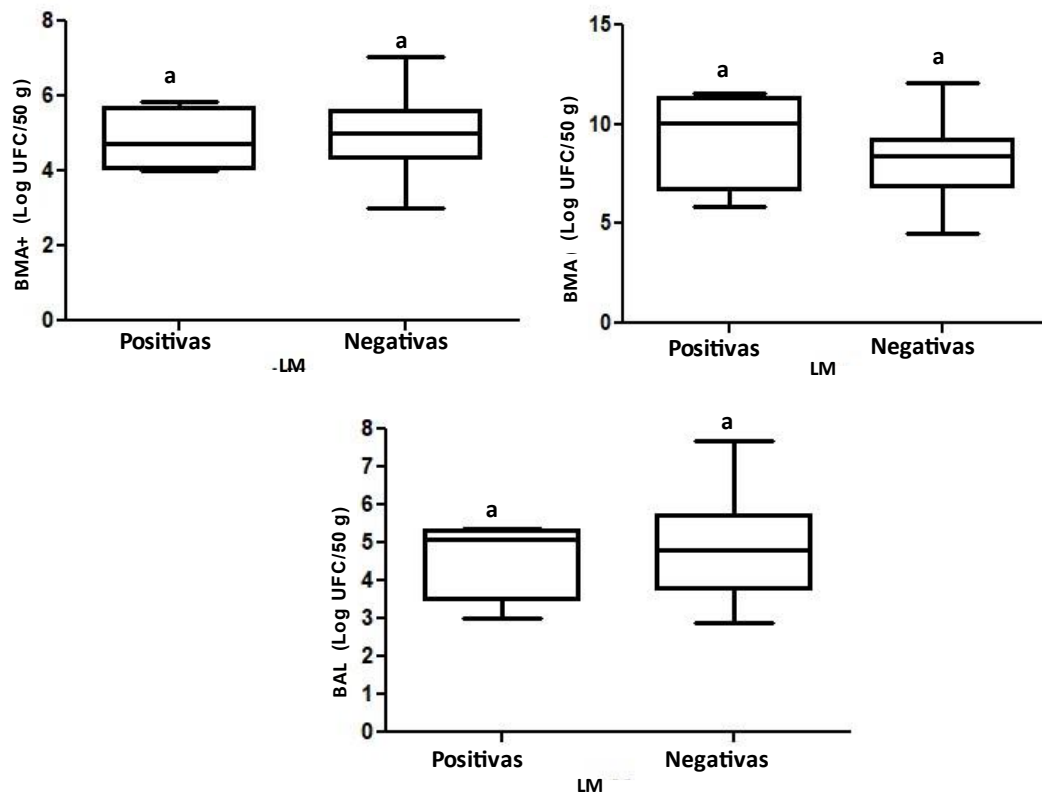


Figura 4. Correlación entre muestras de hongos comestibles positivas y negativas a *Listeria monocytogenes* con grupos indicadores. Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Bacterias Mesófilas Aerobias Positivas (BMA+) y Bacterias Acido Lácticas (BAL). Los resultados se presentan como la media \pm SE. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0.05$) aplicando la prueba de Kruskal-Wallis.

Los resultados no muestran una correlación entre la presencia del patógeno (*L. monocytogenes*) y este grupo indicador. En particular, las BMA pueden multiplicarse a temperaturas de 35 a 37.8 °C en condiciones aeróbicas, y los recuentos altos indican condiciones antihigiénicas en productos expuestos al ambiente o desarrollo por almacenamiento en condiciones que propician la multiplicación bacteriana (Da Silva et al., 2016). En general las bacterias patógenas conocidas presentes en los alimentos son mesófilas aeróbicas (Montevideo & Social, 2014).

Para las BAL y BMA+, estos grupos microbianos se están proponiendo en el presente trabajo como posibles indicadores de la presencia de este patógeno ya que poseen características taxonómicas y morfológicas similares. Las BAL son bacilos cortos Gram positiva, anaerobias facultativas, producen ácido láctico a partir de la glucosa, crecen en ambientes ligeramente ácidos en un rango de pH de 4.5 a 6.5 (Parra, 2010). Este grupo de bacterias comparten todas estas características con *L. monocytogenes* por lo que se pensó que pudiera tener una relación en la presencia de estas y del patógeno; sin embargo, en los resultados obtenidos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y la presencia de *L. monocytogenes*.

A partir de cada grupo indicador se realizó una comparación entre los sitios de muestreo (mercados y supermercados) para observar si había diferencias entre la calidad sanitaria de los champiñones y setas dependiendo del lugar de origen (Figura 5), observándose que no hubo diferencias estadísticamente significativas según el recuento de cada grupo indicador en ambos sitios de muestreo y en ambos tipos de muestra (champiñones y setas). Por lo que podemos concluir que no hay diferencias en la calidad sanitaria de los hongos y setas entre los distintos sitios de muestreo. Esto puede deberse a que independientemente del lugar de comercialización, la calidad sanitaria esté más determinada por el lugar de producción y las prácticas que ocurren. También debe considerarse que el número de muestras es pequeño, tal vez analizando un número mayor de muestras en diferentes épocas del año podrían detectarse algunas diferencias. Estos resultados contrastan con los reportados por Martínez-Carrera et al. (2022) donde reportaron que la calidad de los hongos comestibles es menor en mercados que la que se encuentra en supermercados.

