



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“IDENTIFICACIÓN DEL HONGO CAUSANTE DEL DETERIORO  
POSCOSECHA EN PIMIENTO MORRÓN (*Capsicum annuum* L.) Y SU  
INFLUENCIA EN EL COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS  
PATÓGENOS EN LA SUPERFICIE DEL FRUTO”**

**TESIS**

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

**Presenta:**

Q.F.B. Dulce Esther Avila Vega

**Dirigido por:**

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE 2010



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**"Identificación del hongo causante del deterioro poscosecha en pimiento morrón  
(*Capsicum annuum* L.) y su influencia en el comportamiento de microorganismos  
patógenos en la superficie del fruto"**

**TESIS**

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

**Presenta:**

Q.F.B. Dulce Esther Avila Vega

**Dirigido por:**

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

**SINODALES**

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Presidente

Dr. Ramón A. Martínez Peniche  
Secretario

Dr. Eduardo Fernández Escartín  
Vocal

Dra. Sofia María Arvizu Medrano  
Suplente

M en C. Beatriz Liliانا Álvarez Mayorga  
Suplente

Q.B. Magali Aguilar Ortiz  
Director de la Facultad de Química

  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma  
Dr. Luis G. Hernández Sandoval  
Director de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

Una empresa productora de pimiento por técnica de hidroponía en México, detectó un daño en el pedúnculo y el cáliz del fruto. Las pérdidas poscosecha debido a estos daños se estimaron en 30,000 dólares en 2008. La presencia de este hongo en pimiento morrón puede ser un factor que influya en el establecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) aislar e identificar al hongo causante del deterioro del pimiento morrón, 2) determinar la distribución de los posibles reservorios del hongo(s) dentro de la empresa, y 3) evaluar el efecto de la presencia del hongo en el comportamiento de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en la superficie del pimiento morrón. Durante nueve meses se colectaron 1144 muestras (pimiento morrón, materiales diversos, solución hidropónica, superficies y equipo). Se cuantificaron microorganismos indicadores (bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT), hongos/levaduras (HL) y *Escherichia coli*, y se determinó la presencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. Se evaluó el comportamiento de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* a 22 y 10°C en la superficie del pimiento en ausencia y presencia del hongo deteriorador. Los hongos aislados de pimientos deteriorados se identificaron como *Fusarium stilboides* y *Rhizopus stolonifer*. En pimiento morrón los niveles de BMA, CT y HL fueron de 5.3, 3.7 y 5.7 Log UFC/pimiento, respectivamente. *E. coli* estuvo presente en pimiento (5%) y solución hidropónica (33%). *Salmonella* se detectó en pimiento morrón (3%) y en superficies de empaque (2%). El género *Listeria* se recuperó en el 12 y 25% de las muestras de pimiento morrón y fibra de coco, respectivamente, mientras que *L. monocytogenes* no se detectó en ninguna muestra. *Salmonella* y *L. monocytogenes* sobrevivieron en la superficie del pimiento morrón durante 14 días de almacenamiento a 10 y 22°C; al final del estudio los niveles de ambos patógenos oscilaron entre 5 Log UFC/g a 22°C y 4 Log UFC/g a 10°C. Los resultados mostraron que la contaminación esporádica puede ocurrir y dar lugar a la presencia de patógenos como *Salmonella* en los pimientos morrón cultivados en el invernadero estudiado. La capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en la superficie del fruto puede significar un riesgo para el consumidor. La capacidad de *Salmonella* de sobrevivir en el fruto podría ser mejorada por la presencia de *Fusarium stilboides* causante del deterioro en pimiento.

**(Palabras clave:** *Fusarium stilboides*, *Capsicum annuum* L., invernadero)

## SUMMARY

In bell peppers produced in Mexican greenhouses a damage in the stem and calyx of the fruit was detected. The post-harvest losses due to this damage were estimated in 30,000 dollars in 2008. Additionally, the presence of this mold on the surface of bell pepper could be a factor promoting the establishment of pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. The objectives of this study were 1) to isolate and identify the mold(s) causing the damage to bell peppers, 2) to determine the distribution of potential reservoirs of mold(s) within the company, and 3) to evaluate the effect of the presence of this mold on the behavior of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* on the surface of bell pepper. During nine months, 1144 samples were collected (bell pepper, materials, hydroponic solution, surfaces and equipment). Indicator microorganisms were quantified (aerobic plate count (APC), total coliforms (TC), molds and *Escherichia coli*), and the presence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp were determined. The behavior of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* on the surface of bell pepper at 22 and 10 °C in the absence and presence of the mold (causing the damaged) were studied. The molds isolated from damaged bell peppers were identified as *Fusarium stilboides* and *Rhizopus stolonifer*. In bell pepper the levels of APC, TC and molds were 5.3, 3.7 and 5.7 Log CFU / pepper, respectively. *E. coli* was detected on peppers (5%) and hydroponic solution (33%). *Salmonella* was recovered in bell pepper (3%) and conveyor belts in the packing area (2%). The genus *Listeria* was recovered in 12 and 25% of the samples of bell pepper and coconut fiber, respectively, whereas *L. monocytogenes* was not detected in any sample. *Salmonella* and *L. monocytogenes* survived on the surface of pepper for up to 14 days of storage at 10 and 22°C, at the end of the study the levels of both pathogens ranged from 5 log CFU/ pepper at 22°C and 4 log CFU / pepper at 10°C. The results showed that sporadic contamination can occur and lead to the presence of pathogens such as *Salmonella* on the peppers grown in the greenhouse studied. *Salmonella* and *L. monocytogenes* can survive on bell peppers, representing a health risk to the consumer. The ability of *Salmonella* to survive on the fruit could be enhanced by the presence of *Fusarium stilboides*, fungus responsible of the bell pepper decay.

(**Keywords:** *Fusarium stilboides*, *Capsicum annuum* L., greenhouse.)

## DEDICATORIAS

*A Dios, por estar conmigo en todo momento y darme fortaleza, voluntad y perseverancia para cumplir mis sueños.*

*A mi familia, que con su cariño y amor me enseñan a ser mejor persona.*

*A Juan, por su amor, apoyo, comprensión y entusiasmo para que yo pudiera realizar esta meta.*

*Cuando entre la sabiduría en tu corazón  
y la ciencia sea dulce para tu alma,  
velará sobre ti la reflexión  
y la prudencia te guardará.  
(Proverbios 2,10-11)*

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A CONACYT por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de posgrado.
- ❖ A la empresa productora implicada en esta investigación, por darme las facilidades y confianza para la realización de este trabajo.
- ❖ A la Dra. Montse, por enseñarme con su ejemplo, que la sencillez, la humildad, la responsabilidad e inteligencia son herramientas básicas para lograr mis objetivos pero sobre todo por brindarme su amistad.
- ❖ Al comité de evaluador por sus comentarios, participación y señalamientos hacia este trabajo.
- ❖ Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos, donde pase muchas horas que me permitieron conocer a personas muy valiosas para mi, tanto personal como profesionalmente y que sin su compañía y apoyo este trabajo no podría haberse realizado; gracias a MC Betty, Dra. Sofi, Chuy (Primo), Dany, Pablo, Jessy, Fany, Fer, Sra. Martha, Brenda y Fer Mejía.
- ❖ Al Laboratorio de Poscosecha a cargo del Dr. Peniche y a mis compañeras y amigas Aurora y Berenice por apoyarme incondicionalmente en esta investigación, porque juntas aprendimos a colaborar e intercambiar conocimientos para tener un mejor desempeño.
- ❖ A mis amigas con las que inicié Erika, Ana y Gaby que con su apoyo y amistad salimos adelante en la Maestría. A todos mis compañeros de la generación 2008-2010 porque siempre me hicieron sentir acompañada y apoyada a lo largo de mi estancia en la UAQ.
- ❖ A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su colaboración en la identificación de los hongos deterioradores.

# ÍNDICE

	Página
<b>Resumen</b>	<b>I</b>
<b>Summary</b>	<b>II</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>IV</b>
<b>Índice</b>	<b>V</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>VIII</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>IX</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1 Microbiología de frutas y hortalizas.	3
2.2 Enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas.	5
2.3 Fuentes y mecanismos de contaminación en frutas y hortalizas.	6
2.4 Generalidades de Pimiento.	8
2.4.1 Enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos en el pimiento.	9
2.4.1.1 Enfermedades de la plántula.	10
2.4.1.2 Mancha bacteriana.	10
2.4.1.3 Tizón del tallo.	10
2.4.1.4 Pudrición de la punta de floración.	11
2.4.1.5 Antracnosis.	11
2.4.1.6 Pudrición del fruto.	11
2.4.1.7 Marchitez.	11
2.4.1.8 Pudrición blanda o suave.	12
2.4.2 Comportamiento de microorganismos patógenos de interés sanitario en pimiento.	12
2.4.3 <i>Salmonella</i>	13
2.4.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2.5 Estrategias para el control de la contaminación microbiana en productos hortofrutícolas.	16
2.5.1 Desinfección.	16

2.5.2 Métodos biológicos (Biocontrol).	17
2.5.3 Buenas prácticas agrícolas en el campo y empaque.	18
2.5.4 Análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC).	19
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivo general.	23
4.2 Objetivos específicos.	23
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
5.1 Descripción de la empresa productora y exportadora de pimiento morrón.	24
5.2 Aislamiento e identificación del agente etiológico de la infección del pimiento morrón.	25
5.2.1 Recolección de muestras con daño para aislamiento del hongo.	25
5.2.2 Aislamiento del hongo deteriorador.	25
5.2.3 Identificación microscópica.	26
5.2.4 Identificación bioquímica.	26
5.2.5 Reproducción del daño en pimiento morrón.	27
5.3 Detección y distribución de posibles reservorios y fuentes de contaminación del hongo (s) problema, <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	27
5.3.1 Plan de muestreo.	27
5.3.2 Análisis microbiológico.	29
5.3.3 Detección y aislamiento de coliformes y <i>E.coli</i> por la técnica de número más probable (NMP).	30
5.3.4 Muestreo de aire.	30
5.3.5 Detección y aislamiento de <i>Salmonella</i> por el método tradicional.	31
5.3.6 Detección y aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> por el método tradicional.	31
5.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	32
5.4 Comportamiento en pimiento morrón de <i>Salmonella</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en ausencia y presencia de <i>F. stilboides</i> .	33
5.4.1 Material Biológico.	33

5.4.2 Activación de la cepas de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	34
5.4.3 Preparación de inóculo.	34
5.4.4 Inoculación de pimientos.	34
5.4.5 Recuento de células.	35
5.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico.	36
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUCIÓN</b>	<b>37</b>
6.1. Descripción de las instalaciones y de las prácticas realizadas en los invernaderos.	37
6.2 Aislamiento e identificación del hongo deteriorador del pimiento morrón durante poscosecha.	40
6.3 Aislamiento e identificación de <i>Fusarium</i> y <i>Rhizopus</i> en materiales relacionados con el cultivo, cosecha y almacenamiento de pimiento morrón.	45
6.4 Incidencia de microorganismos indicadores en pimiento y materiales asociados a su cultivo y empaque.	46
6.4.1 Pimiento morrón	48
6.4.2 Incidencia de bacteria indicadoras, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i> en materiales asociados al cultivo de pimiento morrón.	52
6.4.3 Incidencia de bacterias mesófilas aerobias y hongos en el aire de invernadero y cámara fría.	55
6.4.4. Incidencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA's), coliformes totales (CT), fecales (CF), y <i>E. coli</i> en agua y solución hidropónica.	56
6.4.5 Incidencia de bacterias indicadoras, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i> en bandas de empacado.	60
6.5 Efecto de la temperatura en el comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> spp. en la superficie de pimiento morrón.	63
6.6 Efecto de la presencia de <i>Fusarium stilboides</i> en el comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> spp. a 10°C.	66
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	<b>74</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Incidencia de <i>Salmonella</i> en el periodo 1992-2002. Datos de CDC 2003.	14
2	Componentes de un proceso de prevención de riesgos a la salud durante el cultivo de frutas y hortalizas.	18
3	Montaje de las plantas de pimiento morrón en invernadero hidropónico.	24
4	Reproducción del daño en pimientos morrón.	40
5	Imágenes macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium stilboides</i> obtenidas de la base de datos de Biolog MicroStation™	41
6	Imágenes macroscópicas y microscópicas de <i>Rhizopus stolonifer</i> obtenidas de la base de datos de Biolog MicroStation™	41
7	Identificación mediante PCR de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de Chile pimiento morrón.	51
8	Transporte y etiquetado de pimiento morrón sobre bandas transportadoras.	60
9	Comportamiento de <i>Salmonella</i> spp. en superficie de pimiento morrón rojo a 22 y 10°C y HR de 100%.	64
10	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en superficie de pimiento morrón rojo a 22 y 10 °C y HR de 100%.	65
11	Izquierda: Recuento de inóculo inicial de <i>F. stilboides</i> en APD. Derecha: Recuento de <i>F. stilboides</i> durante los 14 días de almacenamiento en APD.	67
12	Comportamiento de <i>F. stilboides</i> en superficie de pimiento morrón a 10°C y HR de 100%. (a) tiempo en el cual se inocularon los dos microorganismos patógenos.	67
13	Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en superficie de pimiento morrón rojo a 10°C y HR de 100% en presencia y ausencia de <i>F. stilboides</i> . Las curvas fueron ajustadas mediante el programa DMfit.	68
14	Comportamiento de <i>Salmonella</i> spp. en superficie de pimiento morrón rojo a 10°C y HR de 100% en presencia y ausencia de <i>F. stilboides</i> . Las curvas fueron ajustadas mediante el programa DMfit.	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Áreas de muestreo en la empresa.	<b>28</b>
<b>2</b>	Preparación de muestras para su análisis microbiológico.	<b>29</b>
<b>3</b>	Condiciones de amplificación para <i>Salmonella</i> .	<b>32</b>
<b>4</b>	Condiciones de amplificación para <i>L. monocytogenes</i> .	<b>33</b>
<b>5</b>	Número total de muestras, recuperadas de la empresa productora de pimiento morrón.	<b>39</b>
<b>6</b>	Hongos aislados e identificados en diversos materiales, aire y chile colectados en la empresa productora de chile pimiento morrón.	<b>45</b>
<b>7</b>	Medias de BMA, CT y H/L en chile pimiento morrón en los tres periodos de muestreo.	<b>48</b>
<b>8</b>	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i> en superficie de pimiento morrón producido en invernadero hidropónico.	<b>50</b>
<b>9</b>	Medias de BMA, CT y H/L en materiales relacionados con el cultivo y cosecha de pimiento morrón en los tres periodos de muestreo.	<b>54</b>
<b>10</b>	Incidencia de <i>Salmonella</i> , <i>Listeria spp</i> y <i>L. monocytogenes</i> en materiales asociados al cultivo de pimiento morrón.	<b>55</b>
<b>11</b>	Medias de BMA y H/L en aire de invernadero y cámara fría de almacenamiento en los tres periodos de muestreo.	<b>56</b>
<b>12</b>	BMA en agua y solución hidropónica colectada en el invernadero.	<b>58</b>
<b>13</b>	Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en agua y solución hidropónica en la empresa productora de pimiento morrón.	<b>59</b>
<b>14</b>	Incidencia y concentración de <i>E. coli</i> en agua y solución hidropónica utilizada para el cultivo de pimiento morrón.	<b>60</b>
<b>15</b>	Medias de BMA, CT y H/L en bandas de empaçado en tres periodos de muestreo.	<b>61</b>
<b>16</b>	Incidencia de <i>Salmonella</i> , <i>Listeria spp</i> y <i>L. monocytogenes</i> en bandas transportadoras de pimiento morrón en la zona de empaçado.	<b>62</b>
<b>17</b>	Velocidad de muerte de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> en chiles pimiento morrón almacenados a 10°C y 22°C.	<b>65</b>
<b>18</b>	Incidencia de <i>Salmonella</i> en frutos sanos y con daño causado por hongos (fuente: Wells and Butterfield, 1999).	<b>70</b>
<b>19</b>	Velocidad de muerte de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> en presencia y ausencia de <i>F. stilboides</i> a una temperatura de 10°C y humedad relativa del 100%.	<b>71</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La evolución en los sistemas de producción agrícola en los últimos años ha derivado en métodos de control de enfermedades en frutas y hortalizas más racionales y respetuosas del medio ambiente. La problemática de los cultivos hortícolas, su rápida evolución y dinamismo y las exigencias de los mercados, han hecho necesario un esfuerzo para adecuar las técnicas de producción a las nuevas prácticas agronómicas y de control de plagas y enfermedades. El hecho de que productores de frutas y hortalizas, como el caso del chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.), provenientes de otros países se establezcan en México, hace que en este sector surja el interés por mejorar la producción y evitar al máximo pérdidas monetarias al reducir riesgos en sus empresas.

El cambio en la dieta hacia el consumo de más frutas y hortalizas frescas y la globalización del mercado, ha traído como consecuencia el incremento en el número de enfermedades relacionadas con productos frescos (Tauxe y col., 1997).

Si bien los productos de origen animal son los vehículos más comunes en los brotes de salmonelosis (FDA, 2001), el consumo de frutas y hortalizas crudas muestra una participación creciente entre los alimentos implicados en brotes (Beuchat, 1996). En Estados Unidos se reportó un brote entre los meses de abril y agosto del 2008 por *Salmonella* Saintpaul diagnosticada en 1407 personas en 43 estados. El alimento implicado fue chile jalapeño y serrano cultivados en un rancho en México, y el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) concluyó que el brote fue derivado del consumo de chiles crudos contaminados (Maki, 2009).

Derivado del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) la exportación de hortalizas de México a Estados Unidos se ha catalogado como un negocio en franca expansión. México es el principal abastecedor de frutas y hortalizas al mercado de ese país. Entre los productos que se exportan destacan el pimiento morrón, pepino y jitomate. La exportación de pimiento morrón a Estados Unidos ha crecido más de cuatro veces en el periodo de 1996-2006 (FOCIR, 2008).

En una empresa mexicana localizada en estado de Querétaro productora de chile pimiento morrón se detectó un daño en el pedúnculo y el cáliz del fruto en poscosecha causando pérdidas de hasta 30,000 dólares en 2008. La presencia de este hongo en el chile puede ser un factor que influya en el establecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, trayendo como consecuencia la solicitud de cooperación del área científica para poder identificar los riesgos microbiológicos y tomar medidas para obtener un producto de buena calidad e inocuo que permita su exportación y venta nacional, para finalmente llegar a manos del consumidor.

La participación de microorganismos deterioradores en frutos y hortalizas han traído como consecuencia que los productores tengan pérdidas monetarias importantes; se hace necesario considerar que el desarrollo de estos microorganismos deterioradores como los hongos puede favorecer el establecimiento de microorganismos patógenos, debido a que los hongos podrían permitir un exposición de nutrientes debido a que sus enzimas pectinolíticas pueden destruir la pared del fruto y dejar expuestos los nutrientes para que otro tipo de microorganismos los aprovechen y favorezcan su establecimiento.

Es por esto que la colaboración del sector científico como es el caso del laboratorio de inocuidad microbiana de los alimentos del Programa de Posgrado de Alimentos del Centro de la República con la industria es importante ya que en conjunto se pueden aplicar los conocimientos generados para obtener un beneficio tanto económico gracias a la reducción de pérdidas en la producción por el rechazo del producto debido al deterioro; como un avance en la calidad del producto mejorando su condición microbiológica y reduciendo riesgos a la salud del consumidor debido a la presencia de microorganismos patógenos.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Microbiología de frutas y hortalizas

La población microbiana en frutas y hortalizas se localiza fundamentalmente sobre sus partes externas, que por lo general corresponde a la que existe en el entorno (Fernández, 2008).

Se designa como “filo plano” a la interface entre la hoja y su entorno. La parte más externa corresponde a la cutícula constituida por una matriz de polímeros polisacáridos y ceras. Funcionalmente es una barrera efectiva que evita la pérdida de agua; las ceras son muy resistentes a la acción de microorganismos, aunque algunos hongos muestran capacidad para degradarlas, lo que les da carácter de fitopatógenos (Mandrell y col., 2006).

La presencia de microorganismos patógenos está determinada por las prácticas culturales que se sigan en la fertilización de la tierra y las condiciones sanitarias prevalentes durante el cultivo y la cosecha de los productos. Pueden identificarse diversos microorganismos intestinales: bacterias, virus, quistes y huevecillos de parásitos. Su origen se localiza en el uso de aguas negras para riego, fecalismo al aire libre, acceso a animales domésticos o de crianza o uso de desechos animales como abono y los factores ambientales (Fernández-Escartín, 2008).

Entre las bacterias más comunes en las verduras predominan los bacilos gram negativos aerobios, como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas* spp.; destacan entre los gram positivos *Lactobacillus* spp., *Enterococcus*, *Bacillus* y *Micrococcaceae* (Fernández-Escartín, 2008).

A diferencia de las verduras, las frutas exhiben un pH más ácido y generalmente un mayor contenido de carbohidratos simples; por estas razones presentan una flora un tanto diferente en la que predominan hongos y bacterias ácido lácticas (BAL). Entre los hongos deterioradores hay que destacar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Botrytis* (Brackett, 1994). Las especies de *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Penicillium* sobresalen entre los hongos que se encuentran en las fresas, peras liofilizadas, pasas, almendras y avellanas (Weidenborner y col., 1995).

La presencia de bacterias patógenas en el interior de frutas y hortalizas íntegras, aunque posible no parece ser un acontecimiento común, sobre todo si se toman precauciones aplicando las prácticas agrícolas sanitarias (PAS).

En las partes externas de los frutos y hortalizas los microorganismos (potenciales deterioradores y patógenos) pueden persistir en periodos variados. La supervivencia de los microorganismos intestinales en verduras y frutos es lo suficientemente amplia para llegar a comprometer la salud de la población que la consume cruda.

Los microorganismos residentes en las superficies de las hojas de las verduras se encuentran sujetos a condiciones estresantes que comprometen su viabilidad, por ejemplo cambios en la humedad relativa y efecto de la luz ultravioleta. La capacidad para superar estas adversidades contribuye a establecer la diferencia entre una bacteria patógena a la planta o no.