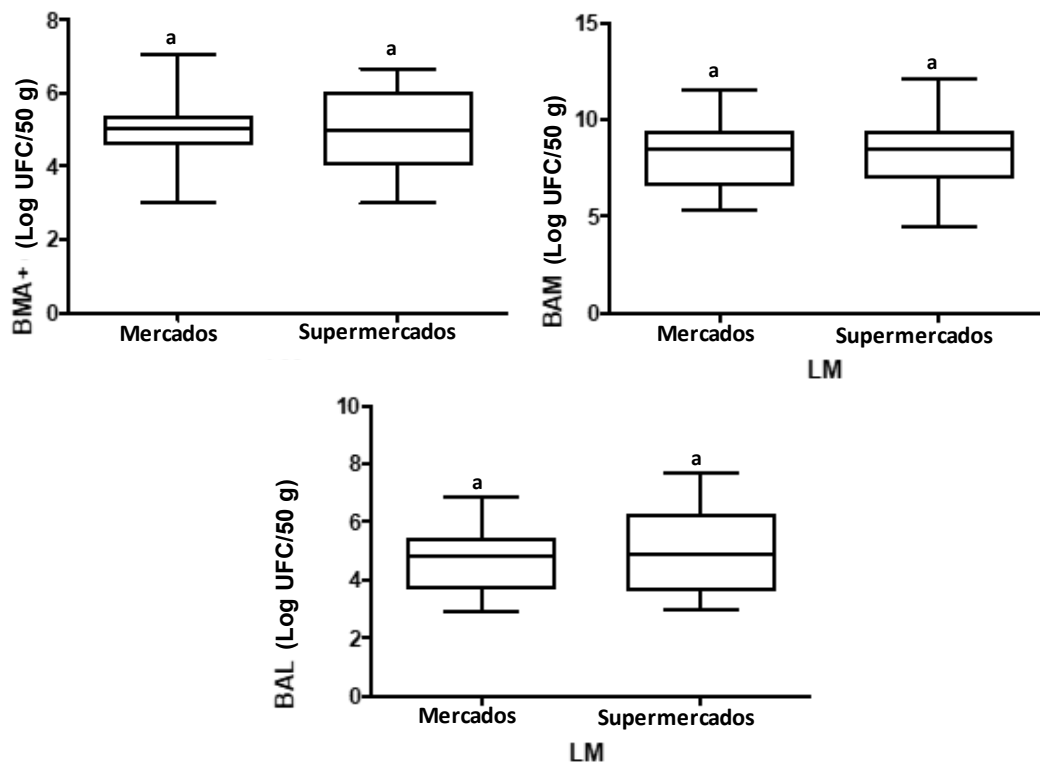


Figura 5. Comparación entre las poblaciones de los grupos indicadores de champiñones y setas que se expenden en mercados y supermercados de la ciudad de Santiago de Querétaro. Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Bacterias Mesófilas Aerobias Positivas (BMA+) y Bacterias Acido Lácticas (BAL). Los resultados se presentan como la media \pm SE de 6 datos. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0.05$) aplicando la prueba de Kruskal-Wallis.

5.2. Evaluación del efecto de *Lactobacillus curvatus* sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* en la superficie de champiñones comestibles.

Se utilizaron las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de los hongos comestibles para preparar dos tipos de inóculo: A) Activaciones sucesivas a 30°C y B) Activación a 10°C para posteriormente inocular los champiñones y aplicar el *L. curvatus*. Se seleccionó la temperatura de activación de 10°C porque se ha señalado que con frecuencia estos alimentos son almacenados a esta temperatura (González-Fandos et al., 2001a). Se seleccionaron dos temperaturas de almacenamiento considerando las dos principales maneras de comercialización (temperatura ambiente y en frío, pero sin llegar a ser refrigeración (4°C). Los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7.