En las frutas y hortalizas existen bastantes nutrientes para mantener la multiplicación de microorganismos, tanto deterioradores como patógenos.

La actividad de bacterias, hongos y levaduras da lugar a la pérdida de aproximadamente 15% de las frutas y hortalizas cosechadas (Harvey, 1978). Así mismo el estado fisiológico de las plantas tiene influencia en el proceso de descomposición. En las frutas y hortalizas climatéricas (plátano y jitomate) el proceso de maduración continúa una vez cosechados. Hay una degradación progresiva de los tejidos (senescencia) promovida por la liberación de enzimas con aparición de sustancias que fácilmente son metabolizadas por los microorganismos. La refrigeración retrasa el estado de senescencia de frutas y hortalizas pero la temperatura óptima no es la misma para todas ellas. Si no se controla la humedad ambiental el producto se deshidrata y perderá su valor comercial. Un exceso de humedad, sin embargo, permite la proliferación más activa de microorganismos deterioradores. Los microorganismos pectinolíticos generalmente muestran potencial psicrótrofo. Debido al bajo pH que generalmente muestran las frutas, los hongos y levaduras son más activos agentes de deterioro que las bacterias (Fernández-Escartín, 2008).

## 2.2 Enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas

La epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos depende en gran medida de los cambios globales en los sistemas de producción, manejo y consumo de los alimentos, de las características inherentes de los microorganismos y de la susceptibilidad del individuo que los consume (Hernández-Iturriaga, 2003).

A partir de verduras crudas es posible recuperar una diversidad de bacterias patógenas, las entero patógenas son las más frecuentes en aquellas provenientes de terrenos expuestos a la contaminación fecal evidente (riego con aguas negras, uso de fertilizantes orgánicos, aves, ganado mayor y animales domésticos próximos), pero también es posible su hallazgo en terrenos exentos a estas prácticas (Fernández-Escartín, 2008).

Brotos por *E. coli* O157:H7 han ocurrido debido a lechuga y sidra (Tauxe, 1997); por *Cyclospora cayetanensis* en frambuesas (Herwald y col., 1997) y *Salmonella* en jitomates (Tarok y col., 1997). En 2008 se reportó en Estados Unidos un brote entre los meses de abril y agosto del 2008 por *Salmonella* Saintpaul que afectó a 1407 personas en 43 estados. El alimento implicado fueron chiles jalapeños y serranos cultivados en una granja en México, y el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de Estados Unidos concluyó que el brote fue derivado del consumo de chiles crudos contaminados (Maki, 2009).

La presencia de bacterias patógenas en el interior de frutas y hortalizas íntegras, aunque posible, no parece ser un acontecimiento común, sobre todo cuando se aplican programas preventivos como el de buenas prácticas agrícolas. Sin embargo una vez eliminada la cáscara, las partes internas se exponen a la contaminación y eventual proliferación de microorganismos. En diversos estudios se ha observado el potencial desarrollo que muestran algunas bacterias patógenas en frutas y hortalizas. Por ejemplo en trozos de sandía, papaya y jícama almacenadas a 25-27°C, *S. Typhi* eleva su número en pocas horas (Fernández-Escartín y col., 1989). Se reconoce actualmente que el desarrollo de bacterias patógenas puede llegar a ocurrir en el exterior de frutas y hortalizas crudas como el jitomate (Beuchat y Brackett, 1991).

Como cualquier otro alimento crudo, la falta de un tratamiento terminal durante el proceso de frutas y hortalizas crudas o mínimamente procesadas puede resultar en la presencia de peligros biológicos en el producto cuando este llega al consumidor.

El amplio espectro de enfermedades relacionadas con alimentos ha cambiado en los últimos años, de tal manera que patógenos ya bien conocidos han sido controlados o eliminados y nuevos han emergido. El éxito frente a los nuevos desafíos ocurrirá en la medida en que se ponga atención en la vigilancia en la salud pública, en la investigación cuidadosa de nuevos problemas y en la atención responsable a la inocuidad de los alimentos del campo a la mesa. Con esta información es posible la creación de programas de vigilancia adecuados para la implementación de medidas de control para evitar enfermedades (Tauxe, 2002).

### **2.3 Fuentes y mecanismos de contaminación en frutas y hortalizas**

La producción de frutas y hortalizas está teniendo más importancia debido a la gran promoción que se hace para su consumo en países desarrollados como es el caso de Estados Unidos donde promueven el consumo de 3 a 5 frutas diariamente. El cultivo de hortalizas y frutas está muy asociado a la presencia de microorganismos ya que estos pueden llegar al alimento por diversas fuentes de contaminación como son el aire, la tierra o el agua contaminados con materia fecal, abonos, animales y el humano. Sin embargo, algunas bacterias patógenas al hombre y transmitidas por alimentos no tienen antecedente de exposición a la contaminación fecal. Tal es el caso de patógenos como *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* que suelen provenir del medio ambiente, en tanto *Staphylococcus aureus* llega a los alimentos a través de la piel o descargas nasofaríngeas (Fernández-Escartín, 2008).

Por medio de agua que no ha sido tratada debidamente se incorporan microorganismos patógenos como es el caso de *V. cholera* y *Salmonella*. La intervención del humano en la producción de estos alimentos es una fuente potencial de contaminación, el cual por no llevar a cabo medidas de higiene necesarias como el lavado de manos puede incorporar microorganismos al producto (Fernández-Escartín, 2008).

La contaminación cruzada durante el empaquetado juega un importante papel en la contaminación de productos frescos (Beuchat y Ryu, 1997). Aunque los vehículos que propician la contaminación no son conocidos, la evidencia sugiere que esta contaminación puede deberse al contacto con las manos de obreros portadores asintomáticos de microorganismos patógenos (Jimenez y col., 2007; Montville y col., 2001).

Los microorganismos pueden llegar a contaminar de manera interna el producto por medio de algún daño mecánico, permitiendo el acceso a los nutrientes y favoreciendo su desarrollo. Este mecanismo puede llevarse a cabo gracias a la acción de microorganismos fitopatógenos como es el caso de los hongos pectinolíticos que llegan a causar daño en superficie de frutos y permite la entrada de bacterias (Fernández-Escartín, 2008). La infiltración por diferencia de temperatura es otra forma por la que un microorganismo puede llegar al interior de la hortaliza o fruto. Esto es debido a la generación de presión negativa al someter al fruto cosechado a una temperatura menor (lavado) que la que se encuentra en el interior (Zhuang y col., 1995). Está siendo estudiado el mecanismo por infiltración radicular como un posible mecanismo de contaminación a frutas y hortalizas. Otro mecanismo puede ser a través de nemátodos, que al estar contaminados con bacterias sirvan como vehículos de los microorganismos hacia el interior de las plantas y llegar al fruto.

En las frutas y hortalizas es común el desarrollo de hongos seguido por el desarrollo de bacterias, esto está relacionado a que en la producción de frutas y hortalizas la humedad relativa es alta, lo cual favorece al desarrollo de los hongos (Fernández-Escartín, 2008)

Las medidas de prevención para minimizar la presencia de microorganismos, es haciendo uso de prácticas agrícolas y capacitando al personal que labore en los invernaderos en cuanto a la importancia de las medidas de higiene en la producción, manejo y almacenamiento de los alimentos y tener soporte científico en la aplicación de medidas de higiene limpieza y prevención en el campo.

## 2.4 Generalidades de pimiento

El pimiento cuyo nombre científico es *Capsicum annum* L., pertenece a la familia de las solanáceas, a la cual también pertenecen la papa, el tomate, la berenjena y el tabaco. Es una planta originaria del continente americano. Fue introducida a Europa primeramente por Cristóbal Colón y después, con más intensidad, por los conquistadores españoles del siglo XVI (Vilmorín, 1977).

El pimiento es una planta anual bajo cultivo, perenne en estado silvestre. Sus tallos son erectos, ramificados, semileñosos, de una altura de 50 a 90 centímetros. Tiene hojas lanceoladas, o un poco anchas, terminadas en punta que se van adelgazando en la base para formar un peciolo más o menos alargado. Sus flores son blancas, solitarias, localizadas en la inserción de las hojas y que generan frutos de formas variadas, de pared un poco carnosa, primeramente verdes, volviéndose rojos, amarillos o violeta oscuro al madurar, y que contienen semillas blancas, aplanadas, de una viabilidad germinativa de cuatro años aproximadamente (Vilmorín, 1977).

El pimiento dulce tipo Bell se consume en grandes cantidades en Estados Unidos, Canadá y Europa. Se consume principalmente crudo como ingrediente en ensaladas. También se conserva enlatado y encurtido. Tiene un alto valor nutritivo ya que contiene vitaminas A y C así como calcio, fósforo y hierro. Además, neutraliza la acidez del estómago. Con frecuencia es recomendado para las personas que padecen de reumatismo y de artritis. Este fruto es usado en ensaladas preparadas en restaurantes de comida rápida. El chile es característico por su textura crujiente y su sazón, pero éste sufre ablandamiento debido al crecimiento de microorganismos (Liao y Wells 1987; Magnuson y col., 1990).

Los pimientos verdes son relativamente caros en sus costos de producción debido a sus requerimientos de fertilizantes, insecticidas, fungicidas, nematocidas, herbicidas, cultivos y mano de obra (Vilmorín, 1977).

Los pimientos se producen mejor en un clima relativamente caluroso, en el que la estación de crecimiento es larga y donde existe poco peligro de heladas. Aparentemente resiste mejor la sequía que el jitomate o la berenjena. Sin embargo, los mejores rendimientos están íntimamente ligados a una abundante

cantidad de lluvia bien distribuida y a una temperatura media, al formarse la flor (entre 18 y 27 °C); en regiones áridas se le debe regar.

La planta no solamente es destruida por las heladas sino que su actividad se detiene a una temperatura de 4 a 6 °C. Su temporada óptima de desarrollo es alrededor de 27 °C. Necesita cuando menos tres meses de calor para las variedades precoces y de cuatro a cinco meses para las variedades tardías.

Aun cuando el pimiento crece en temperaturas tibias, una superior a 32 °C provoca la caída de las flores y una temperatura media superior a 27 °C causa malformaciones del fruto. Las temperaturas superiores a 35 °C bloquean el proceso de fructificación (Vilmorín, 1977).

A partir de la década de los ochentas la producción mundial de pimiento, ha mostrado una tendencia a la alza en relación a los niveles observados a finales de los años setenta e inicios de los ochenta. Esta hortaliza no registra una gran importancia en el contexto internacional, como es el caso del jitomate, la papa, entre otros, dado que no es muy demandado y su uso es aún muy limitado, registrándose su mayor producción en países como China, Turquía, Nigeria, España y México, ya que forman parte de su alimentación. En los países industrializados la demanda del mismo es en gran medida para su procesamiento y posterior exportación, y una parte es consumida internamente (Claridades Agropecuarias, 1991).

#### **2.4.1 Enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos en el pimiento**

El pimiento, como todas las plantas solanáceas, está sujeto al ataque de muchos fitopatógenos que pueden resultar altamente destructivos bajo ciertas condiciones especialmente cuando se cultivan grandes superficies sin una adecuada rotación de cultivos.

No es conveniente controlar las enfermedades una vez que se han declarado. Es preferente prevenirlas mediante aspersion o espolvoreo de fungicidas, insecticidas, desinfectantes, metódicos cada siete a diez días y mediante inspecciones minuciosas de las plantas efectuadas diariamente en diversos lugares de la población (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.1 Enfermedades de la plántula**

Éstas son causadas por diversos géneros de hongos, entre los cuales destacan: *Phythium aphanidermatum*, que causa secadera, *Phytophthora capsici*, que causa marchitez; *Fusarium* que también causa marchitez y ocasionalmente algunos *Collectotrichum*, *Ascochyta* y *Mycospharella*.

El daño se manifiesta en las plántulas al no permitir su desarrollo y propiciando su caída al suelo, en vez de permanecer erectas. Muchas de las plántulas mueren, y las que sobreviven darán poca producción de frutos mal desarrollados. Las raíces y los tallos, casi al nivel del suelo presentan colores negros o café oscuro. El origen de estas enfermedades generalmente es la presencia de estos hongos en la semilla. En general se le conoce a este grupo de enfermedades con el nombre de ahogar lento (*damping-off*) (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.2 Mancha Bacteriana**

Esta enfermedad es causada por la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*. Se le conoce también con el nombre de añublo bacteriano, y en otras ocasiones con el nombre de mancha angular de la hoja.

Esta enfermedad bacteriana causa formación, en las hojas y en los frutos, de pequeñas manchas café oscuro que parecen verrugas. Durante periodos de elevada humedad relativa, la enfermedad se esparce rápidamente y puede causar la casi completa defoliación de las plantas. Las manchas de los frutos permiten la entrada de mohos y de otros organismos que causan la pudrición (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.3 Tizón del tallo**

Esta enfermedad es causada por el hongo *Sclerotium rolfsii*. Es una de las enfermedades fungosas más destructivas del pimiento, especialmente en las regiones bajo la influencia del aire marítimo del Golfo de México y en otras zonas que reciban aire marítimo cálido y de gran humedad.

Las plantas se ven atacadas cerca de la línea del suelo y durante periodos secos, se destruyen las raíces. Las plantas se vuelven amarillas y se marchitan gradualmente (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.4 Pudrición de la punta de floración**

La pudrición de la punta de floración es una enfermedad de origen fisiológico. Es provocada por falta de calcio. Causa la aparición de manchas cerca de la puntas de los frutos, durante periodos de secas, antes de que las plantas hayan establecido un sistema radicular extenso.

Las cosechas tempranas, son las más seriamente afectadas. Estas manchas generalmente se infectan con el hongo *Alternaria* así como otros hongos, lo cual puede pudrir todo el fruto (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.5 Antracnosis**

Esta enfermedad es causada por el hongo *Gloeosporium piperatum*. La antracnosis frecuentemente causa un manchado serio de los pimientos tanto verdes como maduros. El hongo vive sobre la cutícula de la semilla y también en el interior de la misma. La parte que vive dentro de la semilla no puede eliminarse mediante tratamientos a ésta. La semilla debe por lo tanto obtenerse de productores que la certifiquen libre de esta enfermedad. (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.6 Pudrición del fruto**

Es causada por el hongo *Colletotrichum capsisi*, orden de los Melanconiales. Estos hongos son muy destructivos para la planta ya que atacan el fruto después de que ha madurado. Al igual que el hongo de la antracnosis, este hongo vive en el interior y en la cubierta de la semilla. Este hongo puede permanecer viable en el campo de una temporada a otra (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.7 Marchitez**

Esta enfermedad es causada por el hongo de la especie *Fusarium*. El hongo generalmente penetra a la planta por lesiones causadas por los nemátodos de las raíces. Se propaga entonces por la parte leñosa de la planta y llega, por medio de los vasos, a los peciolos y a las hojas. Este hongo genera sustancias tóxicas que dañan también a las plantas. La causa principal de marchitamiento se debe a que este hongo tapa los vasos de las plantas, los cuales forman entonces

callosidades. Se interrumpe la alimentación normal de la planta ya que no puede recibir sales minerales ni agua en forma adecuada (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.1.8 Pudrición blanda o suave**

Esta enfermedad es de origen bacteriano ocasionado por *Erwinia carotovora*. El daño causado por las bacterias en las plantas generalmente no es debido a toxinas sino a actividad enzimática específica. Las bacterias convierten las sustancias alimenticias de las plantas, tales como almidones, azúcares, aminoácidos entre otros, en materias que pueden usar en su propio metabolismo. Como resultado de su metabolismo, las bacterias producen frecuentemente ácido o álcalis que causan daños a las plantas. La pudrición es una enfermedad que se extiende rápidamente, matando los tejidos y descomponiéndolos (Vilmorín, 1977).

#### **2.4.2 Comportamiento de microorganismos patógenos de interés sanitario en pimiento**

Normalmente las hortalizas son contaminados debido a su contacto con la tierra y por el agua no apta para el riego o para el lavado de frutos (Beuchat, 1996).

En un estudio realizado en la India donde se utilizó *Capsicum*, presentó una carga de bacterias mesófilas aerobias de  $10^5$  UFC/gr y de  $10^4$  UFC/gr de hongos, presentando también psicrófilos ( $10^4$  UFC/gr) y coliformes ( $10^3$  UFC/gr). De estas muestras fueron aislados *Listeria* y *Yersinia* con ausencia de *Salmonella* (Ramamurthy y col., 2004).

Los brotes reportados de infecciones asociadas a productos frescos se han relacionado a los equipos de empaqueo pobremente saneados. En 2004, un total de 6464 casos se relacionaron con *Salmonella* spp, 1189 eran asociados con el serovar Typhimurium (CDC, 2005). Normalmente, los productos animales como los huevos y carne de pollo, son responsables de causar salmonelosis. Sin embargo, se han implicado melones, mangos y sandías en los brotes de *Salmonella* (CDC, 1991; Blostein, 1993; Penteado y col., 2004). Se han encontrado tomates relacionados a brotes de salmonelosis, contaminados con varios serotipos de *Salmonella* (Yoon y col., 2004). Aunque no se han relacionado

los pimientos verdes directamente a brotes importantes de la enfermedad, algunos investigadores han informado el aislamiento de *Salmonella* de las rodajas y los pimientos verdes enteros (Beuchat, 1996; Mukherjee y col., 2004).

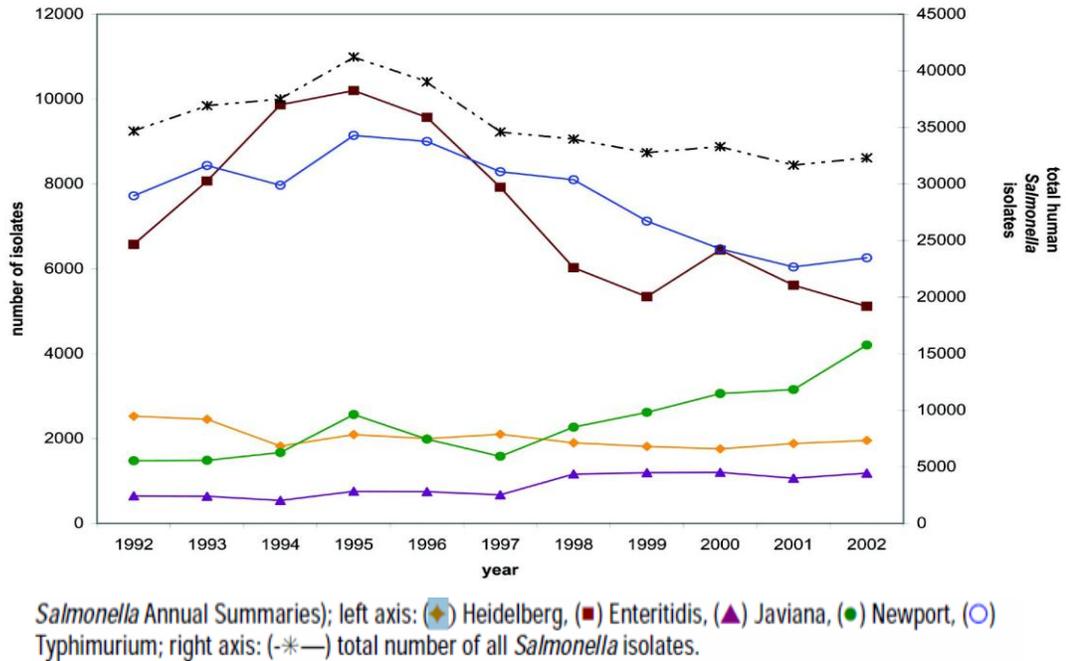
Los pimientos verdes han ganado la popularidad entre los consumidores. Un estimado de 24 % de las poblaciones de Estados Unidos por lo menos consumen una comida que contiene esta verdura (Lucier y Lin, 2001). México ha sido un exportador importante de pimiento verde. En la temporada 2003-2004, se exportaron 89 000 toneladas al mercado de Estados Unidos, representando 102 millones de dólares a la industria agrícola mexicana. Particularmente Sinaloa es uno de los estados agrícolas más importantes y más grandes de México (Confederación de Asociaciones el del de Agrícolas Estado de Sinaloa [CAADES], 2004).

Los pimientos verdes podrían representar un posible vehículo de patógenos a humanos y podrían llegar a estar involucrados en brotes esporádicos de enfermedades gastrointestinales. En vista de la incertidumbre acerca del impacto económico de la presencia de *Salmonella* en pimiento y la importancia de este producto a la economía mexicana, es necesario hacer estudios sobre la incidencia de patógenos en este fruto.

### **2.4.3 *Salmonella***

Según lo reportado por Centro de Prevención y Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) la incidencia de salmonelosis ha ido en aumento en los últimos años (Figura 1).

Los brotes reportados se asocian a alimentos crudos y procesados. Por ejemplo, dos de los brotes más grandes relacionados con productos frescos fue el concerniente a melón. Uno de ellos debido a *S. Chester*, en el que se reportaron casos en 30 estados de los Estados Unidos, y fueron estimados en más de 25,000 personas infectadas (Ries y col., 1990). El segundo debido a *S. Poona*, en el que se vieron implicados 185 casos en Estados Unidos y 56 en Canadá (CDC, 1991). El melón picado y servido en barras de ensaladas fue el vehículo en los dos brotes.



**Figura 1.** Incidencia de *Salmonella* en el periodo 1992-2002. (Fuente: CDC, 2003).

En Estados Unidos se reportaron tres brotes multiestatales asociados al consumo de jitomate crudo. El primero en 1991 asociado al serotipo *S. Javiana* (Wood y col., 1991), más tarde en 1993 se presentó el segundo por *S. Montevideo* y abarcó los estados de Illinois, Minnesota y Wisconsin (CDC, 1993). El tercer brote ocurrió en 1999 debido a jitomates contaminados con *S. Baildon* un serotipo raramente implicado en brotes por consumo de alimentos (Cummings y col., 2001).

De acuerdo con el Centro para la Ciencia de Interés Público (CSPI por sus siglas en inglés), aproximadamente 76 millones de estadounidenses enferman y 5000 personas mueren por enfermedades relacionadas con peligros biológicos relacionados a los alimentos. La presencia de *Salmonella* se ha relacionado en alimentos frescos como: ensaladas (24%), lechuga (8%), papas (5%), melón (5%), moras (3%), champiñones (3%), germinados (3%), conservas vegetales hechas en casa (3%), otros vegetales (16%), otras frutas (10%). En los productos mencionados la contaminación de los alimentos ocurrió durante el desarrollo en el campo (CSPI, 2006).

#### **2.4.4 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y ha sido aislada de gran variedad de materiales como la tierra, lodo (Weis, 1975), agua (Dijkstra, 1982). El principal hábitat de *L. monocytogenes* aparentemente es la tierra y la vegetación donde aparece como saprófita; la tierra es un reservorio que más tarde podría contaminar los alimentos o servir como vehículo para infecciones en animales y humanos (Weis, 1975).

*L. monocytogenes* es un bacilo gram-positivo, ampliamente distribuido en el ambiente. Tiene la capacidad de sobrevivir en un amplio rango de pH, osmolaridad y temperatura (Sleator y col., 2003; Liu y col., 2005) lo cual está relacionado a los procesos de manufactura de los alimentos. *L. monocytogenes* es un patógeno emergente y en las últimas décadas se ha relacionado con alimentos listos para el consumo (Liu, 2008).

La listeriosis, es una enfermedad que puede ocasionar encefalitis, septicemia y aborto; afecta principalmente a grupos vulnerables de la población como personas inmunocomprometidas, mujeres embarazadas y neonatos, y ocasionalmente se presenta en individuos sanos en condiciones que los expongan a la enfermedad, como es el consumo de alimentos contaminados (Slutsker, 1999, Vazquez-Boland y col., 2001).

En los Estados Unidos durante agosto de 1998 a febrero de 1999, el consumo de hot dogs se asoció a un brote de listeriosis con 101 casos reportados en 22 estados. Alrededor del 80 % de las víctimas eran adultos (mediana edad hasta 70 años), más del 60 % sufrió una infección aguda. Un total de 21 pérdidas fueron reportadas (15 muertes y 6 abortos) obteniendo un índice de mortalidad de 21 %. La cepa relacionada con este brote fue *L. monocytogenes* serotipo 4b, la cual había sido responsable de otros brotes en Estados Unidos (CDC, 1998).

*L. monocytogenes* es un contaminante frecuente en alimentos como leche cruda, carne cruda, pollo y productos del mar, así como en productos procesados de leche, carne, pescado y productos delicados (Ryser y col., 1991). *Listeria* se presenta con más frecuencia en comida cocida y comida lista para su consumo donde la contaminación ocurre después del proceso térmico ya que este microorganismo es típicamente hallado en el ambiente de manufactura. Se han

confirmado como vehículos en casos de listeriosis a ensalada de col (Schlech y col., 1983), leche con chocolate (Dalton y col., 1997) queso fresco y madurado (Bula y col., 1994, Jacquet y col., 1995), paté (McLauchilin y col., 1991) y pollo cocido (Kerr y col., 1988), entre otros. También se han encontrado reportes de listeriosis asociado a vegetales como el apio, jitomates y lechuga crudos en Boston en 1979 y en ensalada de col en Canadá 1981 (Farber y Peterkin, 2000).

## **2.5 Estrategias para el control de la contaminación microbiana en productos hortofrutícolas**

El estudio de los síntomas, las causas y los mecanismos del desarrollo de las enfermedades de las plantas es de gran utilidad para el diseño adecuado de métodos de control que mejoren la producción y calidad de los productos hortofrutícolas.

Los métodos de control varían considerablemente de una enfermedad a otra, dependiendo del tipo de patógeno, del hospedero y de la interacción que se establece entre los dos. Los distintos métodos de control pueden clasificarse como reguladores, culturales, biológicos, físicos y químicos, dependiendo de la naturaleza de las enfermedades. Las medidas reguladoras de control ayudan a eliminar los patógenos de sus hospedantes o de cierta área geográfica (Agrios, 1988).

El uso de componentes químicos para el control del deterioro de los productos hortofrutícolas en poscosecha es el más difundido entre los productores pero la aplicación de bacterias y levaduras (biocontrol) muestran ventajas y gran potencial (Agrios, 1998).

### **2.5.1 Desinfección**

Los agentes antimicrobianos químicos, disueltos en agua son útiles en el procesamiento de frutas y verduras reduciendo la carga microbiana en el agua y en la función de los microorganismos (tipo y número), del sustrato del cual se encuentran (presencia de materia orgánica), y la estructura del material (que permita el acceso directo del germicida a los microorganismos) y el germicida

(concentración, temperatura y tiempo de contacto) (FDA 1998; Fernández Escartín, 2008) lo que genera una gran variabilidad en su aplicación.

La industria de alimentos cuenta con una diversidad de agentes germicidas, cuyas características deseables incluyen: amplio espectro de actividad, actividad en presencia de materia orgánica, actividad a bajas concentraciones, no corrosivos, activos en amplios límites de pH, fácilmente removibles, no impartición de color, olor o sabor, no tóxicos, efecto prolongado, económicos (Fernández-Escartín, 2008). Entre los principales agentes químicos usados en la desinfección se encuentran el hipoclorito de sodio o calcio, el ácido peracético y las sales cuaternarias de amonio (Beuchat, 1998).

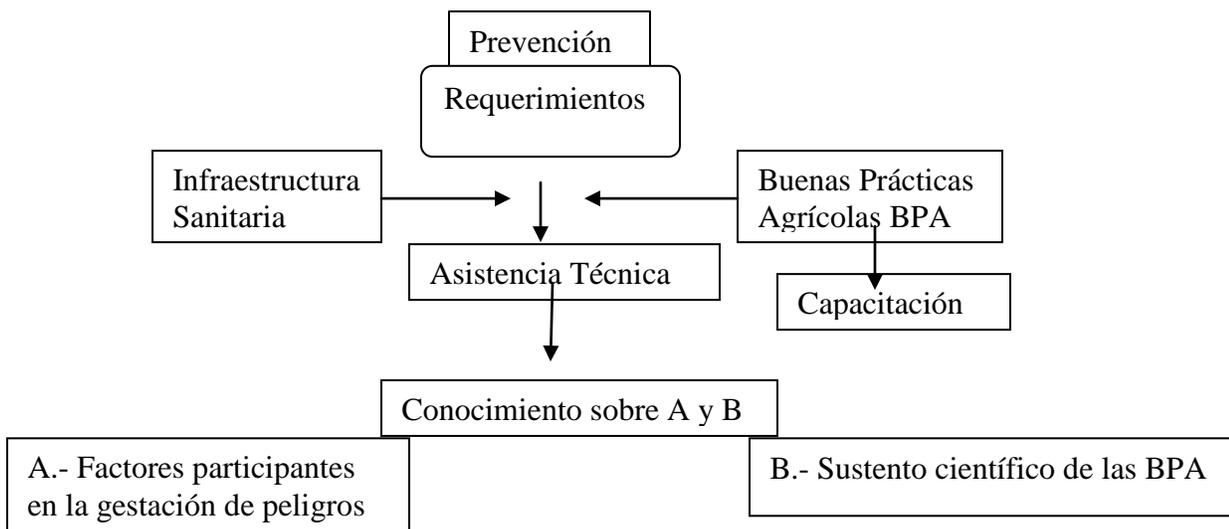
### **2.5.2 Métodos biológicos (Biocontrol)**

La flora microbiana nativa presente en la superficie de frutas y hortalizas juega un papel preponderante en la calidad e inocuidad de los productos crudos mínimamente procesados. Algunos de ellos son capaces de producir compuestos antimicrobianos o activar mecanismos de defensa de la planta, que lleva a la inhibición de microorganismos patógenos y por lo tanto resultan benéficos. En contraste, otros microorganismos son capaces de inducir deterioro de los productos hortofrutícolas durante el cultivo o en pos cosecha (Liao y Fett, 2001).

El control biológico de los patógenos, es decir la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos por medio de otros organismos, frecuentemente ocurre en la naturaleza. En lo que respecta a los frutos, existe un gran número de posibles vías a explorar en la búsqueda del control de enfermedades en poscosecha como son: uso de microorganismos antagónicos, uso de fungicidas naturales derivados de metabolitos del fruto y la manipulación de la resistencia en los frutos. En estas definiciones se apunta también que la relación biológica entre los agentes de control y los patógenos es bastante específica de tal forma que es necesario recurrir a un método de control para cada enfermedad (Nigam y Mukerji, 1988).

### 2.5.3 Buenas prácticas agrícolas en el campo y el empaque

Un proyecto de prevención de enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas inicia desde su cultivo (Figura 2). En su concepción es evidente la necesidad de disponer de una cierta infraestructura sanitaria que prevea la protección directa e indirecta contra todas las posibles fuentes de contaminación. La atención a este punto se complementa con la aplicación de prácticas agrícolas sanitarias. Éste es el aspecto operacional del programa, más difícil de satisfacer, por cuanto demanda, convicción y compromiso de todo el personal. En su capacitación se hace énfasis en mostrar los peligros potenciales de contaminación a los que se exponen las frutas y hortalizas durante su cultivo y cosecha, así como las consecuencias económicas y sanitarias que resultan de no ajustarse a tales prácticas sanitarias. El responsable técnico del programa debe encontrarse familiarizado con el proceso de configuración de riesgos de enfermar asociado al consumo de productos contaminados con microorganismos patógenos. Finalmente las consideraciones anteriores deberán ser motivo de una verificación periódica tendiente a garantizar la inocuidad del alimento (Fernández-Escartín, 2008).



**Figura 2.** Componentes de un proceso de prevención de riesgos a la salud durante el cultivo de frutas y hortalizas. (Fuente: Fernández- Escartín, 2008).

Los lineamientos para reducir los riesgos de contaminación pueden ser divididos en buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de manufactura (BPM). Se considera ambas acciones y se les engloba como BPA, separando las secciones de campo (desde la preparación del cultivo hasta la cosecha y transporte al empaque), de las secciones de empaque (desde la recepción del producto hasta su envío a los mercados) (SAGARPA 2002).

El objetivo de las BPA de manejo en campo y el empaque es establecer estándares que aseguren mantener la sanidad de estas áreas en un nivel aceptable que facilite la producción consistente de productos seguros y limpios, basados en un programa de sanidad para la industria de frutas y hortalizas frescas.

Las Buenas Prácticas Agrícolas en campo inician desde la selección del terreno y sus alrededores, la calidad del agua de riego, la aplicación de plaguicidas, la higiene y sanidad del trabajador y las instalaciones sanitarias, entre otras. Las Buenas Prácticas Agrícolas en el empaque incluyen tópicos como las instalaciones, el diseño y la construcción de la planta y el equipo, el control de plagas, las prácticas de proceso y las prácticas personales, entre otros (SAGARPA,2002).

#### **2.5.4 Análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC)**

Una alternativa de control, ahora ampliamente reconocida, lo constituye el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control. Este sistema fue concebido y desarrollado para atender un problema de abasto de alimentos que imponían la condición de inocuidad total.

El sistema de APPCC es un enfoque sistemático que pretende identificar, evaluar y controlar los peligros en los alimentos. Los principios que dan sustento al sistema APPCC están basados en el conocimiento científico, mientras que su implementación para cada caso es específica. Este sistema esta concebido primeramente para prevenir los peligros microbianos en los alimentos y acercarse cuanto sea posible al alimento inocuo. Este sistema es crítico, obliga a la observación cuidadosa y reflexión; es un proceso de pre control por parte de la gerencia y de control durante las operaciones por parte de los trabajadores a lo

largo de la línea de producción, en la preparación y en el servicio de alimentos (Fernández-Escartín, 2008).

El sistema APPCC elimina virtualmente la necesidad de analizar productos terminados al identificar los peligros inherentes al alimento; y diseñando medidas preventivas que sean monitoreables permitirá poner bajo control el proceso de fabricación. Si el sistema de APPCC se diseña y aplica correctamente, resulta preventivo, racional, extensivo, integral, dinámico y verificable (Fernández-Escartín, 2008).

### III. JUSTIFICACIÓN

Se ha detectado en México la presencia de un daño en poscosecha que afecta al pedúnculo y al cáliz del pimiento morrón, caracterizado por la abundancia de un micelio blanquecino que con el tiempo provoca la necrosis parcial o total del pedúnculo y que aparentemente afecta por igual a todas las variedades. Este problema se detectó en particular en los dos últimos años en una empresa ubicada en el municipio de Colón Querétaro, y que cuenta con 7.5 hectáreas de invernadero destinadas a la producción de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.).

En 2008 se presentaron múltiples quejas de los clientes en el extranjero en alrededor del 30 % de los embarques, lo cual se tradujo en pérdidas estimadas en 30,000 dólares. Este mismo problema ha sido detectado en frutos adquiridos a otros productores y comercializados por esta empresa ubicada en México.

La contaminación de los frutos pudiera ocurrir desde la semilla, la plántula, durante el cultivo en el invernadero, o durante la selección y empaquetado. Existe la posibilidad de que el estado fenológico y nutricional de la planta durante los primeros cortes propicie una mayor sensibilidad de los frutos al ataque de este microorganismo fitopatógeno, también es posible que la variación en la incidencia del hongo se vea afectada por los niveles de humedad y temperatura causados por cambios estacionales.

Por lo anterior, se requiere de un enfoque integral preventivo que nos permita, por un lado, aislar e identificar al agente causal para reproducirlo in vitro. Por otro lado, detectar los puntos críticos del proceso productivo donde pudiera ocurrir la mayor contaminación del fruto por este fitopatógeno y detectar si en el proceso de producción existe la presencia de microorganismos patógenos como es el caso de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, ya que son microorganismos de importancia para la salud de los consumidores y de los cuales se han reportado brotes relacionados con el consumo en frutos y hortalizas contaminadas (Schlech y col., 1983).

Eventualmente la información generada puede ser de utilidad para otras empresas que cuenten con la misma infraestructura y tecnología para el cultivo de hortalizas en invernadero, pudiendo prevenir la incidencia de patógenos y poder prolongar la vida de anaquel del pimiento.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar el hongo causante del deterioro del chile pimiento morrón, y determinar su influencia en el comportamiento *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en la superficie del fruto.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Identificar el hongo(s) causante de la infección del pimiento morrón.
- 2.- Detectar la existencia y distribución de posibles reservorios y fuentes de contaminación del hongo(s) problema.
- 3.- Determinar las poblaciones de bacterias indicadoras y la presencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en pimiento y materiales asociados a su cultivo, cosecha y empaque.
- 4.- Evaluar el comportamiento en pimiento morrón de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en ausencia y presencia del hongo deteriorador.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Descripción de la empresa productora y exportadora de pimiento morrón

La empresa productora y exportadora de pimiento morrón se encuentra ubicada en Colón, Querétaro, México y cuenta con 7.5 hectáreas de invernadero destinadas a la producción de esta especie. Esta superficie está dividida en dos invernaderos en los cuales se cultiva pimiento morrón por medio de la técnica de hidroponía. En el inicio de la temporada el invernadero es fumigado y lavado para el montaje de la fibra de coco la cual será soporte para colocar a las plántulas de chile y posteriormente colocar los goteros por los cuales se distribuye la solución hidropónica que proporciona los nutrientes a la planta para su crecimiento. Durante el desarrollo de la planta los tallos son sostenidos mediante hilos atados desde la base de las canaletas donde está montada la planta hasta el techo del invernadero para poder ir guiando el crecimiento vertical de las plantas (Figura 3).



**Figura 3.** Montaje de plantas de pimiento morrón en el invernadero hidropónico

La cosecha de los frutos se realiza haciendo un corte en el tallo donde nace el fruto dejando un pedúnculo de aproximadamente de 3 a 4 centímetros de

largo. Son recolectados por personal capacitado y el fruto es colocado en contenedores metálicos especiales en donde se recopilan los frutos de las líneas de los invernaderos; posteriormente son colocados en vagones transportadores enganchados a carros manejados por un operador, para ser trasladados a la zona de empacado. En esta zona, los chiles son depositados a una banda de recepción, transportados a una banda de selección en donde el personal capacitado selecciona los chiles que presentan las características deseadas para su exportación o bien para su venta en el mercado nacional. Los chiles que presentan las características establecidas son empacados manualmente en cajas plastificadas para exportación y de cartón para mercado nacional. Al terminar su empacado las cajas son almacenadas en una cámara fría a 10°C y una humedad relativa de 97% hasta su comercialización.

## **5.2 Aislamiento e identificación del agente etiológico de la infección del pimiento morrón**

### **5.2.1 Recolección de muestras con daño para identificación de hongos**

Se recolectaron frutos con daño evidente en el pedúnculo de los cuales se partió para la identificación del agente causal de deterioro en el chile. La mayor incidencia de éste daño ocurre en los meses de septiembre y octubre que corresponden a los primeros cortes realizados al pimiento.

### **5.2.2 Aislamiento del hongo deteriorador**

Se describió la estructura, color, extensión y tiempo transcurrido desde el corte hasta la aparición del primer signo de daño. Se tomó una muestra del micelio del hongo con una asa fúngica y se inocularon sobre placas de agar papa dextrosa (APD; BD.Bioxon), las placas se incubaron a 22 °C por cinco días. Fue necesario purificar el cultivo mediante pases sucesivos en placas APD. Finalmente las cepas aisladas se sembraron en tubos con APD inclinado para su conservación.

### **5.2.3 Identificación microscópica**

Para la identificación del hongo se realizó la técnica de microcultivo (Malloch 1981) con la cual en base a las estructuras de reproducción y haciendo uso de manuales especializados (Banett y Hunter, 1999) se pudo identificar taxonómicamente el o los hongos presentes.

Se esterilizó una caja petri, en cuyo interior se colocó un tubo de vidrio en U, un portaobjetos y un cubreobjetos. Sobre la superficie del porta objetos se coloca en forma aséptica un cuadro de medio de cultivo (APD) de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Se inoculó el hongo por picadura en los cuatro bordes del cuadro de agar se cubre con un cubreobjetos estéril. En el fondo de la caja se colocó glicerina al 10% para conservar la humedad y se incubó a 22°C.

Después de tres días de incubación (ó hasta observar el desarrollo del micelio del hongo) se retiró en forma cuidadosa el cubreobjetos y se montó en un portaobjetos estéril, se colocó una gota de ácido láctico y se selló con esmalte para uñas. Se retiró con cuidado el trozo de medio de cultivo y se le agregó una gota de ácido láctico, se colocó un cubreobjetos y se selló.

Se utilizó azul de metileno al momento del montaje, con la finalidad de teñir las estructuras de los hongos y facilitar su observación con el microscopio óptico (40X). Las estructuras observadas se identificaron con manuales de Barnett y Hunter (1999).

### **5.2.4 Identificación bioquímica**

La identificación bioquímica del hongo se hizo mediante el equipo denominado Biolog MicroStation <sup>TM</sup>, el cual es un sistema miniaturizado que emplea placas de microtitulación para obtener información de crecimiento y reacciones bioquímicas del microorganismo. Primeramente se obtuvo un cultivo puro en agar malto dextrosa (BD,DIFCO), se obtuvieron las estructuras conidiales del microorganismo y después se resuspendió en medio líquido para obtener una densidad de 6 log UFC/ml. Cada pozo de la microplaca se inoculó con 100 µl de la suspensión y se incubó de 24 a 96 hrs a 26°C, para posteriormente observar la aparición de un color rojo en los pozos que indica la utilización de las diferentes fuentes de carbono. Los resultados obtenidos se comparan con los perfiles

bioquímicos típicos de los microorganismos que se tienen dentro de una base de datos (Micro Log <sup>TM</sup>) incluida en un software para su identificación (Fung, 2002).

### **5.2.5 Reproducción del daño en pimiento morrón**

Con el objetivo de confirmar que los hongos aislados de pimientos dañados, fibra de coco, mangueras y aire eran los causantes del deterioro en el pimiento morrón, se inocularon por separado las cepas recuperadas en pimientos sin daño y se observaron los cambios que resultaron del proceso infeccioso mediante el registro de las características y extensión del daño. Este daño se comparó con los signos registrados en los primeros pimientos infectados.

## **5.3 Detección y distribución de posibles reservorios y fuentes de contaminación del hongo(s) problema, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes***

### **5.3.1 Plan de muestreo**

Para determinar los posibles puntos de contaminación, fue necesario en primer término, llevar a cabo muestreos en base a un estudio observacional del cultivo del pimiento a lo largo del proceso de producción: corte, transporte, selección, empacado y almacenamiento. Se colectaron muestras ambientales, de materiales y chiles en las diferentes áreas de la empresa como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Áreas de muestreo en la empresa

<b>Áreas</b>	<b>Materiales muestreados</b>
Área de cultivo	Pimiento Fibra de coco Solución hidropónica Agua Cuchillos Carros transportadores Aire de invernadero Goteros con manguera
Área de empaclado	Bandas transportadoras
Área de almacenamiento	Aire Pimiento

Se llevaron a cabo muestreos semanales en diferentes etapas:

Mayo 2009 (fin de temporada 2008-2009)

Septiembre- Diciembre 2009 (Inicio de temporada 2009-2010)

Febrero-Mayo 2010 (mediados y fin de temporada 2009-2010)

### 5.3.2 Análisis microbiológicos

Debido a la variedad de muestras a analizar cada una de ellas tuvo una preparación diferente que se desglosa en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Preparación de muestras para su análisis microbiológico.

Muestra	Preparación
Pimiento	Se colocó un pimiento en bolsa de plástico con 50 ml de peptona de caseína BD Bioxón (DP). Se frotó enérgicamente con las manos desde afuera de la bolsa, durante 1 minuto.
Fibra de coco	Se pesaron 25 g de fibra de coco en bolsa de plástico y se adicionaron 225 ml de DP. Para desprender a los microorganismos se homogeneizó (BagMixer ® interscience) por 1 minuto.
Superficies (bandas, herramientas, transportes)	Se emplearon esponjas (Nasco Whirl-Pak®) para muestrear las superficies y se adicionaron 25 ml de DP. Se agitaron por 1 min (BagMixer ® interscience).
Gotosos ( <i>drippers</i> )	Se analizaron individualmente. Se cortaron las mangueras y se colocaron en bolsa de plástico con 100 ml de DP y se agitaron por 1 min en Stomacher.