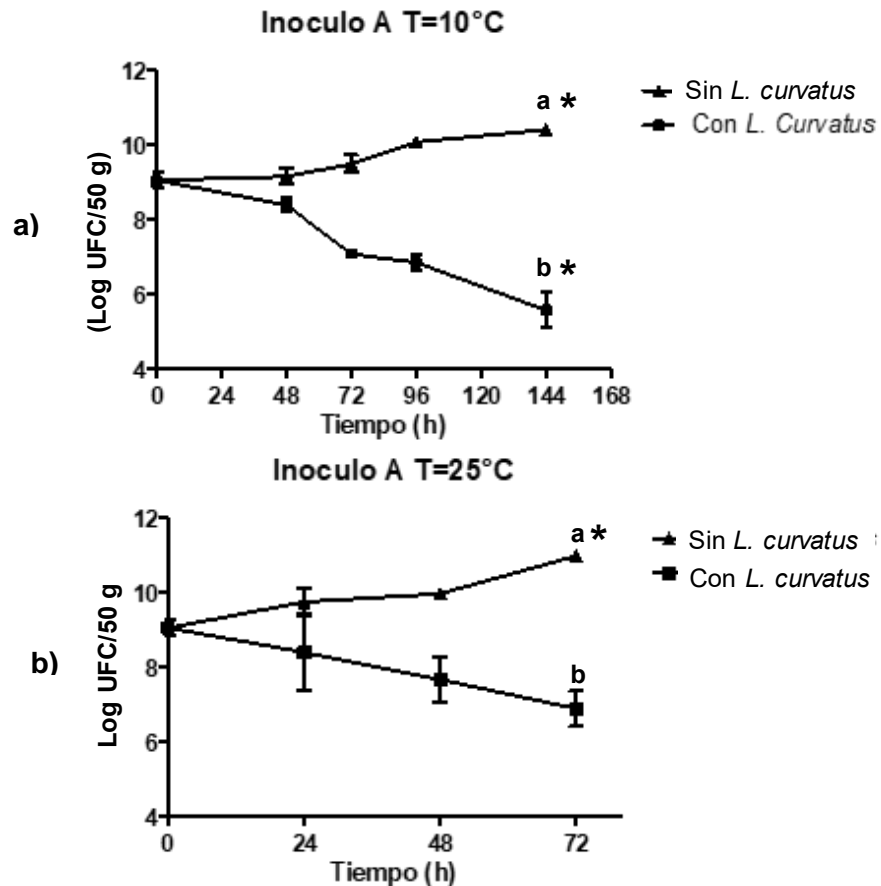


Figura 6. Desarrollo de *Listeria monocytogenes* con inoculo A en presencia de *L. curvatus* a 10 y 25°C. Los resultados se presentan como la media \pm SE. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre muestras con y sin *L. curvatus* y el * representan diferencias de la concentración final con respecto al inicio en cada tratamiento ($\alpha = 0.05$) por la prueba de Tukey.

Se puede observar en la Figura 6a un incremento en la población total de *L. monocytogenes* de aproximadamente 2 logaritmos a las 144 h de incubación con respecto a la concentración inicial ($t=0$) en los champiñones sin *L. curvatus*. Con respecto a los champiñones inoculados con el patógeno y *L. curvatus* se observa un decremento cercano a 3.5 logaritmos con respecto a la concentración en el tiempo cero ($t=0$) a los 144 días de almacenamiento, lo que nos indica que el *L. curvatus* reduce aproximadamente 5.5 logaritmos tomando en cuenta el crecimiento de *L. monocytogenes* en los champiñones a 10°C.

Mientras que en la Figura 6b se observa que el patógeno desarrolla más rápido, de hecho, el estudio solo pudo evaluarse a las 72 h de incubación ya que las muestras mostraron oscurecimiento y deshidratación, por lo cual el experimento en esa condición se detuvo. Se observó un incremento cercano a 2 logaritmos con respecto a la concentración inicial

(t=0), en tanto que en presencia del *L. curvatus* se reportó un decremento de *L. monocytogenes* de un poco más de 3 logaritmos en el mismo periodo de tiempo. El efecto inhibitorio de la aplicación de *L. curvatus* sobre *L. monocytogenes* alcanzaría al menos 4.5 logaritmos en los champiñones a 25°C. Se observó que, en las 72 h de incubación en las dos condiciones, el efecto de *L. curvatus* sobre *L. monocytogenes* es similar, lo cual sugiera que la aplicación de *L. curvatus* puede ser una alternativa viable para el control del patógeno en el alimento a ambas temperaturas.

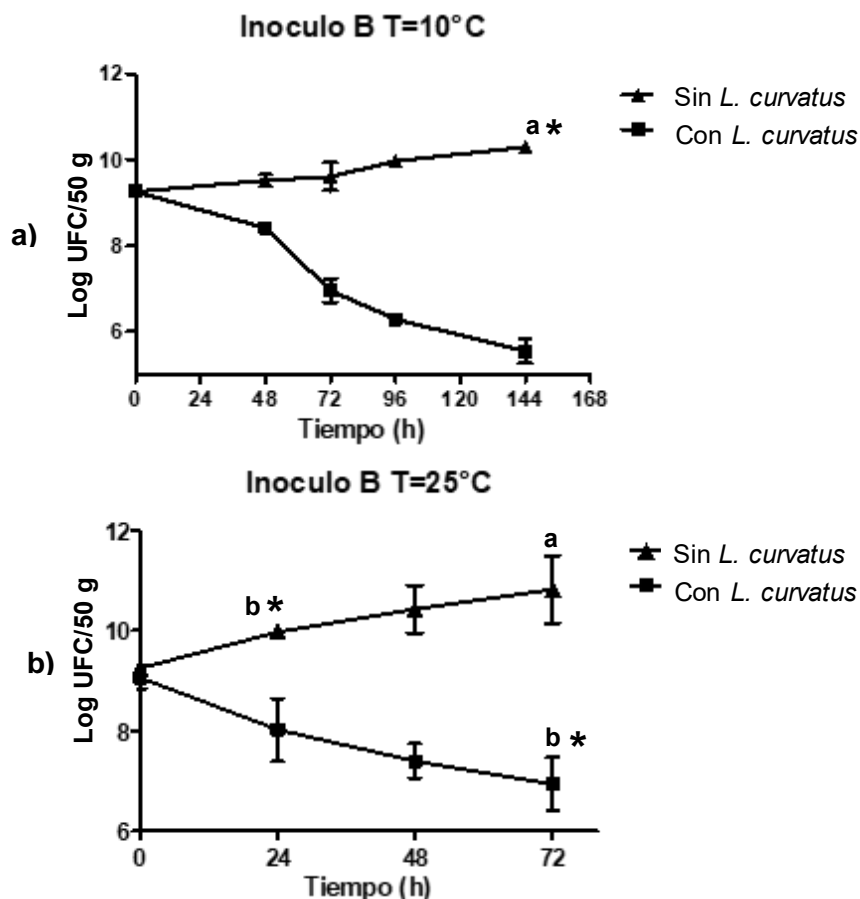


Figura 7. Desarrollo de *Listeria monocytogenes* con inoculo B en presencia de *L. curvatus* a 10 y 25°C. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre muestras con y sin *L. curvatus* y el * representan diferencias de la concentración final con respecto al inicio en cada tratamiento ($\alpha = 0.05$) por prueba de Tukey.