Las muestras se colectaron con guantes, material estéril y fueron transportadas al laboratorio para su análisis. El transporte de las muestras colectadas se realizó en condiciones tales que se pudo reducir la multiplicación de la flora asociada, ó merma de la viabilidad ó a muerte de los microorganismos (Fernández, 1981).

En las muestras colectadas se determinó la presencia del hongo problema, microorganismos indicadores bacterias mesófilas aerobias (BMA); coliformes totales (CT) *E. coli*; hongos y levaduras (H/L), y de microorganismos patógenos a humanos (*Salmonella* y *L. monocytogenes*).

El recuento de BMA, CT, y H/L se efectuó por los métodos tradicionales (Pouch, 2001). Se llevaron a cabo por vaciado en placa agar cuenta estándar (ACE) para BMA, agar rojo violeta billis (ABRV) para CT, agar papa dextrosa suplementado con ampicilina al 1% y rosa de bengala al 6% (APD) para H/L.

### **5.3.3 Detección y aislamiento de coliformes y *E. coli* por la técnica de numero más probable (NMP)**

Para el análisis de solución hidropónica y agua se utilizó la técnica de NMP empleando una batería de 7 tubos (5 inoculados con 10 ml, 1 con 1 ml y uno con 0.1 ml). La prueba presuntiva se realizó en caldo lactosado y los tubos que resultaron positivos (es decir los que presentaron producción de gas dentro de las 24 a 48 hrs de incubación a 35°C) fueron confirmados en caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB) (BD Bioxón). A la par se inocularon tubos con caldo lauril sulfato con MUG (BD DIFCO) para determinar la presencia de *E. coli*. En este caldo se detectó la presencia de gas, la enzima  $\beta$ - glucuronidasa (GUD) e indol. GUD es comúnmente producida por *E. coli* y ha sido utilizada como característica diferencial en los medios de recuperación de coliformes, que contienen varios sustratos ácido  $\beta$ -D-glucorónicos. Por ejemplo, ácido 4- metilumbeliferol- $\beta$ -D glucuronico (MUG) que al ser utilizado por GUD produce el 4-metilumbeliferona el cual produce fluorescencia cuando es expuesta a luz UV (365 nm) en un caja oscura. La presencia de florescencia indica que *E. coli* está presente. Después de este paso se agregó reactivo de Kovac para evidenciar la producción de indol, ya que el 95 % de las cepas de *E.coli* son indol positivo. La combinación de la producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa, prueba de indol y GUD a 44.5 °C nos aumenta la especificidad y la rapidez para determinar *E. coli* (Pouch, 2001).

### **5.3.4 Muestreo de aire**

Se analizó el aire del invernadero con el objetivo de determinar la presencia del hongo problema y conocer la concentración de los microorganismos que pueda contener.

El método utilizado fue el de impacto, el cual implica coleccionar los microorganismos en el aire en una placa con medio específico de acuerdo al tipo de microorganismos a evidenciar. Se utilizaron placas de ACE y APD para determinar BMA y H/L, respectivamente. Se utilizó el muestreador de aire (Mikrobiologie MAS 100 Merck) durante un minuto (100 L de aire). Las placas de ACE y APD fueron incubadas a 35° C por 48 horas y 22 °C por cinco días, respectivamente.

#### **5.3.5 Detección y Aislamiento de *Salmonella* por el método tradicional**

La muestra se sometió a un tratamiento previo de enriquecimiento, y se realizó en caldo lactosado (BD Bioxón); partiendo de una muestra compuesta de cuatro chiles pimiento, la cual se mezcló y enriqueció. El caldo lactosado se incubó 24 h a 35 °C, se tomó un mililitro de la muestra y se inocularon tubos con caldo de enriquecimiento (tetrionato y caldo Rappaport) (BD Bioxón) los cuales contienen sustancias inhibitorias y pretenden, por una parte, favorecer la multiplicación de *Salmonella* y por otra, impedir la proliferación de la flora asociada. Los tubos de incubaron a 43 °C durante 24 h y posteriormente se procedió al aislamiento de *Salmonella* en medios de cultivo sólidos: agar XLD (agar xilosa lisina desoxicolato BD Bioxón) y agar sulfito bismuto (BD Bioxón). Las colonias que presentaron la morfología característica se aislaron e inocularon en TSI (agar triple azúcar hierro, BD Bioxón) y LIA (agar lisina- hierro BD Bioxón) como pruebas presuntivas de identificación por serología (BD DIFCO *Salmonella* O. Antisuerum poly-A- I & Vi). La confirmación se hizo por medio de PCR (Liu y col., 2002).

#### **5.3.6 Detección y aislamiento de *L. monocytogenes* por el método tradicional**

Se partió de una muestra compuesta por cuatro chiles pimiento se mezclaron y enriquecieron. El procedimiento empleado para el aislamiento de *L. monocytogenes* fue el del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Las muestras se pre-enriquecieron en caldo UVM (Acumedia) por 24 h a 30 °C, posteriormente se transfirió un ml a caldo de enriquecimiento Fraser (FB)

(BD DIFCO) y finalmente se tomó una asada del cultivo para estriarlo agar MOX (Medio Oxford Modificado, Acumedia). Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 a 48 h (USDA, 2001). Se seleccionaron aquellas colonias que mostraron un desarrollo característico en MOX y se sometieron a pruebas bioquímicas (SIM (BD Bioxón), ramnosa, xilosa (Sigma) y manitol (Merck)) y confirmaron posteriormente por PCR (Aznar y Alarcón, 2002).

### 5.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las colonias aisladas por el método tradicional (presuntivas mediante pruebas bioquímicas para *Salmonella* o *L. monocytogenes*) fueron activadas a 35°C por 24 horas en caldo soya tripticasa (CST). Se tomó 1 ml del cultivo, y se centrifugó a 4500g por 15 min, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células con 1 ml de agua estéril y se calentó la muestra en baño de agua a 100°C por 20 minutos. Se tomó 1 µl de cultivo lisado para amplificar empleando la mezcla de reacción Platinum supermix (Invitrogen®), iniciadores específicos para cada microorganismo (1.25µM para *Salmonella* y 1µM para *L. monocytogenes*) en un volumen final de 20µl. Para *Salmonella* se emplearon los iniciadores InvA1 e InvA2 que reconocen una región del gen InvA referente a la invasividad y para *L. monocytogenes* los iniciadores LM1 y LM2 que reconocen el gen hlyA que codifica para la listeriocina. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3 y 4 usando el termociclador (TC-3000).

**Tabla 3.** Condiciones de amplificación para *Salmonella*

	Condiciones	Iniciadores	Secuencia	# De Bases
Desnaturalización	93°C/5 minutos	InvA1	CTGTTGAACAACCCATTTGT	20
Amplificación 30 ciclos	93°C/10 seg 42°C/ 10 seg 72°C/45 seg			
Extensión final	72 °C/ 10min	InvA2	CGGATCTCATTAAATCAACAAT	21

(Liu y col., 2002)

**Tabla 4.** Condiciones de amplificación para *L. monocytogenes*

	Condiciones	Iniciadores	Secuencia	# De Bases
Desnaturalización	94°C/5 minutos	LM1	CCT AAG ACG CCA ATC GA A	18
Amplificación 30 ciclos	94°C/ 1min 50°C/ 1 min 72°C/ 5 min			
Extensión final	72 °C/ 10min	LM2	AAG CGC TTG CAA CTG CTC	18

(Aznar y Alarcón, 2002).

Al cabo de este tiempo se tomaron 3.5 µl de cada muestra y se mezclaron con 1 µl de buffer de carga, se analizaron por electroforesis corriendo en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X por un tiempo de 90 minutos a 100 V junto el marcador molecular. El gel se reveló con solución de bromuro de etidio (1 ppm) por 20 minutos y se obtuvo la imagen del gel en el transiluminador UV.

#### **5.4 Comportamiento en pimiento morrón de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en ausencia y presencia del hongo deteriorador**

##### **5.4.1 Material biológico**

**Chiles pimiento morrón.** Se utilizaron chiles pimientos dulces tipo Bell (*Capsicum annuum* L.) rojos, sin lesiones y maduros obtenidos de los invernaderos. Los chiles se almacenaron a 10°C por no más de 5 días y solamente se incluyeron en el estudio frutos libres de lesiones y magulladuras. El día del experimento los chiles se atemperaron a 22°C previo a su inoculación.

##### **Cepas**

**Hongo deteriorador.** Se empleó la cepa de *Fusarium stilboides* (CFNL-2769) aislada de pimientos que presentaban el daño.

***Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*.** Se utilizaron mezclas de cuatro cepas de *Salmonella* (S. Montevideo, S. Abaetetuba, S. Typhimurium, S. Thompson) y cinco cepas de *L. monocytogenes* (Scott A, LCDC, V7, 101-M, 101-14) resistentes a rifampicina obtenidas del Laboratorio de Microbiología e Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Los cultivos se mantuvieron en congelación en caldo soya tripticasa (CST) con glicerol (15 %).

#### **5.4.2 Activación de las cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes***

De cada cepa se tomaron 30  $\mu$ l y se inocularon por separado en tubos con CST (3ml) se incubaron 24 h a 35 °C; después de este tiempo se hizo un segundo pase de 30  $\mu$ l a un nuevo tubo con 3ml CST y se incubó por 18h a 35°C para tener aproximadamente  $10^9$  células por ml.

#### **5.4.3 Preparación de inóculo**

##### ***Salmonella* spp. y *L. monocytogenes***

Se tomó una alícuota de 1ml de cada cepa activada en un tubo cónico, se centrifugo (3500 g, 15 min) y se decantó el líquido y los paquetes celulares se lavaron y se resuspendieron en solución salina isotónica (SSI, 0.85% NaCl), se repitió el procedimiento de lavado y finalmente las células se resuspendieron en agua estéril. Se prepararon diluciones decimales en DP para obtener un inóculo aproximado de  $10^7$  células /100  $\mu$ l. El recuento de la suspensión celular utilizada como inóculo se efectuó en agar soya tripticasa suplementado con rifampicina (400 ppm) y pimaricina (100 ppm) (ASTRP) mediante la técnica de extensión por superficie. Las placas se incubaron a 35°C por 48 horas.

##### ***Fusarium stilboides***

Para la preparación del inóculo con el hongo se inocularon frascos con APD inclinado, por cinco días a 22 °C. Se adicionó solución salina al 0.85 % y se homogeneizó, la suspensión obtenida se filtró en gasa estéril, y se almacenó en refrigeración (4-6 °C). El recuento de esporas viables se realizó por vaciado en placa en medio APD (Sánchez y col., 2008; Rodríguez y col., 2008).

#### **5.4.4 Inoculación de los pimientos**

Los pimientos se inocularon con  $10^7$  células/100  $\mu$ l de la suspensión celular de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en experimentos separados,

distribuidos en 10 gotas (10  $\mu$ l) en la superficie del chile. Los frutos se colocaron en charolas de aluminio para su inoculación y se dejaron secar por 45 minutos. Posteriormente los chiles se pusieron dentro de cámaras ajustadas a una humedad relativa (HR) de 100 % con sal de  $K_2SO_4$  (Karal) cerrados herméticamente. Las cámaras se incubaron a 22 y 10°C durante 14 días monitoreando la temperatura y la HR (One Wire Viewer versión 0.314.7).

Para la inoculación del chile con el hongo primeramente se utilizó un inóculo de  $10^3$  esporas /100  $\mu$ l distribuidos en 10 gotas (10  $\mu$ l) sobre el pedúnculo, cáliz y pulpa del pimiento. Los pimientos fueron incubados durante 48 h a 10°C; posteriormente se inoculó *Salmonella* y *L. monocytogenes* en pedúnculo, cáliz y pulpa. Los chiles se incubaron a 10°C durante 14 días.

#### **5.4.5 Recuento de células**

El recuento de células se realizó a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 264 y 336 h de almacenamiento. Cada chile se colocó en una bolsa de polietileno que contenía 25 ml de DP 0.1 % y se frotó vigorosamente desde el exterior durante 1 minuto. El recuento se realizó a partir del DP en ASTRT, mediante la técnica de extensión por superficie. Las placas se incubaron a 35°C por 24 h. Los resultados se analizaron por medio del programa DMFit. ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)), el cual permite calcular los parámetros de crecimiento: duración de la fase lag, velocidad de desarrollo ( $\mu$ ) y máxima población alcanzada (MP).

El recuento del hongo se realizó en placas de APD adicionado con ampicilina al 1% y rosa de bengala al 6% mediante la técnica de extensión por superficie.

#### **5.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico**

La unidad experimental fue un chile pimiento morrón. Se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, en arreglo bifactorial, siendo los factores de estudio: temperatura, presencia y ausencia del hongo deteriorador. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de las variables de crecimiento obtenido, y la significancia entre las medias de los tratamientos se determinó mediante la prueba de Tukey usando el programa JMP 5.0.1.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Descripción de las instalaciones y de las prácticas realizadas en los invernaderos**

Los muestreos se realizaron durante un año (mayo 2009 – mayo 2010) procurando una visita por semana. En ese periodo se realizó un análisis observacional para detectar las posibles violaciones a las buenas prácticas agrícolas que pudieran afectar a la inocuidad microbiana del pimiento. El chile pimiento morrón producido en los invernaderos en estudio es cultivado por técnica de hidroponía, la cual es una tecnología para cultivar plantas en soluciones que proporcionen elementos esenciales para el buen desarrollo de la planta como sulfato de magnesio, potasio, zinc, fosfatos monopotásicos, nitritos de potasio y calcio, hierro, ácido bórico, cloruro de magnesio y cobre y trióxido de molibdeno (Bar-Tal y col., 1996) con o sin apoyo mecánico al vegetal (como la fibra de coco). Dentro de los invernaderos la temperatura es controlada, así como la humedad.

El agua empleada en los invernaderos incluida la que se ocupa para la preparación de la solución hidropónica es obtenida a partir de pozo profundo protegido adecuadamente. El agua es tratada mediante osmosis inversa y recolectada en contenedores ubicados en la parte exterior del invernadero cubiertos con una lona plastificada. Es importante mencionar que la solución hidropónica que se derrama durante el riego de las plantas de pimiento se colecta por medio de tuberías y es conducida hacia una cisterna. Esta solución es tratada con luz ultravioleta (UV), combinada con el agua limpia proveniente de la osmosis inversa, para finalmente adicionar las sales para generar nuevamente la solución hidropónica. La mezcla es enviada a las plantas por tuberías y dispensada por medio de mangueras con goteros enterrados en la fibra de coco que sirve de soporte para las raíces de la planta. Este soporte se encuentra suspendido en canaletas a una altura aproximada de 50 cm del piso.

El invernadero consta de 7.5 hectáreas de cultivo dividido en dos áreas una de 2.5 hectáreas y otra de 5 hectáreas donde se producen diferentes cultivares de pimiento caracterizados por su diferencia de color (amarillo, rojo y naranja). Los chiles son cosechados por personal capacitado utilizando cuchillos o navajas. Al inicio del estudio los trabajadores sumergían en leche los utensilios de

corte para “impedir” la infección de las plantas con virus. Esta práctica se erradicó, y en su lugar se implementó el uso de desinfectantes como sales cuaternarias de amonio (400 ppm). Los chiles cosechados se transportan en vagones hasta el área de empaçado.

El personal que labora en el invernadero cuenta con calzado exclusivo para uso dentro del invernadero, tapetes sanitarios a los cuales se les realiza dos cambios al día de desinfectante a la entrada del invernadero.

El lavado de manos de los trabajadores después de ir al baño es un punto que no se encontraba monitoreado o regulado por la empresa al menos al inicio de este estudio. Posteriormente la empresa vio la necesidad de capacitar a su personal para poder certificarse y exportar sus productos a Europa. Para ello fue necesario implementar las normas y medidas establecidas en el *Global GAP* (Good Agricultural Practices), y por ende el lavado de manos fue un punto de control para disminuir riesgos de contaminación durante la producción, cosecha y empaque del chile pimiento morrón. Montville y col. (2001) han señalado que el adecuado lavado de manos no elimina todos los patógenos potencialmente presentes, pero puede reducir significativamente la contaminación a los alimentos y superficies.

En el área de empaçado, los chiles son descargados (vertidos) sobre dos bandas transportadoras que los conducen a la zona de selección en donde el personal los clasifica de acuerdo a su tamaño, forma y color para ser empaçados y destinados al mercado nacional o bien de exportación. En esta zona en días de alta producción la limpieza de las bandas dejaba de hacerse por semanas ya que el paro en el empaçado representaba, aparentemente, cuantiosas pérdidas. Al implementar las GAP's durante la producción del chile, se implementó un sistema de limpieza cada 15 días con sales cuaternarias de amonio y ya no sólo con agua como lo realizaban al principio de este estudio. La limpieza del piso del área de empaque se realiza con cloro a 200 ppm.

El presente estudio aporta datos útiles en la interpretación de los resultados microbiológicos y permitió la identificación de las fallas más frecuentes y la confirmación en el laboratorio de los peligros latentes.

Para conocer si existía un reservorio del hongo deteriorador dentro de los invernaderos, o bien en las áreas de selección, empaque y almacenamiento, se muestrearon materiales diversos como fibra de coco que sirve de soporte a la planta, solución hidropónica, agua, cuchillos, vagones transportadores, bandas de empackado, aire de invernadero y de cámara fría donde se almacenan los chiles, y pimientos recién cosechados y almacenados en la cámara fría. En la Tabla 5 se concentra el número de muestras colectadas durante el estudio. Destaca el número total de muestras (1144) y en especial de muestras de pimiento (529).

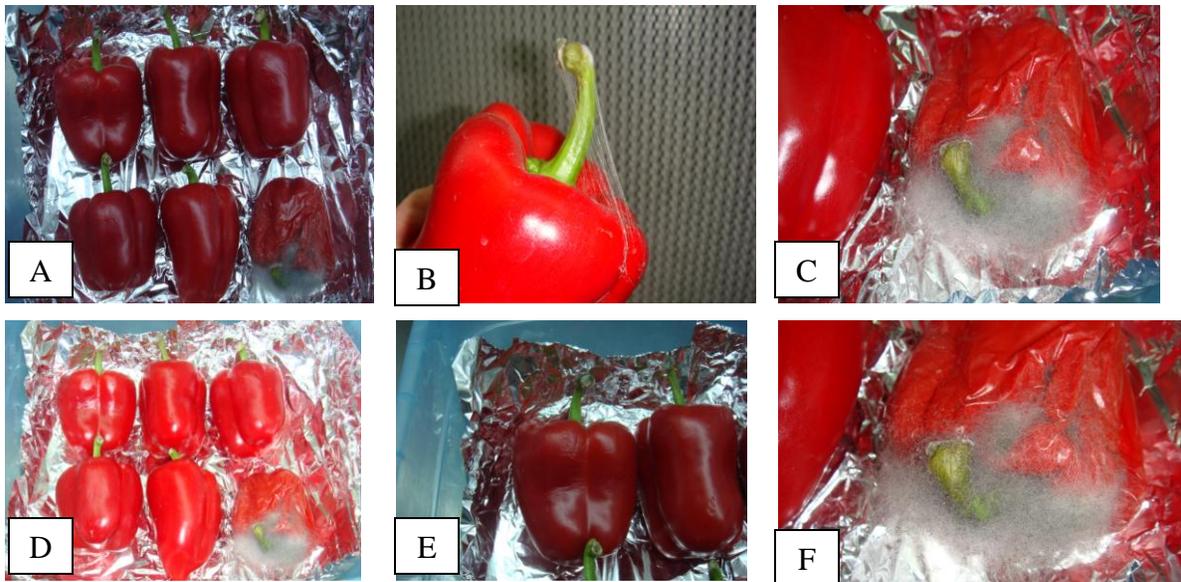
**Tabla 5.** Número total de muestras colectadas en la empresa productora de pimiento morrón.

MUESTRAS	NÚMERO DE MUESTRAS			TOTAL
	2009	2010		
	MAYO	SEPT-DIC	FEB-MAYO	
Chiles	79	200	250	529
Semillas	2	-	-	2
Fibra de coco nueva	6	-	-	6
Fibra de coco usada	5	15	4	24
Mangueras con gotero usadas	20	-	-	20
Agua osmosis	-	-	10	10
Agua de tanque recolector	-	-	6	6
Sol. hidropónica antes de tratamiento uv	-	-	11	11
Sol. hidropónica después de tratamiento UV	-	-	8	8
Solución hidropónica en uso	4	40	15	59
Cuchillos	-	10	20	30
Vagones	-	10	20	30
Bandas transportadoras	17	54	90	161
Aire invernadero	18	80	80	178
Aire cámara fría	-	10	60	70
<b>TOTAL</b>	<b>151</b>	<b>419</b>	<b>574</b>	<b>1144</b>

:- no se recolectaron muestras

## 6.2. Aislamiento e identificación del hongo deteriorador del pimiento morrón durante la poscosecha

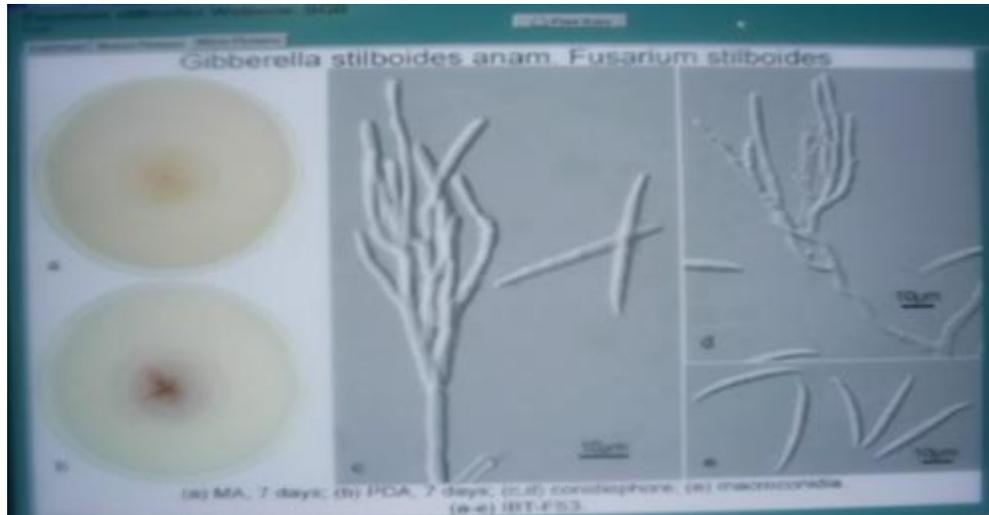
A partir de chiles que presentaban deterioro se aislaron dos cepas de hongos. Las cepas se inocularon en los pimientos y se logró la reproducción del daño en pimientos sanos (Figura 4).