Por el otro lado utilizando el inoculo B bajo 10 o 25°C, se obtuvo un comportamiento similar del patógeno a lo observado para el inóculo A. Tanto el inoculo A como el B representan dos condiciones de las que puede prevenir *L. monocytogenes* cuando ingresa al alimento. Si se ha mantenido en alguna superficie a una baja temperatura o proviene de alguna

fuente a temperatura ambiente. Los resultados indican que independientemente de la temperatura previa, el patógeno es capaz de desarrollarse en el alimento y el *L. curvatus* puede lograr inhibirlo (Figura 7a y b).

González-Fandos et al., (2001) reportaron un crecimiento de 1-2 logaritmos de *L. monocytogenes* durante las primeras 48 h en champiñones frescos empacados y almacenados a 4 y 10°C, esta concentración se mantuvo relativamente constante hasta alcanzar los 8 días de almacenamiento. Sin embargo, Leong et al., (2013) reportaron que *L. monocytogenes* no fue capaz de crecer en champiñones frescos empacados después de 7 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración (10°C).

Se ha reportado el uso de BAL en productos lácteos como los quesos para el control de *L. monocytogenes*, donde se obtuvo una disminución de patógeno de hasta 4 logaritmos después de 7 días de almacenamiento en refrigeración (Coelho et al., 2014). Liu et al., (2008) reportaron que en quesos Cottage utilizando *L. lactis* hubo un decremento de hasta casi 3 logaritmos después de 15 días de almacenamiento en refrigeración. Por su parte, Marques et al., (2017) utilizaron una película que contiene la concentración bactericida mínima de CFS (contiene sustancias similares a la bacteriocina de *L. curvatus*) para el control de *L. monocytogenes* por igual en quesos, donde concluyeron que el lactobacillus logró reducir la concentración del patógeno por debajo del límite de detección (2.7 Log/UFC) en quesos "Prato" durante 10 días de almacenamiento en refrigeración (10°C) siendo la concentración inicial de *L. monocytogenes* inoculada de 4 logaritmos. Estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde bajo las mismas condiciones de refrigeración el patógeno disminuye su crecimiento alrededor de 4 logaritmos; también nos indican que el uso de BAL puede ser un buen método de biocontrol para este patógeno.

5.3. Evaluación de la calidad de hongos comestibles inoculados con *L. curvatus*

Otro aspecto relevante es verificar que los tratamientos antimicrobianos no modifiquen negativamente las características de calidad de los alimentos, por ello se incluyó la evaluación de las principales características de calidad durante el almacenamiento de los champiñones inoculados con el *L. curvatus*.

Los resultados de los parámetros de color obtenidos para hongos inoculados con *L. curvatus* para la temperatura ambiente (T=25°C) tomando en cuenta el periodo de

incubación de los champiñones inoculados con *L. monocytogenes* a esta temperatura, mostraron que la blancura (valor L*) y el valor de la coordenada a* (rojo/verde) no tuvieron un cambio drástico con respecto al control, mientras que los valores de la coordenada b* (amarillo/azul) tuvo una disminución de un poco más de 15% con respecto a su valor inicial. Por otro lado, los parámetros obtenidos para los hongos almacenados a temperaturas de refrigeración (T=10°C) después de 144 h de almacenamiento mostraron que para los valores que representan la blancura (valor L*) y el parámetro b* mantuvieron ligeramente por encima del control; sin embargo, los valores de a* tuvieron un decremento del 35% con respecto al control (Cuadro 5). González-Fandos et al., (2001) reportaron que durante 6 días de almacenamiento no se observaron diferencias significativas en el color entre champiñones almacenados a 4 y 10°C inoculados con *L. monocytogenes*. Con estos parámetros se determinó el índice de pardeamiento (BI) que representa la pureza del color marrón y se considera un parámetro importante asociado con la calidad del champiñón (Kortei et al., 2015) (Figura 8). Este se calculó utilizando L*, a*, b* según Mohammad et al., (2008);

$$\text{Índice de pardeamiento (BI)} = \frac{[100 (x-0.31)]}{0.17}$$

donde:

$$X = \frac{(a^* + 1.75 L^*)}{(5.645L^* + a^* - 3.012b^*)}$$

Cuadro 5. Promedio del cambio en los parámetros de color en champiñones inoculados con *L. curvatus* a temperatura ambiente (25°C) y temperatura de refrigeración (10°C) después de 3 y 6 días de almacenamiento respectivamente.

Parámetro	25°C	Control 25°C	10°C	10°C
ΔL^*	78.26	80.24	80.55	78.62
Δa^*	3.15	3.81	2.54	3.85
Δb^*	19.90	21.21	20.47	20.17

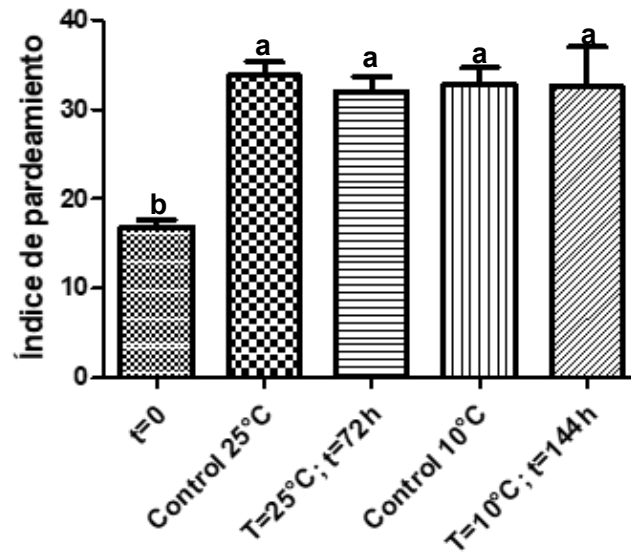


Figura 8. Índice de pardeamiento en champiñones bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Los resultados se presentan como la media \pm SE de 6 datos. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre muestras ($\alpha = 0.05$) por la prueba de *Tukey*.