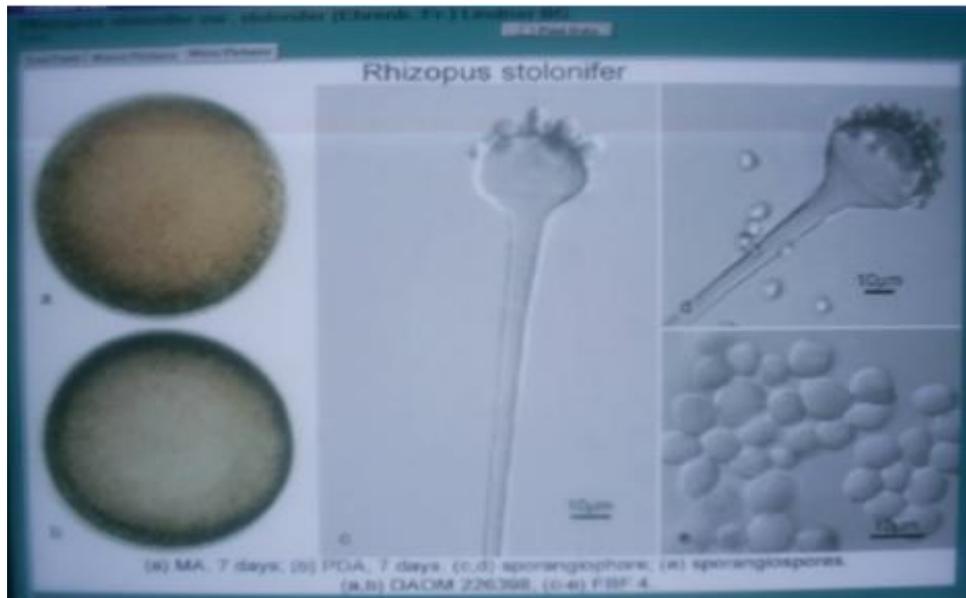
**Figura 4.** A y D: Reproducción del daño en pimiento morrón. B: Estructura filamentosa de *Fusarium stilboides* en pedúnculo. C y F: Desarrollo de *F. stilboides* en la pulpa de pimiento. E: pimiento sin daño aparente.

La identificación de las dos cepas de hongos deterioradores de acuerdo a la morfología microscópica y las pruebas bioquímicas se identificaron como *Fusarium stilboides* (Figura 5) y *Rhizopus stolonifer* (Figura 6).

La identificación bioquímica de *Fusarium stilboides* de acuerdo a la base de datos de Biolog MicroStation arrojó los siguientes parámetros: probabilidad negativa (no asignó un valor numérico de probabilidad para asociarlo con el género), y una similitud de 0.33. Para *Rhizopus stolonifer* los parámetros de identificación fueron: probabilidad de 99% y similitud de 0.727 (Tabla 6).



**Figura 5.** Imágenes macroscópicas y microscópicas de *Fusarium stilboides* obtenidas de la base de datos de Biolog MicroStation™



**Figura 6.** Imágenes macroscópicas y microscópicas de *Rhizopus stolonifer* obtenidas de la base de datos de Biolog MicroStation™

Esto coincide con lo reportado por Martín y col. en el 2005 donde encontraron que en pimenton ahumado los hongos predominantes fueron *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Fusarium* (en cantidades de 4 log UFC/g).

Los hongos son contaminantes comunes de los pimientos. El secado y la conservación del pimentón ahumado son puntos críticos porque pueden proporcionar las condiciones adecuadas para el crecimiento y proliferación de hongos. En un estudio realizado por Ruiz-Moyano y col. en el 2009 se identificaron mediante la técnica de PCR-RFLP los hongos presentes en pimentón ahumado. Los géneros identificados fueron: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Mucor* spp. y *Phlebia* spp.

El genero *Fusarium* es generalmente causante de marchitamiento en plantas como el tomate perteneciente a la familia de la solanáceas al igual que el pimiento morrón (Agrios, 1988). *Fusarium* se caracteriza por un micelio incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquiere tonalidad rosa pálido o ligeramente púrpura. Este patógeno produce tres tipos de esporas asexuales. Microconidios, macroconidios, y clamidosporas. Estos tres tipos de esporas se forman en los cultivos del hongo y quizá también en el suelo, aunque cabe decir que sólo las clamidosporas sobreviven en este último sustrato durante más tiempo (Agrios, 1998).

*Fusarium* a sido aislado de plantas de pimiento e identificado en lesiones que aparecen en la planta, caracterizándolo como *Fusarium solani* (Fletcher, 1994).

El patógeno es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectados que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas.

Se propaga a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez que un área haya sido infectada por *Fusarium* se mantenga así por tiempo indefinido (Agrios 1998).

*Fusarium* produce los "mohos" en plantas de ornato y hortalizas de poscosecha, especialmente de cultivos de raíces, tubérculos y bulbos, pero las plantas de poca altura, como las cucurbitáceas y los tomates, también son

afectadas. *Fusarium* también ocasiona la pudrición café de las naranjas y los limones que se mantienen almacenados durante mucho tiempo. Con respecto a la mayoría de las hortalizas, la contaminación por *Fusarium* se produce en el campo antes o durante la cosecha, aun cuando la infección pueda desarrollarse durante el almacenamiento de ellas. Las pérdidas son particularmente considerables en el caso de cultivos tales como el de papa, que son almacenados durante largos períodos. Los tejidos afectados aparecen ligeramente húmedos y muestran un color café claro al principio, pero más tarde adquieren un color café oscuro y se secan un poco. Conforme se extienden las áreas putrefactas, a menudo se hunden, la cáscara del fruto se arruga y aparece sobre ella un pequeño penacho de moho de color blanquizco, rosa o amarillo, como el presentado en la pudrición en chile pimiento morrón caracterizado por micelio blanquecino con centro púrpura y que reblandece la pulpa cuando ésta es infectada (Agrios, 1998).

Poca es la información reportada de *Fusarium stilboides* var. *minus* (Wollenw); también es conocido con el nombre de *Gibberella stilboides*, *Fusarium fructigenum* var. *minus* Wollenw, *Fusarium lateritium* var. *longum* Wollenw., (<http://zipcodezoo.com/default.asp>).

La infección promovida por patógenos de plantas como es el caso de las especies de *Fusarium* no solo son capaces de reducir la calidad de los alimentos sino que también pueden sintetizar micotoxinas que pueden afectar la salud de animales y humanos (Edwards, 2004). En particular hongos como *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme* y *F. lateritium* (Di Pietro y col., 2003; Neves Filho y col., 2009).

Por su parte *Rhizopus stolonifer* ocasiona la pudrición blanda de frutos y hortalizas se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y aparece en órganos carnosos de hortalizas, en plantas florales y en frutos cosechados, es importante durante el almacenamiento, transporte y venta en el mercado de estos productos. Entre las plantas de cultivo que son atacadas con mayor frecuencia por esta enfermedad se encuentran las fresas, camotes, todas las cucurbitáceas, los duraznos, cerezas, cacahuates, entre otros. Al principio, las zonas infectadas de los órganos carnosos aparecen como si estuvieran embebidas en agua y son muy blandas. Aun cuando la cáscara de los tejidos que han sido infectados se

mantenga intacta, el órgano carnosos ablandado pierde humedad gradualmente hasta que se arruga y momifica. Sin embargo, es más frecuente que la cáscara ablandada se rompa durante su manipulación o cuando se le aplica cierta presión, como ocurre cuando se amontonan los frutos; esto hace que de ellos salga un líquido amarillo blanquizco (Agrios, 1998).

Las enzimas pectinolíticas que secreta el hongo avanzan por delante del micelio y separan a las células antes de que el micelio se fije en ellas. Las células de los tejidos macerados son entonces atacadas por las enzimas celulolíticas del hongo, las cuales degradan la celulosa de la pared celular y, debido a ello, las células se desintegran. El micelio del hongo crece inter-celularmente y al parecer no invade a las células de la planta; sólo lo hace cuando han muerto y han empezado a desintegrarse. Todo esto parece indicar que el micelio nunca entra en contacto con las células vivas del hospedante y que queda rodeado por células muertas y sustancias orgánicas inertes, de ahí que viva más bien como una forma saprofita que como parásito. El hongo emerge entonces a través de las heridas preexistentes en el fruto o bien a través de desgarres posteriores de la epidermis y produce esporangióforos aéreos, esporangios, estolones y rizoides, siendo estos últimos los que perforan la epidermis ablandada del fruto (Agrios, 1998).

Las pérdidas debidas a las enfermedades de poscosecha se estiman en un 10 a 30% de la pudrición total de los cultivos, y en algunos cultivos percederos no son raras las pérdidas superiores al 30%, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Agrios, 1998). *Fusarium stilboides* es el posible causante del deterioro caracterizado por el micelio blanquecino siendo *Rhizopus stolonifer* un hongo oportunista el cual infecta al pimiento cuando *Fusarium* ha producido un daño en la pared del fruto y así puede iniciar su colonización.

### 6.3 Aislamiento e identificación de *Fusarium* y *Rhizopus* en materiales relacionados con el cultivo, cosecha y almacenamiento de pimiento morrón

Se analizaron muestras de materiales como: cuchillos, fibra de coco, mangueras con goteros, aire del invernadero y de la cámara fría, bandas transportadoras, pimiento recién cosechado y pimiento almacenado en cámara fría. De estos materiales se aislaron 15 cepas que presentaban estructuras macroscópicas y microscópicas semejantes a las estructuras de *Fusarium* y *Rhizopus* identificados como causantes de deterioro en el chile pimiento morrón. De las 15 cepas se seleccionaron 8 para su confirmación por medio del sistema Biolog MicroStation™; los resultados se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Hongos aislados e identificados en diversos materiales, aire y chiles colectados en la empresa productora de chile pimiento morrón.

Material	Hongo	Lectura Biolog
Chile deteriorado original	<i>Fusarium stilboides</i> Wollenw BGB	Prob (-) SIM (0.33) Dist (10.89)
	<i>Rhizopus stolonifer</i> var <i>stolonifer</i> (Ehrenb. Fr) Lindner BG	Prob (99%) SIM (0.727) Dist (4.13)
Fibra de coco	<i>Trichoderma atroviride</i> Karsten	Prob(-) SIM (0.213) Dist (11.90)
	<i>Rhizopus microsporus</i> var <i>microsporus</i> V. Tiegham	Prob(-) SIM ( 0.18) Dist (15.46)
Gotero	<i>Rhizopus stolonifer</i> var <i>stolonifer</i> (Ehrenb. Fr) Lindner BG	Prob (-) SIM (0.516) Dist (7.69)
Aire Invernadero	<i>Rhizopus stolonifer</i> var <i>stolonifer</i> (Ehrenb. Fr) Lindner BG	Prob (-) SIM (0.333) Dist (11.38)
	<i>Acremonium charticola</i> (Lindau) W Gams	Prob (-) SIM (0.215) Dist (11.38)
Chile rojo de invernadero	<i>Fusarium Oxysporum</i> Schlecht Fr. BGA	Prob. (91%) SIM (0.639) Dist(4.53)
Chile rojo de cámara fría	<i>Fusarium stilboides</i> Wollen BGB	Prob (-) SIM (0.376) Dist (9.81)
	<i>Rhizopus stolonifer</i> var <i>stolonifer</i> (Ehrenb. Fr) Lindner BG	Prob(-) SIM (0.238) Dist (4.53)

Prob: Porcentaje de similitud

SIM: Valor de índice de similitud debe ser cercano a 1.00

Dist: Distancia debe ser cercano a 0.00

Con estos resultados se llegó a la ubicación de las posibles fuentes de contaminación del *Fusarium* y *Rhizopus*. Para el caso de *Rhizopus* se logró aislar de fibra de coco, manguera con gotero, aire del invernadero y en chiles pimiento morrón almacenados en la cámara fría. Estos resultados eran de esperarse, ya que este microorganismo es de tipo ambiental el cual puede llegar a deteriorar con mayor facilidad los frutos cuando estos llegan a presentar algún daño mecánico ya sea por su manejo en la cosecha o durante el empaclado. En el caso del género *Fusarium* se logró detectar directamente de la superficie del chile, tanto de chiles ubicados en la zona de invernadero como chiles almacenados en la cámara fría. Es sabido que la contaminación por *Fusarium* se produce en el campo antes o durante la cosecha, aún cuando la infección en el fruto pueda desarrollarse durante el almacenamiento (Agrios, 1998). El uso de fungicidas es una alternativa para el control de estos microorganismos, por lo que la empresa productora decidió utilizar fungicidas como el bicarbonato de potasio en los cepillos ubicados en el área de empaclado cuya función es retirar el polvo o tierra que los frutos pudieran presentar antes de ser empacados. El bicarbonato de potasio ha sido evaluado para controlar la presencia de hongos como el *Penicillium* en la superficie de naranjas usándolo al 3% y en combinación con la aplicación de suspensiones de *Pantoea agglomerans* como antagonista. Este tratamiento puede ser una alternativa a los fungicidas químicos para el control del moho verde en naranjas (Zamni, 2007). Otra medida correctiva empleada es mantener la humedad relativa al 87 % en épocas calurosas y en la etapa juvenil de la planta dentro del área del invernadero.

#### **6.4 Incidencia de microorganismos indicadores en pimiento y materiales asociados a su cultivo y empaque**

Conocer el perfil microbiológico dentro del invernadero y la zona de empaclado permite determinar la calidad microbiológica de los productos y valorar las condiciones higiénicas prevalentes a lo largo de la producción, cosecha y empaque. En consecuencia es posible detectar las fuentes de contaminación de microorganismos patógenos al humano.

En las muestras examinadas se cuantificaron las poblaciones de BMA, CT, H/L y *E. coli*. Es práctica común durante la fabricación y control sanitario de los alimentos determinar el número de microorganismos que contienen. Los objetivos son variados pero en especial para este proyecto fue de interés saber la existencia de una relación entre la abundancia de determinados microorganismos indicadores y la calidad sanitaria del pimiento, así como evaluar la eficacia de los procesos de desinfección que se aplican en la empresa.

Otro grupo indicador que se estudió fue el grupo de CT, aplicándose este término a todas las bacterias semejantes a *E. coli*, en su hábitat, morfología y cultivo. Este indicador se refiere a calidad sanitaria del agua y de los alimentos. La definición más adecuada del grupo las describe como “bacterias aerobias o facultativamente anaerobias, Gram negativas, no esporuladas que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48 hrs de incubación a 35°C” (Fernández, 1981). Típicamente dentro del grupo coliforme se encuentran géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que fermenta fácilmente la lactosa: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. De hecho el grupo no se configura a base de géneros microbianos, sino de cepas que en el desarrollo de la prueba cumplen con la definición. Algunas cepas de *Salmonella*, por ejemplo, se comportan como coliformes por el hecho de fermentar la lactosa, en tanto que cepas de *E. coli* lentas fermentadoras de lactosa (incluso patógenas) quedan fuera de la definición (Fernández, 2008).

El grupo de hongos y levaduras (H/L) también se determinó en este estudio, ya que una variedad de ellos pueden contaminar y desarrollarse en los alimentos o simplemente permanecer en ellos y adquirir un especial significado desde el punto de vista económico como es el caso en este proyecto. La consecuencia de su actividad en los alimentos se manifiesta en dos sentidos: la producción en ciertos casos de sustancias tóxicas para el hombre y los animales, y la descomposición o aparición de alteraciones en el alimento. La importancia de su estudio se justifica debido a que al desarrollar en los alimentos dan lugar a cambios indeseables en su aspecto, consistencia, color, etc. Muchos hongos son patógenos para los vegetales, incluso frutos y causan serios trastornos

económicos por los daños que en ellos producen mediante las enzimas que elaboran (Fernández, 2008).

En este estudio se abarcaron todas las etapas de producción del chile: cultivo, cosecha y empaçado. La investigación se dividió en tres periodos: última cosecha (mayo 2009), época fría (septiembre- diciembre 2009) y época calurosa (Febrero- Mayo 2010); en estos periodos se incluyó el muestreo de producto y materiales diversos asociados a su producción.

#### 6.4.1 Pimiento morrón

Los niveles de BMA, CT Y H/L encontrados en el chile se muestran en la Tabla 7. Para evaluar la calidad microbiológica de los pimientos colectados durante los tres periodos de muestreo señalados se realizó una comparación de medias encontrándose diferencias significativas entre las poblaciones ( $P \leq 0.05$ ). Se observó que al final de la temporada 2009 (muestreo realizado en mayo del 2009) los niveles de BMA son mayores que en la época de frío de la siguiente temporada (2010) y que estas poblaciones se disminuyen nuevamente en la época de calor.

**Tabla 7.** Medias de BMA, CT y H/L en chile pimiento morrón en los tres periodos de muestreo.

Periodo	N1	Log UFC/chile					
		BMA		CT		H/L	
Mayo 2009	79	$6.7 \pm 0.82^2$	a <sup>3</sup>	$2.4 \pm 0.93$	a	$6.2 \pm 0.53$	a
Sep. - Dic. 2009	200	$5.7 \pm 0.87$	b	$4.2 \pm 1.54$	b	$5.7 \pm 0.69$	b
Feb. - Mayo 2010	250	$4.5 \pm 1.09$	c	$3.6 \pm 1.51$	c	$5.5 \pm 0.67$	c

<sup>1</sup>: Muestras analizadas.

<sup>2</sup>: Valor de media  $\pm$  desviación estándar.

<sup>3</sup>: Letras iguales no hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre temporadas de muestreo. Comparación de medias por prueba de Tukey.

El nivel promedio alcanzado en el periodo de febrero a mayo del 2010 para BMA fue de 4.5 Log UFC/ pimiento; en el Reino Unido en las hortalizas listas

para su consumo el límite satisfactorio de BMA (a 30°C/48h) debe ser  $<10^6$  UFC/g, aceptable de  $10^6$ -  $<10^7$ , e insatisfactorio  $\geq 10^7$  (Fernández-Escartín, 2008).

En cuanto a los valores de CT, sorpresivamente fueron mayores en la época de frío que en la época de calor. En un estudio realizado por Orozco (2008) se reporta una mediana de 0.5 log UFC/ fruto para CT en jitomate cultivado por técnica de hidropónia. Los valores encontrados en pimiento en este estudio son elevados (4.2 log UFC/pimiento) en comparación con lo reportado para jitomate cultivado empleado la misma técnica.

El contenido de H/L fue disminuyendo desde el final de temporada 2009 (Mayo) hasta el periodo de febrero-mayo del 2010. Este hallazgo puede tener relación con el uso de fungicidas como es el bicarbonato de potasio, en los cepillos limpiadores de pimiento ubicados en la línea de empaqueo lo cual ayudo a que se presentará un disminución en el contenido de hongos en la superficie de los frutos.

*E. coli* fue detectada en 5 % de los chiles, con límites de 1.7 hasta 28 NMP/chile (Tabla 8). Al respecto Rangel en 2009 reporta valores de  $<1.4$  hasta 28 NMP en zanahoria y resalta que la mayor incidencia se presentó en zanahoria ya cosechada. En otro trabajo García-Villanova (1987) encontró que en hortalizas cultivadas en campo el contenido de *E. coli* fue en promedio de 12 NMP/g. Orozco (2008) en una encuesta realizada en el 2007 detectó la presencia de *E. coli* en el 0.7 % de los jitomates cultivados en un invernadero mediante la técnica de hidroponía ( $< 0.5$  NMP/jitomate); más tarde en el 2008 el porcentaje de positividad se incremento hasta 2.7 %. En nuestro estudio la mayor incidencia de *E. coli* se observó en chiles recién cosechados. Estos resultados pueden relacionarse por un lado con el manejo directo del chile por el personal, y por otro con el lavado de manos de los trabajadores, ya que no es una práctica que se vigila y controla dentro de la empresa. Los valores de incidencia encontrados de *E. coli* en pimiento morrón son elevados para productos cultivados por hidroponia. Mukherjee y col. (2004) detectaron *E. coli* en el 1.6 % de muestras de vegetales cultivados de forma tradicional. Thunberg y col. (2002) detectaron una muestra positiva de 50 analizadas para *E. coli*; los productos analizados fueron alfalfa,

brócoli, coliflor, lechuga y cilantro. Serna (2004) encontró un 5.2 % de positividad de *E. coli* en jitomate hidropónico.

La positividad a *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes* detectada en pimiento morrón se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.** *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes* en superficie de pimiento morrón producido en invernadero hidropónico.

<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>
+/N (%) <sup>1</sup>	NMP/unidad	+/N (%)	+/N (%)	+/N (%)
27/529 (5)	2 <sup>2</sup> (1.7-28)	4/132 (3)	17/132(12)	0/132 (0)

<sup>1</sup>Muestras positivas/muestras analizadas (% positividad).

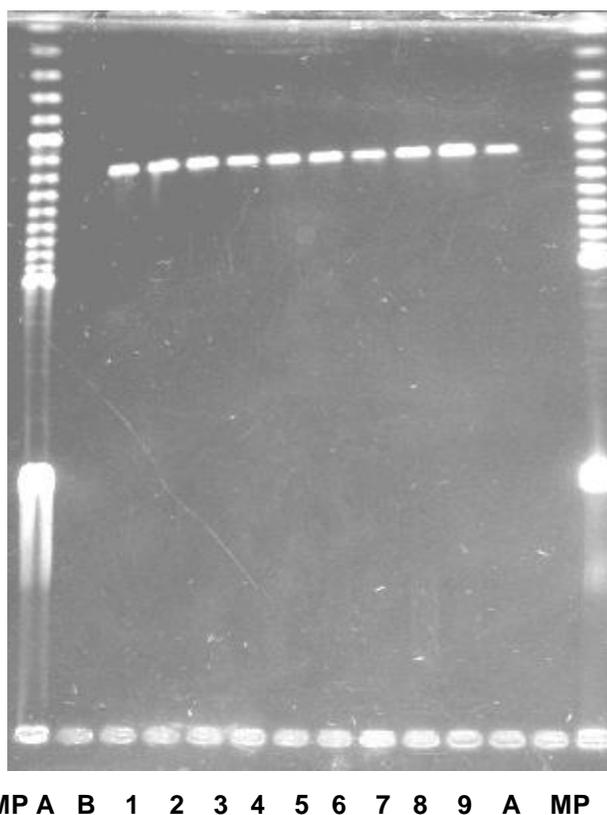
<sup>2</sup>Mediana (limites)

La frecuencia de *Salmonella* suele ser baja en frutas y verduras (0-3 %) (Castillo y col., 2004; Rico-Romero, 2003).