Se puede observar como el índice de pardeamiento es mayor al término del almacenamiento con respecto al tiempo cero ($t=0$) pero es muy similar entre sus controles, lo que nos indica que *L. curvatus* no afecta en este parámetro de calidad.

Debido a que la enzima fenol peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno, así como también la actividad de la enzima polifenol oxidasa en presencia de oxígeno son factores que ocasionan pardeamiento en la superficie de los champiñones. En el mismo sentido el contenido natural de peróxido de hidrógeno en este alimento es bajo, por lo que se considera que el FPO (Fenólicos libres y Polifenol Oxidasa) es el principal factor en el pardeamiento poscosecha en *Agaricus bisporus*. La enzima responsable del pardeamiento en champiñones es la tirosinasa, que entra en la familia de las FPO, debido a su alto contenido en *Agaricus bisporus* (Zhang et al., 2018).

En la Figura 9 se presenta los cambios en la actividad de agua para cada uno de los tratamientos aplicados a los champiñones. En el estado inicial ($t=0$) se muestra una actividad de agua de casi 0.6, lo que es ligeramente menor en los champiñones sometidos a temperatura ambiente; sin embargo, este tratamiento es muy similar a su control. Por otro lado, en cuanto a los champiñones almacenados bajo temperaturas de refrigeración, se puede observar como el control y los champiñones evaluados al tiempo inicial no

mostraron diferencias en este parámetro, también los champiñones a los cuales se les aplicó *L. curvatus* al final de la prueba no muestran diferencias con respecto a su control. Por lo que podemos concluir que en cuanto a la actividad de agua, no se ve afectada por la presencia de *L. curvatus*. Se ha reportado que la actividad de agua en champiñones secados al aire durante 10 días fue de $0,228 \pm 0,004$, y que por lo tanto champiñones con actividad de agua baja pueden influir en la retención del color, recuento microbiano, conservación de la grasa cruda, entre otros factores (Zhang et al., 2018).

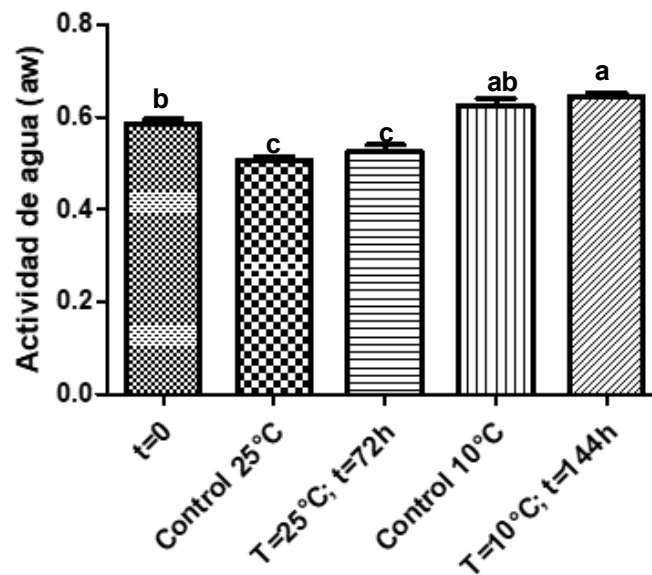


Figura 9. Actividad de agua en champiñones comestibles inoculados con *L. curvatus* bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Los resultados se presentan como la media \pm SE de 6 datos. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre muestras ($\alpha = 0.05$) por la prueba de Tukey.

En la Figura 10 se observan los datos obtenidos para la prueba de dureza en los distintos tratamientos aplicados a los champiñones. Se observa que no hay diferencias entre los tratamientos y sus controles. González-Fandos et al., (2001) realizaron un estudio en champiñones inoculados con *L. monocytogenes* almacenados a 4°C y 10°C, donde reportaron que aquellos que fueron almacenados a 4°C tuvieron mejores características de textura (16.5 N). Estos cambios se deben a que la tasa de respiración de los champiñones disminuye por lo que los cambios en la textura se retrasaron. Sin embargo a 10°C no se mostraron diferencias significativas después de 2 días de almacenamiento (González-Fandos et al., 2001a).

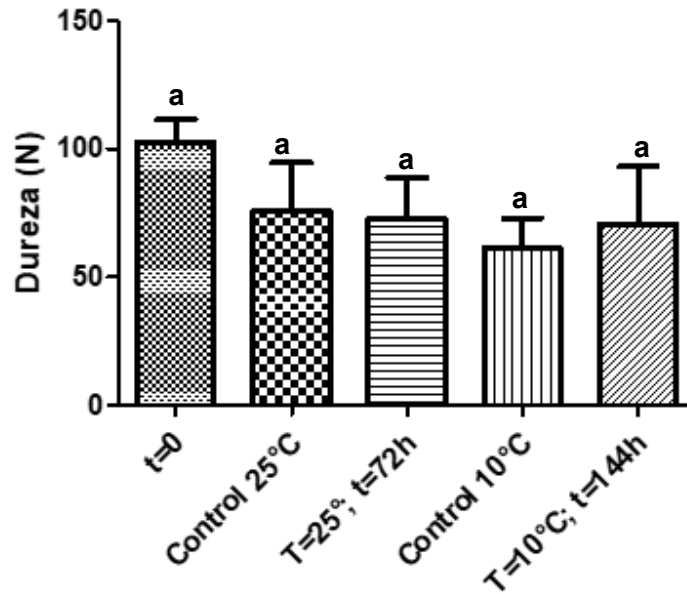


Figura 10. Compresibilidad en champiñones bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Los resultados se presentan como la media \pm SE de 6 datos. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre muestras ($\alpha = 0.05$)

6. CONCLUSIONES

L. monocytogenes está presente en champiñones y setas que se expenden en mercados y supermercados de la ciudad de Querétaro.

L. monocytogenes es capaz de desarrollar en champiñones comestibles durante su almacenamiento a 10 y 25°C, con lo que se incrementa el riesgo para el consumidor.

El uso de un biocontrol como *L. curvatus* es una alternativa viable a otros métodos de control para reducir y controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en champiñones.

L. curvatus no modifica el color, textura y actividad de agua del champiñón durante su aplicación y posterior almacenamiento a 10 y 25°C.

7. REFERENCIAS

- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (2014). *Exploring a possible mutualistic association between hornbills and bacteria living in their uropygial secretions*. View project *Bacteriocins View project Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods*. <https://www.researchgate.net/publication/237438016>
- Aznar, R., & Alarcón, B. (2003). PCR detection of *Listeria monocytogenes*: A study of multiple factors affecting sensitivity. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(5), 958–966. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x>
- Barbado, J. L. (2003). Hongos Comestibles. In *Editorial Albatros*. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=qPykPt-eTTkC&oi=fnd&pg=PA11&dq=hongos+comestibles&ots=_8zYiuLXut&sig=hvQcxW1gV4BMemlbWNJznTNtSuY&redir_esc=y#v=onepage&q=hongos+comestibles&f=false
- Camargo, A. C., Todorov, S. D., Chihib, N. E., Drider, D., & Nero, L. A. (2018). Lactic Acid Bacteria (LAB) and Their Bacteriocins as Alternative Biotechnological Tools to Control *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. *Molecular Biotechnology*, *60*(9), 712–726. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0108-1>
- Cano-Estrada, A., & Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista Chilena de Nutricion*, *43*(1), 75–80. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000100011>
- Castañeda-Ruelas, G., Chaidez-Quiroz, C., Salazar-Jiménez, E. P., Hernández-Chiñas, U., & Eslava-Campos, C. (2018). *Listeria monocytogenes* y la listeriosis, problema de salud pública en México. *Salud Pública de México*, *60*, 376–377.
- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*, 654–654. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342014000600016&lng=es&tIng=es
- CDC. (2012). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado*. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>
- CDC. (2020). *Outbreak of Listeria Infections Linked to Enoki Mushrooms*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html>
- Chen, M., Cheng, J., Wu, Q., Zhang, J., Chen, Y., Zeng, H., Ye, Q., Wu, S., Cai, S., Wang, J., & Ding, Y. (2018). Prevalence, Potential Virulence, and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates From Edible Mushrooms in Chinese Markets. *Frontiers in Microbiology*, *9*(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01711>

- Chen, Y., Liao, M. L., Boger, D. V., & Dunstan, D. E. (2001). Rheological characterization of κ-carrageenan/locust bean gum mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 46, 117–124.
- Chikthimmah, N. (2006). *Microbial ecology of mushroom casing soils and preharvest strategies to enhance safety and quality of fresh mushrooms*. (Issue May). The Pennsylvania State University.
- Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., & Rosa, H. J. D. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>
- Da Silva, D. A. L., Dias, M. R., Cossi, M. V. C., De Castilho, N. P. A., Camargo, A. C., & Nero, L. A. (2016). Hygiene and Safety in the Meat Processing Environment from Butcher Shops: Microbiological Contamination and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 79(4), 628–634. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-482>
- Day, B. P. F. (1992). Guidelines for the Good Manufacturing and Handling of Modified Atmosphere Packed Food Products. *Technical Manual No. 34*. Gloucestershire, UK: Campden & Chorleywood Food Research Association.
- Ding, T., Rahman, S. M. E., & Oh, D. H. (2011). Inhibitory effects of low concentration electrolyzed water and other sanitizers against foodborne pathogens on oyster mushroom. *Food Control*, 22, 318–322.
- Doores, S., Kramer, M., & Beelman, R. (1987). Evaluation and bacterial populations associated with fresh mushrooms (*agaricus bisporus*). In *Developments in Crop Science* (Vol. 10, Issue C, pp. 283–294). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42747-2.50035-X>
- Dygico, L. K., Gahan, C. G. M., Grogan, H., & Burgess, C. M. (2020). The ability of *Listeria monocytogenes* to form biofilm on surfaces relevant to the mushroom production environment. *International Journal of Food Microbiology*, 317(October 2019), 108385. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108385>
- FDA. (2015). Bacteriological Analytical Manual (BAM). In *US Food & Drug Administration - FDA*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- Federación, D. O. de la. (1994). *NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos*.
- Fox, E. M., Wall, P. G., & Fanning, S. (2015). Control of *Listeria* species food safety at a poultry food production facility. *Food Microbiology*, 51, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.002>
- FSAI. (2005). The control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Foods. *Ed. Microbiology*, 94.
- Gaitán-Hernández, R. (2017). *Cultiva hongos comestibles*. Ciencia Hoy.