La positividad para *Salmonella* en Chile fue del 3%; las cepas aisladas mediante la técnica tradicional fueron confirmadas por serología y posteriormente por PCR (Figura 7). Este valor concuerda con lo reportado por Orozco en 2008, en donde para jitomate hidropónico el porcentaje de positividad a *Salmonella* fue del 2.8%. Otros autores reportan la ausencia de *E. coli* y *Salmonella* en productos cultivados por hidroponía. Sin embargo en esos estudios el número de muestras analizadas fue menor que en el nuestro: 12 lechugas, 157 jitomates y 89 pepinos (Luedtke y col., 2003; Riser y col., 1984). La presencia de *Salmonella* en nuestro estudio puede tener relación con el número y el tamaño de muestra analizada. En muchos trabajos se analizan 25 g de muestra homogenizada en nuestro caso se frotó externamente la superficie de cuatro chiles y el contenido del líquido se mezcló para formar una sola muestra (muestra compuesta) y determinar en ella la presencia de los patógenos.

Como es sabido, la presencia de *Salmonella* en los alimentos es una manifiesta expresión de la exposición directa del alimento a la materia fecal humana o animal (Fernández- Escartín 2008). Las fuentes de contaminación de *Salmonella* pueden ser diversas y operar en forma simultánea. Durante el cultivo

se debe poner atención en el suelo, aire y agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado y personal que cultiva la tierra (Beuchat, 1996). Por lo anterior se muestrearon diferentes materiales relacionados al cultivo de pimiento morrón.



**Figura 7.** Identificación mediante PCR de las cepas de *Salmonella* aisladas de Chile pimiento morrón. Marcador de peso molecular de 50 pb (MP). Control negativo (A). Control positivo *Salmonella* Typhimurium (B). Cepas aisladas de pimiento morrón (1-9).

El género *Listeria* se detectó en el 12 % de las muestras, mientras que *L. monocytogenes* no se recuperó en ningún caso. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por De Simon y col. (1992) donde encontraron *Listeria* en el 18.2% de muestras de verduras crudas. En brócoli recién cosechado el microorganismo se detectó en el 11 % (Álvarez-Mayorga 1998). Varios estudios reportan baja incidencia de *L. monocytogenes* en productos hortofrutícolas, como es el caso en zanahoria en donde se encontró positividad de 9.5 % para *L. monocytogenes* (Rangel, 2009). Peltran y col. (1988) analizaron muestras de

remolacha, brócoli, col, coliflor, lechuga, champiñones, papas y no detectaron la presencia de *L. monocytogenes*. En 110 muestras de verduras analizadas solo se encontró una muestra con el genero *Listeria* más no se detectó *L. monocytogenes* (Farber y col., 1989).

#### **6.4.2 Incidencia de bacterias indicadoras, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes* en materiales asociados al cultivo de pimiento morrón**

Entre los materiales analizados para conocer el contenido de hongos se encuentran las semillas y mangueras que dispensan la solución hidropónica y que son reutilizadas en cada temporada. Aunado al conteo de los hongos en los materiales se hizo especial énfasis en la identificación de *F. stilboides*. Se ha reportado que la presencia de hongos fitopatógenos en diversos productos hortofrutícolas puede tener su origen en la semilla, por ejemplo en Chile la presencia de hongos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. fue de 12.8 % y 2.6 % para *Cladosporium* sp. y *Fusarium* sp. (Medina, 2009). En nuestro estudio los niveles de hongos fueron bajos de 3 Log UFC/10 semillas y no se logró recuperar el hongo de interés. En cuanto a las mangueras con gotero, se pudo aislar *Rhizopus* uno de los hongos recuperados de los chiles deteriorados, y el nivel de hongos fue elevado (5 log UFC/manguera). Esto es de esperarse debido a que la manguera está en contacto con la fibra de coco que permite guardar humedad para la planta, por medio de esta manguera se provee de nutrientes a la planta que junto con la humedad favorece que los hongos se desarrollen y encontrarlos en este material en niveles altos (Tabla 9).

También se analizó fibra de coco (nueva y usada) que se emplea como soporte de la planta. El contenido de hongos en la fibra nueva fue de 4.6 log UFC/g; no se detectaron los hongos aislados de los chiles deteriorados. El nivel de hongos es bajo en comparación con el nivel alcanzado cuando esta fibra está en uso en el invernadero (6.8 log UFC/g). La fibra de coco es usada como soporte a la planta. En ella se encuentran las raíces y se difunde la solución hidropónica que provee de nutrientes a la planta de pimiento y puede llegar a ser un reservorio importante de microorganismos. Esto se refleja en los valores elevados para las bacterias indicadoras (Tabla 9). Si bien la fibra de coco no tiene las mismas

características que la tierra de cultivo, su microbiología depende de los materiales que sobre ella se depositen, inclusive del aire que circule por el invernadero y algunos factores como pH, humedad, penetración del aire y luz. En las muestras de fibra de coco colectadas en el invernadero *Salmonella* no fue detectada (Tabla 10). *Salmonella* ha sido aislada a partir de tierra utilizada en cultivos de zanahoria (del 6 al 7 %) asociándose esta contaminación a la existencia de caminos cercanos de terracería donde circula la maquinaria agrícola y trabajadores (Rangel, 2009). En un estudio realizado por Rico (2003) se detectó *Salmonella* en el 3.1 % de muestras de tierra colectada del interior y exterior de invernaderos hidropónicos de jitomate. *Listeria* por ser una bacteria de vida libre fue encontrada en un 25% en fibra de coco (Tabla 10), más no se detectó la especie *monocytogenes* la cual se ha asociado a numerosas muertes debido a su alta letalidad.

La contaminación de frutos y hortalizas como melón jitomates y pimiento con *Salmonella* se ha asociado al uso de cuchillos mal saneados. Esta y otras practicas como la contaminación cruzada debido al mal manejo del producto, así como la falta de limpieza en los vehículos de transporte de los productos hortofrutícolas se han identificado como factores determinantes en la gestación de brotes de salmonelosis (Chia-Min y Cheng-I Wei, 1997). El análisis de cuchillas con las que se realiza la cosecha del pimiento morrón mostró niveles bajos de bacterias indicadoras y ausencia de *Salmonella*. En las muestras de las superficies de los vagones en general, los microorganismos indicadores se encontraron en cantidades aceptables y no se detectó la presencia de *Salmonella* ni de *Listeria* Tabla 10.

**Tabla 9.** Medias de BMA, CT y H/L en materiales relacionados con el cultivo y cosecha de pimiento morrón en los tres periodos de muestreo.

Materiales	Mayo 2009			Sep - Dic 2009			Feb-Mayo 2010		
	BMA	CT	H/L	BMA	CT	H/L	BMA	CT	H/L
Semillas (Log UFC/10 semilla)	ND	ND	<b>3.0</b> $\pm 0.98$ <sup>1</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Manguera con gotero (Log UFC/manguera)	<b>6.05</b> $\pm 0.79$	<b>3.3</b> $\pm 1.10$	<b>5.05</b> $\pm 0.66$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fibra de coco nueva (Log UFC/25g)	ND	ND	<b>4.6</b> $\pm 0.25$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fibra de coco usada (Log UFC/25g)	ND	ND	<b>5.7</b> $\pm 1.6$ ab	<b>7.4</b> $\pm 0.48$ a <sup>2</sup>	<b>7.1</b> $\pm 0.18$ a	<b>6.8</b> $\pm 0.45$ a	<b>6.5</b> $\pm 0.29$ b	<b>4.9</b> $\pm 0.17$ b	<b>5.2</b> $\pm 0.54$ b
Navajas (Log UFC/navaja)	ND	ND	ND	<b>3.4</b> $\pm 0.30$ a	<b>2.6</b> $\pm 0.40$ a	<b>4.2</b> $\pm 0.48$ a	<b>3.2</b> $\pm 0.70$ a	<b>2.2</b> $\pm 0.93$ a	<b>3.7</b> $\pm 0.95$ a
Carros transportadores (LogUFC/100 cm <sup>2</sup> )	ND	ND	ND	<b>5.6</b> $\pm 1.73$ a	<b>5.5</b> $\pm 1.83$ a	<b>3.8</b> $\pm 1.4$ a	<b>3.6</b> $\pm 0.57$ b	<b>2.4</b> $\pm 0.84$ b	<b>4.6</b> $\pm 1.05$ a

1: Log medias  $\pm$  desviación estándar

2: Letras iguales no hay diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre periodos de muestreo. Comparación de medias por prueba de Tukey.

ND No determinado

**Tabla 10.** Incidencia de *Salmonella*, *Listeria spp* y *L. monocytogenes* en materiales asociados al cultivo de pimiento morrón

	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>Muestra</b>	<b>+/N (%)<sup>1</sup></b>	<b>+/N (%)</b>	<b>+/N (%)</b>
Semillas	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)
Fibra de coco nueva	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Fibra de coco usada	0/24 (0)	6/24 (25)	0/24 (0)
Manguera con gotero	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)
Cuchillos	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)
Vagones transportadores	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)

<sup>1</sup>Muestras positivas/muestras analizadas (% positividad).

#### 6.4.3 Incidencia de BMA y hongos en el aire de invernadero y cámara fría

Al mismo tiempo que el monitoreo de los diversos materiales asociados al cultivo de pimiento, se dio seguimiento a la calidad del aire del invernadero. La atmósfera no tiene una microbiota autóctona pero es un medio para la dispersión de muchos tipos de microorganismos (esporas, bacterias, virus y hongos), procedentes de otros ambientes. Algunos han creado adaptaciones especializadas que favorecen su supervivencia y permanencia. Los microorganismos dispersados por el aire tienen una gran importancia biológica y económica. Los microorganismos pueden producir enfermedades en plantas, animales y humanos, causan alteración de alimentos y materiales orgánicos y contribuyen al deterioro y corrosión de monumentos y metales (De la Rosa y col., 2002). En las muestras de aire se cuantificó el contenido de BMA y hongos en el aire. En las placas de APD en donde se realizó el recuento de hongos se llevó a cabo la identificación macroscópica y microscópica de los hongos de interés *Rhizopus* y *Fusarium*. Los niveles de BMA y hongos fueron bajos (Tabla 11). Podemos decir que la calidad microbiológica del aire en este invernadero es apropiada. Los resultados sugieren que el número de hongos en el aire no está relacionado con la incidencia de la infección en el pimiento morrón. Esta se puede relacionar con la edad de la planta y factores ambientales como la humedad y temperatura.

**Tabla 11.** Medias de BMA y H/L en aire de invernadero y cámara fría de almacenamiento en los tres periodos de muestreo.

Tipo de Muestra	Log UFC/100 L					
	Mayo 2009		Sep-Dic 2009		Feb-Mayo 2010	
	BMA	H/L	BMA	H/L	BMA	H/L
Aire de invernadero	1.1 ± 0.55 <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	ND	1.4 ± 0.46 b	2.1 ± 0.33 a	1.1 ± 0.39 a	2.2 ± 0.55 b
Aire de Cámara Fría	ND	ND	1.4 ± 0.17 a	2.2 ± 0.19 a	0.9 ± 0.43 b	2.1 ± 0.20 a

<sup>1</sup>: Valor de media ± desviación estándar.

<sup>2</sup>: Letras iguales no hay diferencia significativa (P<0.05) entre temporadas de muestreo. Comparación de medias por prueba de Tukey.

ND No determinado

#### 6.4.4. Incidencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT), fecales (CF) y *E. coli* en agua y solución hidropónica

En el agua de fuentes naturales suele encontrarse gran variedad de microorganismos. Debe distinguirse la flora nativa de aquellas que se presentan únicamente tras un incidente de contaminación. La microflora del agua está muy determinada por los sitios con los que estuvo en contacto. Es una de las fuentes de contaminación de mayor relevancia para la industria, los servicios de alimentos, la agricultura y la explotación de animales acuáticos y terrestres, también es vehículo reconocido en brotes de enfermedades por agentes microbianos (Fernández-Escartín, 2008). El recuento de BMA pone de manifiesto una amplia diversidad de microorganismos por lo que se considera como indicador de la integridad física y limpieza de los sistemas de conducción y almacenamiento. Los coliformes totales sugieren un tratamiento inadecuado de desinfección. Su presencia puede revelar un reingreso de materiales objetables incluidos desechos humanos o de animales, reanudación de desarrollo o formación de biopelículas. El indicador de contaminación fecal más confiable en agua es *E.coli*; el agua destinada al consumo debe estar exenta de esta bacteria (Fernández-Escartín 2008). Warrington (1988) publicó una guía microbiana para diferentes tipos de agua en donde se señala que los valores promedio para *E. coli* y coliformes

fecales en agua de irrigación para verduras que se consumen crudas debe ser de  $\leq 77/100$  ml y  $\leq 200/100$  ml respectivamente.

En la Norma Oficial Mexicana (NOM 127 SSA1-1994) establece como límite para CT  $< 2$  NMP/100ml y para coliformes fecales (CF) no detectable (NMP/100ml) en el agua destinada a consumo humano.

El seguimiento en el invernadero se inició analizando la solución hidropónica que llegaba hasta la planta determinando BMA, CT, CF y *E. coli*. Posteriormente se realizó el análisis del agua utilizada para elaborar la solución hidropónica la cual se somete a tratamiento de osmosis inversa y almacenada en tanques cubiertos con plástico que se ubican en el exterior del invernadero; finalmente también se analizó la solución hidropónica que se reciclaba y posteriormente era tratada con luz UV. Los resultados de los análisis se muestran en las Tablas 12, 13 y 14. El agua utilizada para preparar la solución hidropónica y que también se destina a otros usos dentro de la empresa cubrió los requerimientos establecidos en la NOM127 SSA1-1994. Se observó un aumento (aunque discreto) en la cuenta de BMA y CT, cuando esta es recolectada y almacenada en los tanques de almacenamiento final, lo que puede deberse a que la protección no esta siendo efectiva contra los animales silvestres y tierra. En cuanto a la solución hidropónica reciclada, antes de ser tratada con luz UV presentó niveles elevados de BMA (6.1 log UFC/100ml) y CT (NMP 200/100 ml) los cuales disminuyó considerablemente después del tratamiento (BMA 4.3 log UFC/100 ml y CT NMP 2/100 ml). Respecto a la incidencia de *E. coli* en solución hidropónica tratada con UV esta también disminuye, más no se eliminó (Tabla 14). Como se sabe la presencia de *E. coli* es un indicador de contaminación fecal, y en nuestro caso, los resultados sugieren que este tipo de contaminación ocurre dentro de los invernaderos y en un momento dado la presencia de patógenos de origen intestinal puede ocurrir.

La solución hidropónica después del tratamiento con UV es mezclada con solución nueva y enviada hasta las plantas. En el paso por las tuberías hasta las mangueras, la incidencia de *E. coli* en la solución aumentó tal como se muestra en la Tabla 14. Si bien la presencia de *E. coli* en agua, en ausencia de materia orgánica, expresa claramente una contaminación fecal reciente por su

imposibilidad de mantenerse viable en este material, en el caso de la solución hidropónica su hallazgo podría no tener la misma interpretación ya que su composición podría dotar de fuentes de energía a la bacteria para permitirle sobrevivir o desarrollar a partir de números muy bajos. Orozco en el 2008 analizó 8 muestras de solución hidropónica no detectando la presencia de *E. coli* (límite de detección de  $\leq 0.28$  MNP/ml).

Xuan y col. (2002) demostraron que patógenos como *Salmonella* pueden ser transportados en solución nutritiva a plantas de jitomate a través de los cotiledones, tallos y hojas.

Si bien en el agua es importante el contenido de CT y CF, su presencia sobre frutas y hortalizas crudas no necesariamente provee un índice de contaminación fecal (Beuchat, 1998). En general es difícil encontrar territorios u objetos ajenos a la contaminación por coliformes totales; el impacto de este indicador en las hortalizas sobre la salud no es relevante (Johnson y col., 2005).

**Tabla 12.** BMA en agua y solución hidropónica colectada en el invernadero

Muestra	N*	Mayo 2009	Sep - Dic 2009	Feb-Mayo 2010
		Log UFC/100 ml		
Agua tratada con osmosis inversa	10	ND	ND	2.8 ± 1.04 **a <sup>1</sup>
Agua almacenada en tanque	6	ND	ND	3.83 ± 0.30 b <sup>1</sup>
Solución hidropónica antes de UV	11	ND	ND	6.1 ± 0.15 a <sup>2</sup>
Solución hidropónica después de UV	8	ND	ND	4.3 ± 0.89 b <sup>2</sup>
Solución hidropónica que llega a la planta	59	6.1 ± 0.69 a <sup>3</sup>	6.0 ± 0.54 a <sup>3</sup>	6.1 ± 0.37 a <sup>3</sup>

\*: Número de muestras totales

\*\*.: Media ± desviación estándar. Comparación de medias por la prueba de Tukey.

<sup>1</sup>: Letras iguales no hay diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre lugar de recolección de agua.

<sup>2</sup>: Letras iguales no hay diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre antes o después de tratamiento con UV.

<sup>3</sup>: Letras iguales no hay diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre periodo de muestreo.

**Tabla 13.** Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en agua y solución hidropónica en la empresa productora de pimiento morrón.

Muestras	Mayo 2009			Sep -Dic 2009			Feb-Mayo 2010		
	N <sup>1</sup>	CT	CF	NMP/100 ml			N	CT	CF
				N	CT	CF			
Agua tratada con osmosis inversa	-	ND	ND	-	ND	ND	10	2 ( 2-9)	<2
Agua almacenada en tanque	-	ND	ND	-	ND	ND	6	7 (2-200)	<2
Solución hidropónica antes de UV	-	ND	ND	-	ND	ND	11	200 (21-200)	<2
Solución hidropónica después de UV	-	ND	ND	-	ND	ND	8	2 (2-2)	4 (2-40)
Solución hidropónica que llega a la planta	4	265 <sup>2</sup> (264-265)	2 (2-5)	40	154 ( 9-270)	2 (2-12)	15	130 ( 9-200)	2 (2-12)
<b>Total</b>	<b>4</b>			<b>40</b>			<b>50</b>		

1Muestras analizadas  
2Mediana (límites)  
ND No determinado

**Tabla 14.** Incidencia y concentración de *E. coli* en agua y solución hidropónica utilizada para el cultivo de pimiento morrón

Muestra	<i>E. coli</i>	
	+/N (%) <sup>1</sup>	NMP/100ml
Agua tratada con osmosis inversa	0/10 (0)	<2
Agua almacenada en tanque	0/6 (0)	<2
Solución hidropónica antes de UV	9/11 (81)	4 (2-40) <sup>2</sup>
Solución hidropónica después de UV	1/8 (12)	<2
Solución hidropónica que llega a la planta	18/59 (33)	2 (2-12)

<sup>1</sup>Muestras positivas/muestras analizadas (% positividad).

<sup>2</sup>Mediana (límites)

#### 6.4.5. Incidencia de bacterias indicadoras, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes* en bandas de empacado

El pimiento cosechado es transportado hasta la zona de selección, empaque, etiquetado y almacenamiento transportado sobre bandas (Figura 8).



**Figura 8.** Transporte y etiquetado de pimiento morrón sobre bandas transportadoras.

En el área de selección y empaque (bandas transportadoras) se cuantificaron las poblaciones de BMA, CT y HL durante los tres periodos; los resultados se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Medias de BMA, CT y H/L en bandas de empackado en tres periodos de muestreo

Periodo	N <sup>1</sup>	Log UFC/100 cm <sup>2</sup>		
		BMA <sup>2</sup>	CT <sup>**</sup>	H/L <sup>**</sup>
Mayo 2009	17	6.1 ±1.56 <sup>3</sup> a <sup>4</sup>	2.9 ±2.98 a	4.5 ±1.32 a
Sep. - Dic. 2009	54	4.3 ± 0.73 b	2.9 ±1.43 a	3.6 ±0.79 b
Feb. - Mayo 2010	90	3.6 ±0.83 c	1.9 ±0.70 b	4.0 ±0.73 a

<sup>1</sup>: Muestras analizadas.

<sup>2</sup>: Bacterias mesófilas aerobias (BMA), organismos coliformes totales (CT), hongos y levaduras (H/L).

<sup>3</sup>: Valor de media ± desviación estándar.

<sup>4</sup>: Letras iguales no hay diferencia significativa (P<0.05) entre temporadas de muestreo. Comparación de medias por prueba de Tukey.

Los niveles de BMA y CT disminuyeron a lo largo de los periodos de muestreo. Se sabe que el índice de BMA indica de manera general las condiciones de higiene prevalentes en el proceso, así como también puede emplearse como un indicador de la eficiencia de tratamientos aplicados. En el último periodo de estudio (febrero-mayo 2010) la empresa adoptó medidas de limpieza rutinarias debido a su interés por exportar al mercado europeo. Dentro de las medidas adoptadas se implementó un sistema de desinfección periódico de las bandas transportadoras con sales cuaternarias de amonio. Las sales cuaternarias de amonio son compuestos sintéticos tensioactivos y las más comunes son de tipo catiónico. Tiene un escaso poder detergente, pero con buen poder germicida; son bastante estables, inodoras e incoloras y las soluciones muestran un pH alcalino. No son irritantes ni corrosivos su actividad disminuye en aguas duras y son antagonizadas por detergentes aniónicos (Fernández – Escartín, 2008). El empleo de estas soluciones desinfectantes tuvo efecto en el contenido de CT, y en menor medida en la cuenta de hongos. En estos últimos las poblaciones prácticamente permanecieron sin cambio en los tres periodos.