<https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/2013-06-05-10-34-10/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles>

- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2010). Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Issue 8, pp. 373–382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.010>
- Gaul, L. K., Farag, N. H., Shim, T., Kingsley, M. A., Silk, B. J., & Hyytia-Trees, E. (2013). Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery-texas, 2010. *Clinical Infectious Diseases*, *56*(1), 20–26. <https://doi.org/10.1093/cid/cis817>
- Godinez-Oviedo, A., Nava, G. M., Arvizu-Medrano, S. M., & Hernandez-Iturriaga, M. (2017). An improve protocol for PCR using LM1 and LM2 primers for listeria monocytogenes detection in food matrices. *Polish Journal of Microbiology*, *66*(2), 255–257. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7869>
- González-Fandos, E., Olarte, C., Giménez, M., Sanz, S., & Simón, A. (2001a). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in packaged fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Applied Microbiology*, *91*(5), 795–805. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2001.01452.X>
- González-Fandos, E., Olarte, C., Giménez, M., Sanz, S., & Simón, A. (2001b). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in packaged fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Applied Microbiology*, *91*(5), 795–805. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01452.x>
- Hadjok, C., Mittal, G. S., & Warriner, K. (2008). Inactivation of human pathogens and spoilage bacteria on the surface and internalized within fresh produce by using a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.*, *104*, 1014–1024.
- Hitchins, A. D., Jinneman, K., & Chen, Y. (2017). *Chapter 10: Detection of Listeria monocytogenes in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods*. FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
- Iwu, C. D., & Okoh, A. I. (2020). Characterization of antibiogram fingerprints in *Listeria monocytogenes* recovered from irrigation water and agricultural soil samples. *PLoS ONE*, *15*(2), e0228956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228956>
- Kader, A. A. (2002). Quality parameters of fresh-cut fruit and vegetable products. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market*. <https://doi.org/10.1201/9781420031874.ch2>
- Kim, S. W., Haendiges, J., Keller, E. N., Myers, R., Kim, A., Lombard, J. E., Karns, J. S., Van Kessel, J. A. S., & Haley, B. J. (2018). Genetic diversity and virulence profiles of *Listeria monocytogenes* recovered from bulk tank milk, milk filters, and milking equipment from dairies in the United States (2002 to 2014). *PLoS ONE*, *13*(5), 1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197053>

- Kortei, N. K., Odamtten, G. T., Obodai, M., Appiah, V., Akonor, P. T., & Ae, B. (2015). *Determination of color parameters of gamma irradiated fresh and dried mushrooms during storage*. *10*, 66–71.
- Koutsoumanis, K., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jordan, K., Sampers, I., Wagner, M., ... Allende, A. (2020). The public health risk posed by listeria monocytogenes in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. *EFSA Journal*, *18*(4), 1–102. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6092>
- Lee, Y., Yoon, Y., Seo, Y., Kim, S., Ha, J., Lee, J., Choi, Y., Oh, H., Kim, Y., Kang, J., Park, E., Kim, W. Il, & Lee, S. (2020). Combined Enrichment and Quantitative Polymerase Chain Reaction to Improve Sensitivity and Reduce Time of Detection of *Listeria monocytogenes* in Mushrooms. *Foodborne Pathogens and Disease*, *17*(4), 276–283. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2688>
- Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A., Guillas, F., & Jordan, K. (2013). Determination of listeria monocytogenes growth during mushroom production and distribution. *Foods*, *2*(4), 544–553. <https://doi.org/10.3390/foods2040544>
- Letchumanan, V., Wong, P. C., Goh, B. H., Ming, L. C., Pus-Parajah, P., Wong, S. H., Mutalib, N. S. A., & Lee, L. H. (2018). A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria*. *Progress in Microbes and Molecular Biology*, *1*(1). <https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000007>
- Little, C. L., Pires, S. M., Gillespie, I. A., Grant, K., & Nichols, G. L. (2010). Attribution of human listeria monocytogenes infections in England and wales to ready-to-eat food sources placed on the market: Adaptation of the hald salmonella source attribution model. *Foodborne Pathogens and Disease*, *7*(7), 749–756. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0439>
- Liu, L., O’Conner, P., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2008). Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin a by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(4), 1059–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03640.x>
- Lomonaco, S., Verghese, B., Gerner-Smidt, P., Tarr, C., Gladney, L., Joseph, L., Katz, L., Turnsek, M., Frace, M., Chen, Y., Brown, E., Meinersmann, R., Berrang, M., & Knabel, S. (2013). Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(1), 147–150. <https://doi.org/10.3201/eid1901.121167>
- Loo, A. (2017). *Comportamiento de Salmonella spp. y Listeria monocytogenes adheridas a jitomate cherry y su tolerancia a desinfectantes*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Marques, J. de L., Funck, G. D., Dannenberg, G. da S., Cruxen, C. E. dos S., Halal, S. L.

- M. El, Dias, A. R. G., Fiorentini, Â. M., & Silva, W. P. da. (2017). Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Microbiology*, 63, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>
- Martí, C. I. (2008). *Listeriosis por Listeria monocytogenes: un reto para la Salud Pública*. Madrimasd. http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2008/09/01/99837
- Martínez-Carrera, D., & Mayett-Moreno, Y. (2016). *Estrategias para promover el consumo de hongos comestibles en México, con base en sus propiedades funcionales y medicinales*. (1st ed., p. 781). Editorial del Colegio de Posgrados-AMC-CANACYT-UPAEP-IMINAP.
- Martínez-Carrera, D., Mayett-Moreno, Y., & Maimone Celorio, M. R. (2022). *Los hongos comestibles, Funcionales y Medicinales: Aportación a la Dieta, la Salud, la Cultura, al Ambiente y al Sistema Agroalimentario de México*.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W., & Mayett, Y. (2022). Los hongos comestibles, funcionales y medicinales Aportación a la dieta, la salud, la cultura, al ambiente, y al sistema agroalimentario de México. *Agroproductividad*, 1–18.
- Martínez-Carrera, D., Sobal, M., A., Navarro, A., M., Bonilla, M., & Larqué-Saavedra, A. (1998). Canning technology as an alternative for management and conservation of wild edible mushrooms in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl*, 11, 35–51.
- Mayett-Moreno, Y., & Oglesby, J. M. L. (2018). Beyond food security: Challenges in food safety policies and governance along a heterogeneous agri-food chain and its effects on health measures and sustainable development in Mexico. *Sustainability (Switzerland)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/su10124755>
- McMullen, P. D., & Freitag, N. E. (2014). *Listeria monocytogenes*. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vols. 2–3, pp. 1345–1361). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00074-3>
- Medina-Torres, L., Brito-De la Fuente, E., Torrestiana-Sánchez, B., & Alonso, A. (2003). Mechanical properties of gels formed by mixtures of mucilage gum (*Opuntia ficus indica*) and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 52, 143–150.
- Mohammad, A., Rafiee, S., Emam-Djomeh, Z., & Keyhani, A. (2008). Kinetic Models for Colour Changes in Kiwifruit Slices During Hot Air Drying. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), 376–383. [file:///C:/Users/Lg x120/Downloads/15-libre.pdf](file:///C:/Users/Lg%20x120/Downloads/15-libre.pdf)
- Montevideo, I. De, & Social, D. (2014). *Indicadores microbiológicos en alimentos*. 598, 5–7.
- Muñoz, A. I. (2012). Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009. *Biomedica*, 32(3), 408–417. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.709>
- PARRA HUERTAS, R. A. (2010). REVIEW. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS: PAPEL

FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es

- Pennone, V., Lehardy, A., Coffey, A., McAuliffe, O., & Jordan, K. (2018). Diversity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from *Agaricus bisporus* mushroom production. *Journal of Applied Microbiology*, 125(2), 586–595. <https://doi.org/10.1111/jam.13773>
- Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2019). Microbe profile: *Listeria monocytogenes*: A paradigm among intracellular bacterial pathogens. *Microbiology (United Kingdom)*, 165(7), 719–721. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000800>
- Roncero-Ramos, I. (2015). Propiedades Nutricionales y saludables de los hongos. *Centro Tecnológico de Investigación Del Chapiñon de La Rioja (CETICH)*, 12–23.
- Sánchez, C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 64, Issue 6, pp. 756–762). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1569-7>
- Santa Catarina Del Monte, D., MÉXICO B Arteaga Martínez, E. DE, & Moreno Zárate, C. (2006). LOS HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES THE EATABLE MUSHROOM OF SANTA CATARINA DEL MONTE, MEXICO STATE SUMMARY. In *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* (Vol. 12, Issue 2).
- Sapers, G. M., Miller, R. L., Pilizota, V., & Kamp, F. (2001). Shelf-life extension of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors. *J. Food Sci*, 66, 362–366.
- Sauer, J.-D., Herskovits, A. A., & O’Riordan, M. X. D. (2019). Metabolism of the Gram-Positive Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*. In *Gram-Positive Pathogens* (pp. 864–872). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch54>
- Shrivastava, S. (2011). *Listeria* Outbreak -- Bacteria Found in Romaine Lettuce: FDA. *International Business Times*, 1–9. <https://www.ibtimes.com/listeria-outbreak-bacteria-found-romaine-lettuce-fda-320544>
- Silva S., R., Fritz, C., Cubillos, J., & Díaz, M. (2010). Utilización de desechos de podas del arbolado urbano como sustrato para la producción de hongos comestibles en la comuna de La Pintana. *Proyecto CONAMA-FPA*.
- Smith, B., Larsson, J. T., Lisby, M., Müller, L., Madsen, S. B., Engberg, J., Bangsborg, J., Ethelberg, S., & Kemp, M. (2011). Outbreak of listeriosis caused by infected beef meat from a meals- on- wheels delivery in Denmark 2009. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), 50–52. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03200.x>
- Stahnke, L. H., Hornbaek, T., & Jelle, B. (2008). A new lactic acid bacteria strain and its use for the protection of food products. In *Chr Hansen AS*. <https://doi.org/10.1128/JB.06416-11>
- Stiles, M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70,

331–345.

- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. In *Microbes and Infection* (Vol. 9, Issue 10, pp. 1236–1243). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. In *Journal of Food Protection* (Vol. 65, Issue 4, pp. 709–725). IAMFES. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.4.709>
- Venturini, M. E., Reyes, J. E., Rivera, C. S., Oria, R., & Blanco, D. (2011). Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food Microbiology*, 28(8), 1492–1498. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.007>
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista Chilena de Infectología*, 30(4), 407–416. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v30n4/art10.pdf>
- Warriner, K., & Namvar, A. (2009). What is the hysteria with *Listeria*? In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 20, Issues 6–7, pp. 245–254). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.03.008>
- Zhang, K., Pu, Y. Y., & Sun, D. W. (2018). Recent advances in quality preservation of postharvest mushrooms (*Agaricus bisporus*): A review. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.012>