Al principio de este estudio logró detectarse *Salmonella* en la banda donde el personal selecciona los chiles manualmente. En los dos periodos de muestreo posteriores no se encontró este patógeno observando una incidencia global al final del estudio de 2 %. El género *Listeria* se encontró en 5 %; sin embargo, la especie *L. monocytogenes* no se identificó en ninguna muestra (Tabla 16). El uso de guantes no es un requisito para los trabajadores, cosechan, seleccionan y empaacan los productos con la mano desnuda. Ha sido reportado que el uso de guantes no garantiza que los trabajadores dejen de contaminar con microorganismos los alimentos/productos que manipulan. Por lo tanto es indispensable implementar un buen programa de lavado de manos de los trabajadores para evitar la contaminación de los frutos.

Las superficies dentro de las industrias suelen albergar múltiples microorganismos. La falta de una efectiva limpieza y desinfección de las superficies puede permitir que los microorganismos se multipliquen en ellas y propiciar que se conviertan en fuentes de contaminación hacia los productos, en este caso el pimiento. Los datos obtenidos para BMA concuerdan con lo reportado por Rangel en el 2009, donde analizaron bandas dentro de una empacadora de zanahoria. Las bandas muestreadas en el primer periodo no desinfectadas presentaron un valor de 6.4 Log UFC/100 cm<sup>2</sup> y en el periodo del tercer muestreo en donde aplicaron proceso de desinfección el contenido se redujo a 3.8 Log UFC/100 cm<sup>2</sup>. En ese mismo trabajo *Salmonella* se encontró en el 5 y 4% de las bandas transportadoras en dos empresas empacadoras de zanahoria. La incidencia del patógeno fue similar a la observada en nuestro estudio (2%).

**Tabla 16.** Incidencia de *Salmonella*, *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en bandas transportadoras de pimiento morrón en la zona de empacado.

Muestra	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	+/N (%) <sup>1</sup>	+/N (%)	+/N (%)
Bandas transportadoras	1/54 (2)	3/54 (5)	0/54 (0)

<sup>1</sup>Muestras positivas/muestras analizadas (% positividad).

### **6.5. Efecto de la temperatura en el comportamiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. en la superficie de pimiento morrón**

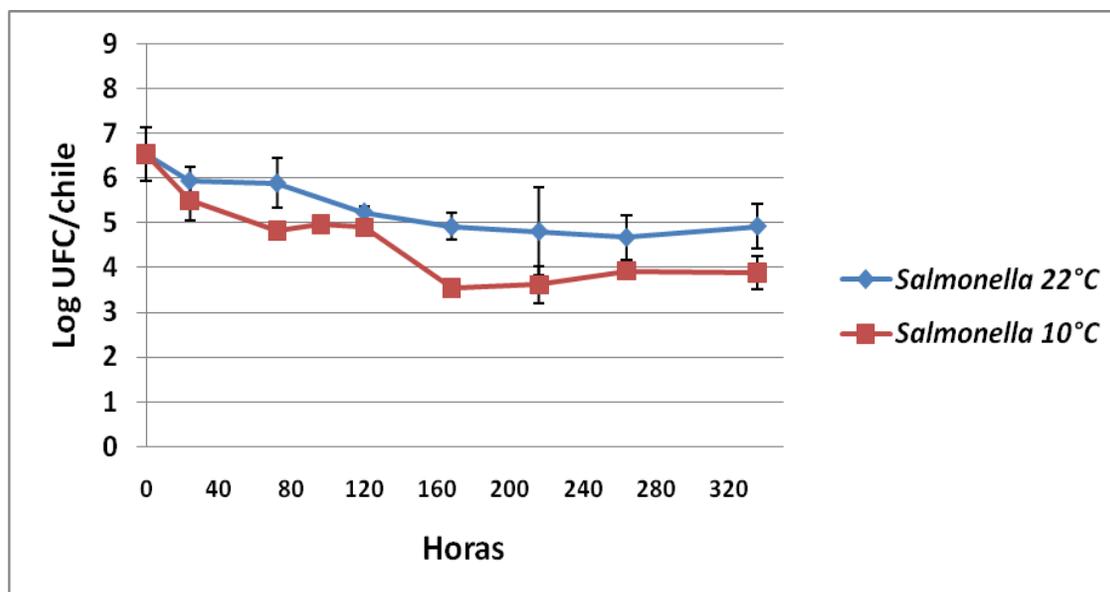
La sobrevivencia y/o desarrollo de microorganismos en frutas y verduras crudas está influenciada por el tipo de microorganismo, el producto y las condiciones ambientales en el campo y poscosecha (incluyendo condiciones de almacenamiento). Los microorganismos, en general, sobreviven pero no crecen adecuadamente sobre la superficie intacta de frutas y verduras, debido en parte, a las barreras protectoras del producto. La cutícula, cáscara o testa intactas, que cubren a las frutas y verduras, y adicionalmente una capa cerosa externa son una importante barrera contra la penetración y eventual colonización microbiana. La pérdida de integridad del fruto abre camino a los microorganismos hacia las partes internas, hasta entonces libres de ellos, y puede promover su multiplicación. Las propiedades metabólicas de los microorganismos patógenos determinan su habilidad para sobrevivir y desarrollar en frutas y verduras. La manifestación de esta capacidad se ve influenciada por factores intrínsecos (propios de cada alimento) y extrínsecos (ecológicos) condiciones a las que se expone el producto o aplicados a lo largo de su obtención, procesamiento, distribución y preparación en el sitio de consumo (Fernández- Escartín, 2008).

Los microorganismos patógenos sobre la superficie de las verduras normalmente se encuentran estresados y ese estrés puede verse incrementado si después de la cosecha las verduras son procesadas y sometidas a diversos tratamientos a lo largo del proceso de producción, llevando a las bacterias a un estado vulnerable que propicia eventualmente la muerte (Capozzi y col., 2009)

Se evaluó el comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* sobre la superficie de chiles pimiento morrón a temperatura de refrigeración (10°C) y ambiente (22°C) a una humedad relativa (100%).

La población de *Salmonella* disminuyó durante el almacenamiento a 10°C; la reducción observada después de catorce días de almacenamiento fue de 2.6 log UFC/chile, mientras que a 22°C la disminución fue de 1.6 log UFC/chile (Figura 9). Si bien el patógeno no desarrolló bajo las condiciones de almacenamiento estudiadas, sí tuvo la capacidad de sobrevivir por catorce días,

periodo en el cual los chiles permanecen sin cambios en sus características organolépticas y pueden ser consumidos (Figura 9, Tabla 17).

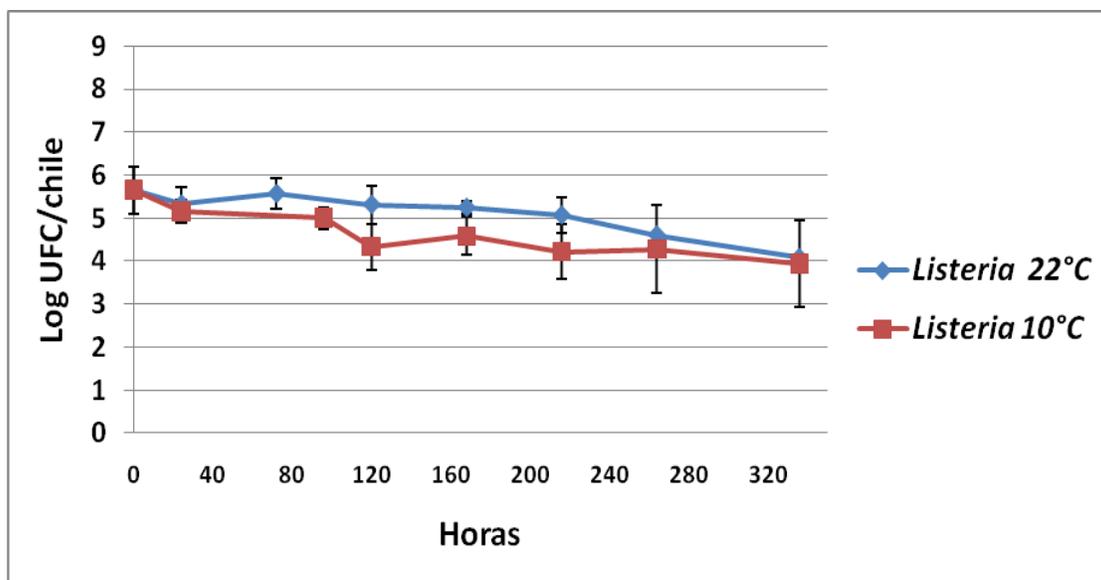


**Figura 9.** Comportamiento de *Salmonella* spp. en superficie de pimiento morrón rojo a 10 y 22°C y 100 % de HR.

Neri (2007) estudió el comportamiento de *S. enterica* en cilantro almacenado a 22°C y 100% de humedad relativa observándose desarrollo del microorganismo.

Durante el almacenamiento en refrigeración (10°C) *L. monocytogenes* disminuyó en 1.8 log UFC/chile después de 14 días de almacenamiento. La reducción de la población a 22°C fue similar (1.5 log UFC/chile) (Figura 10 ,Tabla 17). Al igual que *Salmonella*, *L. monocytogenes* fue capaz de sobrevivir sobre la superficie del chile pimiento morrón durante el periodo de estudio.

Carranza (2009) observó el desarrollo de *L. monocytogenes* bajo condiciones de almacenamiento de 35 y 22°C y HR de 97% sobre hojas de espinaca cruda, mientras que a 10 y 4°C el microorganismo sobrevivió. El desarrollo de *L. monocytogenes* también ha sido observado en hojas de perejil a una temperatura de almacenamiento de 20°C y 100% de HR (Dreux y col., 2007).



**Figura 10.** Comportamiento de *L. monocytogenes* en superficie de pimiento morrón rojo a 22 y 10 °C y HR de 100%.

**Tabla 17.** Velocidad de muerte de *L. monocytogenes* y *Salmonella* en chiles pimiento morrón almacenados a 10°C y 22°C.

Microorganismo	10°C	22°C
	$\mu^1$ (log UFC/h)	
<i>L. monocytogenes</i>	-0.0047 a <sup>2</sup>	-0.0045 a
<i>Salmonella</i> spp.	-0.0146 a	-0.00102 a

<sup>1</sup>: Velocidad de muerte

<sup>2</sup>Letras iguales no hay diferencia significativa ( $p < 0.5$ ) entre velocidades de muerte. Comparación de medias de Tukey

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio por Cortez (2009) se observó que *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp inoculados en chile jalapeño mostraron una clara tendencia a la inactivación al cabo de 72 hrs de almacenamiento a 22 y 4°C. Independientemente de la temperatura de incubación la población de *L. monocytogenes* se redujo por debajo de 10 UFC/chile. *Salmonella* fue ligeramente más resistente: se inactivó por completo (~5 log UFC de reducción) después de 5 y 6 días de incubación a 22 y 4°C, respectivamente.

Aunque ambos microorganismos no desarrollaron en la superficie del chile jalapeño, tienen la capacidad de sobrevivir.

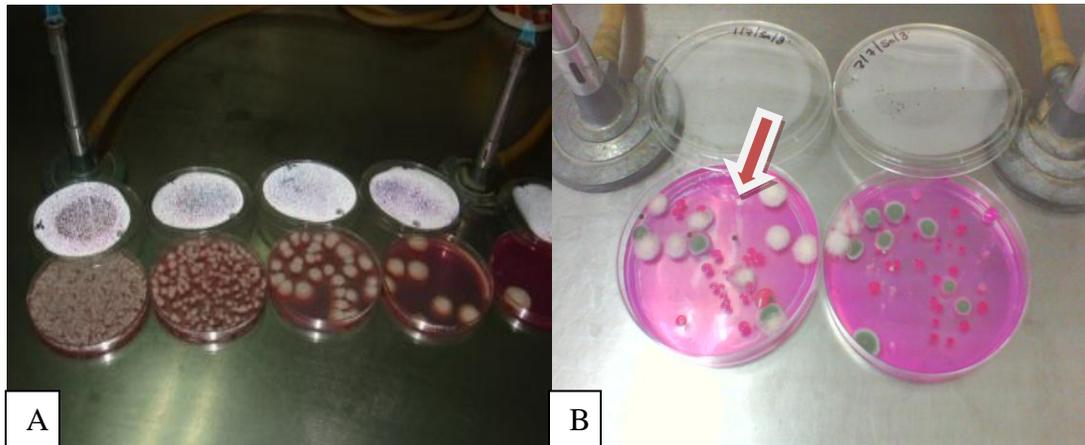
El contraste obtenido con nuestros resultados a una temperatura de almacenamiento de 22°C puede deberse a que la sobrevivencia del microorganismo también depende del producto donde se encuentre. *Capsicum annum* contiene propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Cereaga y col., 2003). Esta actividad se relaciona con el contenido de capsaicina (Molina-Torres y col. 1999) que expresa efecto que retarda el crecimiento de microorganismos Gram-positivos y Gram negativos como *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Barber y col., 2000; Dorantes y col., 2000; Boboye y Odekunle, 2008).

#### **6.6. Efecto de la presencia de *Fusarium stilboides* en el comportamiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. a 10°C**

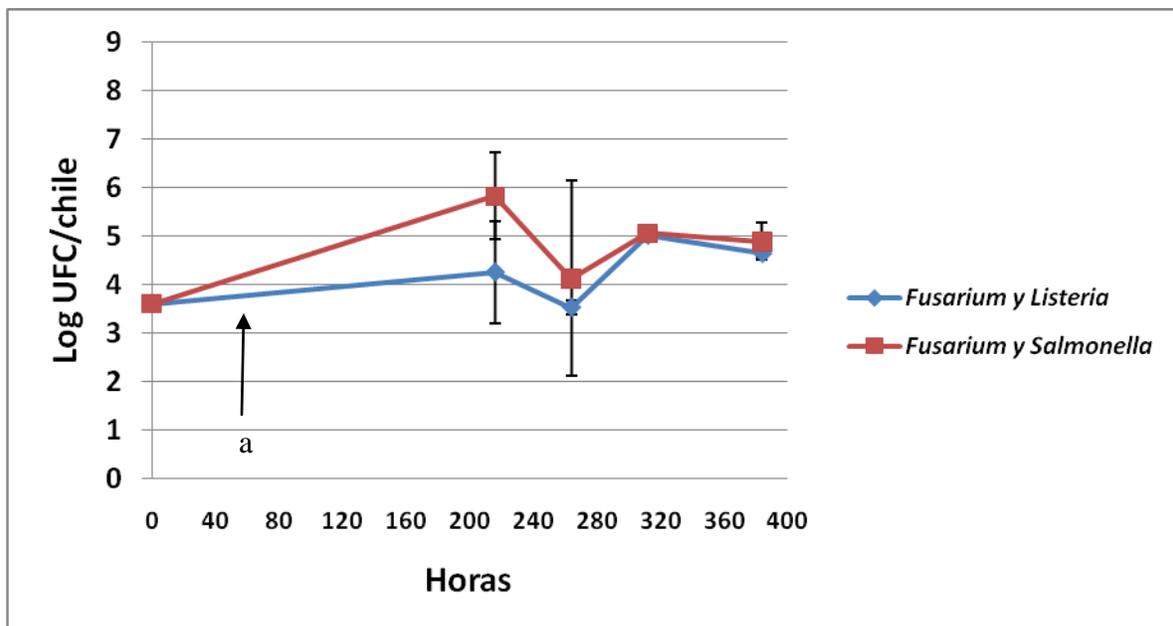
Como se comentó previamente, el hongo causante del daño en poscosecha que afectó al pedúnculo y al cáliz del pimiento, caracterizado por la abundancia de un micelio blanquecino, fue identificado en este trabajo como *Fusarium stilboides* y el hongo caracterizado por micelio gris con esporas negras fue identificado como *Rhizopus stolonifer*. Se especuló que la presencia de un organismo deteriorador, como es el caso de este hongo, podría influir en el establecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* como se ha reportado por otros investigadores (Wells y Butterfield, 1999). Para conocer el efecto de la presencia de *F. stilboides* en el comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en el chile pimiento, se inocularon los chiles con aproximadamente  $10^3$  esporas/chile, se incubaron durante 48 horas a 10°C y posteriormente se inocularon (por separado) los patógenos (*Salmonella* y *L. monocytogenes*).

Cabe recordar que el recuento diferencial del hongo se llevó a cabo en placas de APD; la diferenciación del hongo *F. stilboides* del resto de los hongos presentes en las placas fue muy clara de acuerdo a su morfología colonial (Figura 11). El comportamiento de *F. stilboides* fue monitoreado a lo largo de los

14 días de almacenamiento (Figura 12). El hongo mostró un comportamiento inconstante, pero con tendencia al desarrollo, y al final del estudio la población final fue de 4.6 log UFC/chile en presencia de *Salmonella* spp. y de 4.9 log UFC/chile en presencia de *L. monocytogenes*.

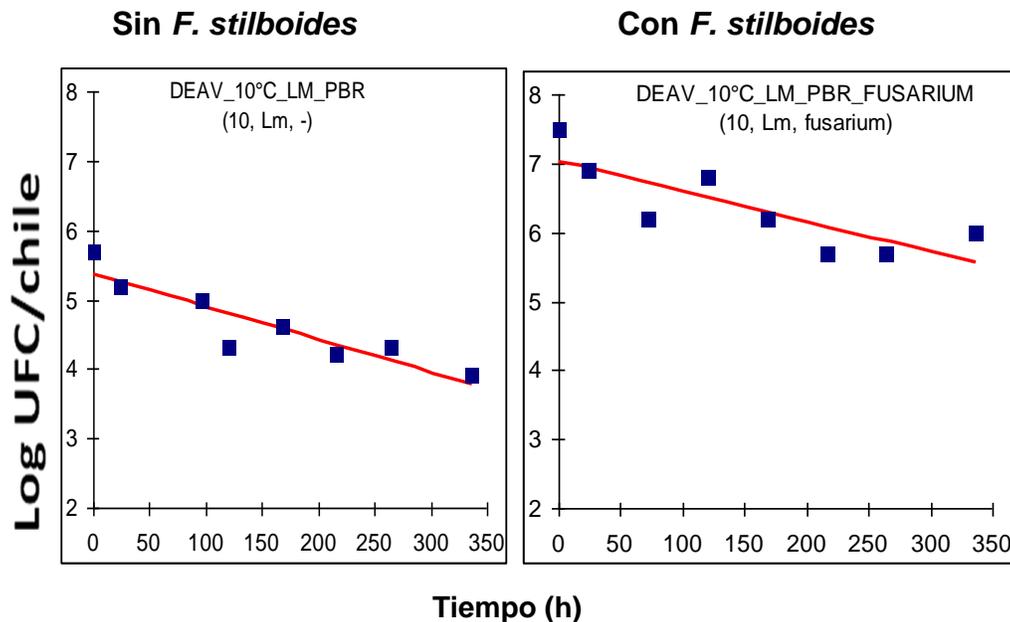


**Figura 11. Morfología colonial de *F. stilboides* en placas de APD. A)** Recuento de inóculo inicial de *F. stilboides* en APD. **B)** Recuento de *F. stilboides* durante los 14 días de almacenamiento en APD.



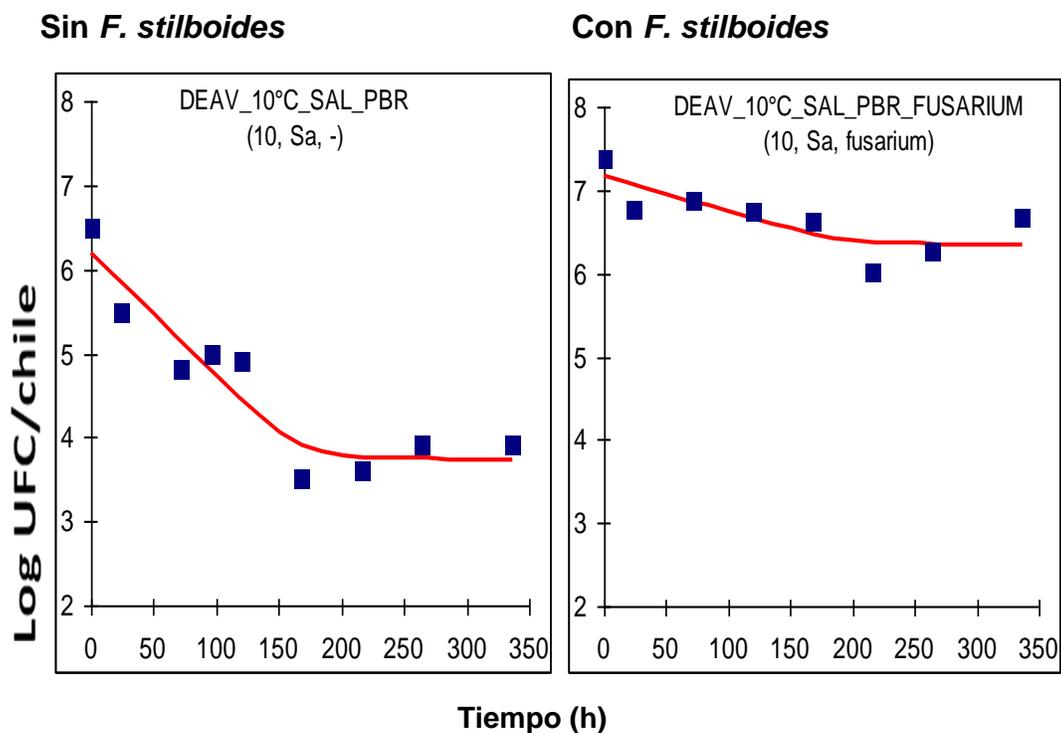
**Figura 12. Comportamiento de *F. stilboides* en la superficie de pimienta morrón durante el almacenamiento a 10°C y HR de 100%. (a) tiempo en el cual se inocularon los dos microorganismos patógenos.**

A 10 °C en presencia del hongo *L. monocytogenes* redujo su población en 1.5 Log UFC/chile. Al comparar estos resultados con el comportamiento de *L. monocytogenes* en el chile sin la presencia del hongo, se puede concluir que el hongo no tuvo un efecto significativo en su comportamiento (la reducción en este caso fue de 1.8 Log UFC/chile) (Figura 13). Para valorar el efecto se calculó la velocidad de muerte para ambas dinámicas de *L. monocytogenes* ( $\mu$ ). La velocidad de muerte para *L. monocytogenes* en ausencia y presencia del hongo deteriorador fue de -0.0044 y -0.0047 Log UFC/h respectivamente (Tabla 18).



**Figura 13.** Comportamiento de *L. monocytogenes* en la superficie de pimiento morrón rojo a 10°C y HR de 100% en presencia y ausencia de *F. stilboides*. Las curvas fueron ajustadas mediante el programa DMfit.

Por el contrario, *Salmonella* disminuyó 2.6 Log UFC/chile en ausencia del hongo con una velocidad de muerte ( $\mu$ ) de -0.0145 Log UFC/h y en presencia de *F. stilboides* se redujo únicamente 0.71 log UFC/chile presentando una velocidad de muerte ( $\mu$ ) de -0.0042 Log UFC/h; la diferencia entre las velocidades de muerte en ambos casos fue significativa ( $p < 0.05$ ). Evidentemente la velocidad de muerte de *Salmonella* fue mayor en ausencia del hongo (Figura 14).



**Figura 14.** Comportamiento de *Salmonella* spp. en la superficie de pimiento morrón rojo a 10°C y HR de 100% en presencia y ausencia de *F. stilboides*. Las curvas fueron ajustadas mediante el programa DMfit.

Estudios de incidencia de *Salmonella* en frutas y hortalizas afectados por ataque de hongos y por lesiones físicas en el fruto indican que de 341 frutas y hortalizas colectadas en la mercado tanto sanas como afectadas por pudriciones por hongos resultaron positivas para *Salmonella* el 20.2 % de los frutos sanos y 26.4 % de las muestras cariadas, dos tercios de estas lesiones fueron causadas por *Alternaria* y *Botrytis*. En un estudio similar de 121 muestras de vegetales lesionados mecánicamente (cortes, grietas y magulladuras), hubo una pequeña diferencia en la incidencia de *Salmonella* entre las porciones lesionadas por hongos y la sanas (Wells y Butterfield ,1999) (Tabla 17).

En otro estudio, jitomate, papa y tejidos de cebolla se inocularon con *Salmonella* Typhimurium; las poblaciones de esa bacteria aumentaron en uno o dos logaritmos después de la incubación durante 48 horas a temperatura ambiente (21°C). Cuando estos frutos fueron co-inoculados con *S. Typhimurium* y *Botrytis* o *Rhizopus* se observó un aumento significativo en las poblaciones de *Salmonella*

en comparación con los productos no inoculados con los hongos (Wells y Butterfield ,1999).

**Tabla 18.** Incidencia de *Salmonella* en frutos sanos y con daño causado por hongos

Fruto	Muestras analizadas	Positivos para <i>Salmonella</i>	
		Frutos en buen estado	Frutos con Daño
Pimiento morrón	57	12	16
Melón	9	2	3
Chile jalapeño	4	0	1
Jitomate	91	15	19

Fuente: Wells and Butterfield, 1999

La multiplicación de *Salmonella* en tejidos infectados por hongos en el estudio de Well y Butterfield (1999) sugiere que fue favorecido por la putrefacción y la acción de las enzimas pectinolíticas.

Cibelly y col. (2008) realizaron un estudio para conocer la capacidad proteolítica de algunas cepas de *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Penicillium* y el efecto metabiótico de *Fusarium oxysporum* y *Penicillium expansum* sobre *Salmonella*. La actividad proteolítica de los hongos se determinó en agar jugo de jitomate y jugo de jitomate, mientras que el efecto metabiótico de *F. oxysporum* y *P. expansum* sobre la *Salmonella* se evaluó en un modelo que consistió en caldo soya tripticasa adicionado de diferentes cantidades de jugo de tomate. Observaron que la sobrevivencia de *Salmonella* se mejoró en caldo soya tripticasa más 20 y un 50% de jugo de tomate previamente inoculado con *F. oxysporum*.

En el caso de pimiento morrón inoculado con *Salmonella* se pudo observar que la velocidad de muerte fue menor cuando el hongo está presente, es decir la disminución de logaritmos por hora es menor que cuando *Salmonella* se encuentra sola en la superficie del fruto (Tabla 18).

**Tabla 19.** Velocidad de muerte de *L. monocytogenes* y *Salmonella* en presencia y ausencia de *F. stilboides* a una temperatura de 10°C y humedad relativa del 100%.

<b>Microorganismo</b>	<b>Ausencia de</b>	<b>Presencia de</b>
	<b><i>F. stilboides</i></b>	<b><i>F. stilboides</i></b>
	<b><math>\mu^1</math> (log UFC/h)</b>	
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	-0.0047 a <sup>2</sup>	-0.0044 a
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	-0.0146 a	-0.0042 b

<sup>1</sup>: Velocidad de muerte

<sup>2</sup>Letras iguales no hay diferencia significativa ( $p < 0.5$ ) entre velocidades de muerte. Comparación de medias de Tukey

Aunque no se observó desarrollo de *Salmonella*, cabe aclarar que la presencia del hongo no demostró un daño físico aparente por lo que podemos sugerir que los nutrientes no estaban totalmente al alcance de *Salmonella* para favorecer su desarrollo. La flora asociada del chile puede ejercer antagonismo contra bacterias patógenas como es el caso de *Pseudomonas* y *Enterobacterias* y levaduras que inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella* Chester en chile pimienta morrón (Francis y O'Beirne, 1998; Ching-Hsing y William F. Fett, 2001).

Con base en los resultados obtenidos, la presencia de *F. stilboides* favorece la sobrevivencia de *Salmonella* más no significativamente la de *L. monocytogenes*.

## VII. CONCLUSIONES

- Los hongos causantes del deterioro del chile pimiento morrón fueron identificados como *Fusarium stilboides* y *Rhizopus stolonifer*. Estos hongos también se detectaron en muestras de aire, mangueras, fibra de coco y chiles sin daño aparente. Las posibles fuentes de contaminación fueron las mangueras y el aire dentro del invernadero.
- Los muestreos microbiológicos indicaron que las condiciones de cultivo del chile pimiento morrón son en términos generales adecuadas para garantizar que los frutos pueden considerarse con una calidad bacteriológica aceptable.
- A pesar del nivel de protección que la técnica de hidroponía confiere al pimiento hidropónico, *Salmonella* fue detectada en el fruto y en las bandas transportadoras. La implementación de buenas prácticas agrícolas es una solución para disminuir la incidencia de patógenos en frutas y hortalizas.
- La contaminación esporádica con microorganismos de origen intestinal (*E. coli*) puede ocurrir y podría dar lugar a la presencia de patógenos como *Salmonella*. La prevención de la contaminación fecal en el ambiente del invernadero debe ser enfatizada.
- La implementación de buenas prácticas agrícolas como la desinfección de área de empacado y cuchillas durante el cultivo del pimiento morrón se vio reflejada en la disminución del contenido de las bacterias indicadoras en el fruto y en los materiales asociados a su procesamiento.
- *Salmonella* y *L. monocytogenes* sobreviven en la superficie del fruto durante 14 días, tiempo en el cual el producto es sensorialmente aceptable, por lo que puede ser ingerido por el consumidor representando un riesgo a su salud.

- La presencia de *F. stilboides* causante del deterioro en pimiento favorece la sobrevivencia de *Salmonella* en la superficie del fruto disminuyendo la velocidad con la que muere. Este efecto no fue observado sobre *L. monocytogenes*.
- La información generada en este trabajo puede ser tomada como guía para otros productores de Chile pimiento morrón.

## VIII. REFERENCIAS

- Agrios, N.G. 1988. Plant Pathology. 3ª Ed. Academic Prss. San Diego, California. E.U. Capítulo 11, 29, 206, 425, 332-336p.
- Alvarez Mayorga, B. L. 1998. Contaminación, sobrevivencia y desarrollo de *Listeria monocytogenes* durante el procesamiento de brócoli pre cocido y congelado. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Aznar, R., y B. Alarcon.2002. On the Specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. System. Appl. Microbiol. 25: 109–119.
- Banett,H.L., B.B. Hunter. 1999. Illustrated general of imperfect fungi. Fourth edition.APS press.130, 164p.
- Barbel, M. S., V.S. Mc Connell and De Caux. 2000. Antimicrobial intermediates of general phenylpropanoids and lignin specific pathway. Phytochemistry. 54 (1) 53-65.
- Bar-Tal, A., I. Rylsky,Feigin and E. Pressman.1996. Improvment of greenhouse tomato fruit quality by manipulation of root size, nutrient solution composition and fruit marketing. Acta Horticulturae 434:37-45.
- Beuchat, L.R.1996. Patogenic microorganisms associated with fresh produce. J Food Prot. 59:204-216.
- Beuchat, L.R.1996 Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2.
- Beuchat, L.R., JH. Ryu JH. 1997. Produce handling and processing practices. Emerging Infect Dis 3:459–465.
- Beuchat, L.R.1998.Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. W.H./FSF/FOS/98.2.World Health Organization, Geneva, Witzerland.
- Blostein, J. 1993. An outbreak of *Salmonella* Javiana associated with consumption of watermelon. J. Environ. Health 56: 29 – 32.
- Boboye, B. and K. Odekunle. 2008. Control of Staphylococcus aureus to sweet pepper (*Capsicum annum*) by a chemical mutation. Research J. of Microbiology 3(7) 508-513.
- Boynton, B.B. 1999. Quality and stability of pre- cut mangoes and carambolas subjected to high pressure processing, M.S thesis, University of Florida, Gainesville.
- Brackett, R.E. 1994. Microbiological apoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables: 269-312. If Wiley RC (Ed) Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables. Chapman & Hall N.Y.
- Bruna, A. 1993. Virus en pimiento: Importancia y distribución en Chile. Investigación y Progreso Agropecuario La Platina N° 77 p. 23-25.

- Bula, C.J., J. Bille, and M.P. Glausner. 1994. An epidemic of food borne Listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin. Infect. Dis.* 20:66.
- Capozzi, V., D. Fiocco, M. Amodio, A. Gallone and G. Spano. 2009. Bacterial Stressors in minimally Precessed Food. *Int. J. Mol. Sci.* 10:3076-3105.
- Carranza Pérez, Y. 2009. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en espinaca (*Spinacia oleracea*). Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.30-55
- Castillo A., I. Mercado, L.M. Lucia, Y. Martinez-Ruiz, J. Ponce de León, E.A. Murano and G. R. Acuff. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantalope:a binational study. *J. Food Prot.* 67:713-720.
- Centers for Disease Control and Prevention.1998.Multistate outbreak of Listeriosis-United State, 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 47(50):1085.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1991. Multistate outbreak of *Salmonella Poona* infection-United States and Canada. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 40:549.
- Chia-Min Lin and Cheng-I- Wei. 1997. Transfer of *Salmonella* Montevideo onto the interior surfaces of tomatoes by cutting.*J. Food Prot.* 60(7):858-863.
- Ching-Hsing Liao\* And William F. Fett. 2001. Analysis of Native Microflora and Selection of Strains Antagonistic to Human Pathogens on Fresh Produce. *J Food Prot.* 64, (8)1110–1115.
- Cibelli F, Ciccarone C, Altieri C, Bevilacqua A, Sinigaglia M.2008.Proteolytic Activity of molds and their metabiotic association with *Salmonella* in a model system.*J. Food Prot.* 71(10):2129-32.
- Cortez, J., Rodríguez, F., Avila D., Álvarez - Mayorga, B.,M.H. Iturriaga. 2009. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* en Chile Jalapeño. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Cartel presentado Congreso Internacional Inocuidad Alimentaria 2009 celebrado en Villa Hermosa Tabasco México.
- Collins, J.E. 1997. Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/reemergence of foodborne pathogens. *Emerg. Infect. Dis* 3 (4):471–479.
- CSPI Center for Science in the Public Interest, reporter in *Health Care Food & Nutrition Focus*.2006,23,(3)
- Cumming, K., E. Barret, J.C.Mohle-Boetani, J.T. Brooks,J. Farrar, T.Hunt,A. Fiore, K.Komatsu, S.B.Werner, and L. Slustker. 2001. A multistate outbreak of *Salmonella entérica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. *Emerg. Infect. Dis.* 7:1048-1056.
- Dalton, C. B., Austin C.C., Sobel J., Hayes P.S., Bibb W. F., Graves L.M., Swaminathan B., Proctor M.E., and Griffin P.M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Eng. J. Med.* 336:100.

- De la Rosa, M.C., M.A. Masso y C. Ullán. 2002. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio medioambiental*. 5:374- 402. ISSN1139-1987
- De Simon, M., C. Tarrango, and M.D. Ferrer 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh food in Barcelona (Spain). *Internat. J. Food Microbiol.* 16:153-156.
- Dijkstra, R.G.1982. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface, water of Canals and lakes, in diiches of one big polder, and in the effluents ,canals of a sewage treatment plant. *Zentrabl. Bakteriол.Hyg.I.Abt.Orig.B.*176:202.
- Di Pietro A., M.P. Madrid, Z. Caracuel, J. Delgado-Jarana and M.I.G. Roncero. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.*, 4:315—325.
- Dorantes, L., R., H. Colmenero, I. Hernández, L. Mora, M.E. Jaramillo, E. Fernández and C. Solano. 2000. Inhibition of growth of some food borne pathogenic bacteria by *Capsicum annum*. *Int. J. Food Microbiol.*, 57 (1-2): 125-128.
- Dreux, N., C. Albagnac, F. Carlin, C.E. Morris, and C. Nguyen-The.2007. Fate of *Listeria spp.* on parsley leaves grown in laboratory and field cultures. *J. Appl. Microbial.* 103:821-1827.
- Edwards S. G. 2004 Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicol. Lett.*, 153:29-35.
- Farber, J. M., G.W. Sanders and M.A.Johnston.1989. A survey of varius foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.* 52:456-458.
- Fernández Escartín E. 1981, *Microbiología Sanitaria, Agua y Alimentos Vol. I.* Universidad de Guadalajara.
- Fernández Escartín E., 2008, *Microbiología e inocuidad de los alimentos*, 2da Edición, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Fernández- Escartín, E., A.A. Castillo and J. Saldaña Lozano. 1989. Survival and growth of *Salmonella* and *Shigella* on slices fresh fruit. *J. Food Prot.* 52:471-473.
- FDA (Food and Drugs Administration). 1998. Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. U.S. Food and Drug Administration.
- Fletcher J.T. 1994. *Fusarium* stem and fruit rot of sweet pepper in the glasshouse. *Plant Pathol.* 43, 225-227.
- FOCIR Fondo de Capacitación e Inversión del Sector Rural. <http://www.focir.gob.mx/> Enero 2008
- Francis, G.A. and D. O´Beire. 1998. Effects of storage atmosphere on *Listeria monocytoges* and competing microflora using a surface model system. *Int. J. Food Sci. Tech.* 33, 465-472.
- Fung, D.Y.C. 2002 *Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Institute of Food Technologists .Comprehensive review in food science and food safety 1:3-22.
- Garcia-Villanova, B.R. Ruiz and Galvez Vargas. 1987. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. *J. Food Microbiol.* 4:285-291.

- Gianfranceschi, M., and P. Aureli. 1996. Freezing and frozen storage on the survival of *Listeria monocytogenes* in different foods. *Ital. J. Food Sci* 8:303.
- Gorny, JR. 2000. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by cultivar, ripeness, stage, fruit size and storage regime, *J Food Sci* 65:541-544.
- Gorny, JR, B.Hess-Pierce and A.A. Kader. Quality changes in fresh cut peach and nectarine slices as affected by cultivar, storage atmosphere and chemical treatments. *J. Food Sci* 64:429-432.
- Hernández- Iturriaga M. 2003. Adhesión, colonización y remoción de *Salmonella* en jitomate. Tesis Doctoral, PROPAC, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Herwaldt, B.L. and M.L. Ackers. 1997. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. *New Engl Med* 336 (22), 1548– 1556.
- Jacquet, C., B. Catimel, V. Goulet, A. Lepoutre, P.Veit, P.Dehaumont, and J.Rocourt. 1995. Proceeding of XII International Symposium on Problems of Listeriosis, Perth, Western Australia, p. 161.
- Jiménez, M., J. Siller, J. Valdez, A. Carrillo, C. Chaidez. 2007. Bidirectional *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transfer between bare/glove hands and green bell pepper and its interruption. *Internat. Environ. Health Res.* (5): 381- 388.
- Johnson L.M., D. Jaykus, M. Moll, C. Martínez, J. Anciso, B. Mora and C.L. Moe. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J. Food Prot.* 68: 1840-1847.
- Katayama, H., S.Ishigami, S. Kaneko, and A. Tataru. 1997. Biology and control of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* Pergande in Japan. *Agrochemical Japan* 70:7-12.
- Kerr, K. G., S.F. Dealler, and R.W. Lacy. 1988. Materno-fetal Listeriosis from cook- chill and refrigerated food. *Lancet* 2:1133.
- Kummar, R., 2008. An eight-hour PCR-based technique for detection of *Salmonella* serovars in seafood. *World J Microbiol. Biotechnol.* 24:627–631
- Lakakul, R., R.M. Beaundry and R.J. Hernandez. 1999. Modeling respiration of apple slices in modified-atmosphere packages, *J. Food Sci* 64: 105-110.
- Latorre, B. 1983. Curso virus en tabaco, papa y tomate. Santiago, Chile. 17-19 enero. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago, Chile. 98 p
- Liao CH and J.M. Wells. 1987. Diversity of pectolytic fluorescent *Pseudomonas* causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. *Phytopathol.* 77, 673-677.
- Liao Ch and W.F. Fett. 2001. Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *J. Food Prot.* 64:1110-1115.
- Liu, D., M. Lawrence, F.W Austin, A.J. Ainsworth. 2005. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 373–378.

- Liu, D. 2008. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. *Internat. J. Food Microbiol.* 122:229-242.
- Liu, T. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *J. Food Prot.* 65:1227-1234.
- Luedtke, A. N., B. Chapman, and D. A. Powell. 2003. Implementation and analysis of an on-farm food safety program for the production of greenhouse vegetables. *J. Food Prot.* 66:485–489.
- Lou, Y., and A.E. Yousef. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes*, important to food processors. In E.T. Ryser and E.H. Marth (ed). *Listeria, Listeriosis and food safety*, 2nd ed Marcel. Deker, New York U.S.A. 131-224
- Lucier G and B.H Lin. 2001. Sweet peppers: Saved by the bell. Economic Research Service. USDA. 12-15 p.
- MacLauchlin, J., S.M.Hall., S.K. Velani and R.J. Gilbert. 1991. Human listeriosis and paté: a possible association. *Brit. Med. J.* 303:773.
- Magnuson JA, AD. King Jr and KC. Torok. 1990. Microflora of partially processed lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3851-3854.
- Maki, D.G. 2009. Coming to grips with foodborne infection- peanut butter, peppers, and nationwide *Salmonella* outbreaks. *N. Engl. J. Med.* 360;10:949-953.
- Malloch, D. 1981. Their Isolation, cultivation and Identification. Univ. Toronto Press Canada. *Microbiological Criteria of Foods.* *J Food Prot.* 60:1400-1408.
- Maroto, B. 1983. *Horticultura herbácea especial*. Ed. Mundi-Prensa, Castello 37 Madrid, España.
- Martín, A. E., M. Aranda, F. Benito, Pérez-Nevado and M Cordoba. 2005. Identification of fungal contamination and determination of mycotoxigenic molds by micellar electrokinetic capillary chromatography in smoked paprika. *J. Food Prot.* 68(4):815-822.
- Medina Montenegro, H. and A. Mendoza. 2009. Reporte de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Trabajo presentado en XLV Congreso Nacional de Entomología, Sociedad Mexicana de Entomología.
- Molina-Torres, J., A. García-Chávez, and E. Ramírez-Chávez. 1999. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol.* 64:241–248.
- Montville R, Chen and DW. Schaffner. 2001. Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to foods. *J. Food Prot.* 64:845 – 849.
- Mukherjee A, D. Speh, E. Dyck, F. Diez-González. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *J. Food Prot.* 67:894 – 900.
- Neri Herrera, E.A. 2007. Aplicación de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de *Salmonella entérica* en cilantro. Tesis de Maestría en Ciencia

- y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Neves Filho, R.A., C. Silva, V. Brustein, D. Navarro, F. Santos, L. Alves, M. Cavalcanti, R. Srivastava and M. Carneiro Da Cunha. 2009. Improved Microwave-Mediated Synthesis of 3-(3-Aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) propionic acids and their larvicidal and fungal growth inhibitory properties. *Chem. Pharm. Bull.* 57(8): 819—825
- Nigam, N. and K.G. Mukerji. 1998. Biological control. Concepts and practices. In: biocontrol of plant diseases. Vol 1 Mukerji, KG y Garg K.L. Eds. CRC Press Boca Ratón. Florida EE.UU pp, 555-562.
- Nuez, F., R. Gil, J. Costa. 1996. El cultivo del pimiento chiles y aji. Mundi Prensa Libros S.A. 1ª Edición, Madrid España.
- Orozco L., L. Rico-Romero and E. Fernández-Escartín E. 2008. Microbiological profile of greenhouses in a farm producing hydroponic tomatoes. *J. Food Prot.* 71: 60-65
- Orozco Ramirez, L. 2008 Tesis Doctoral. Rastreo de la fuente de *Salmonella* en jitomate durante su producción en invernaderos hidropónicos. Facultad de química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro Qro., México.
- Orozco R.L., H.M. Iturriaga, M. Tamplin, P.M. Fratamico, J.E. Call, J.B. Luchansk, E. Escartin E. 2008 Animal and Environmental Impact on the Presence and distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in Hydroponic Tomato Greenhouses. *J. Food Prot.* 71: 676-683.
- Peltran, R.L., E.A. Zottola, and R.B. Gravani. 1988. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. *J. Food Sci.* 53: 1238-1240.
- Penteado AL, Eblen BS, Miller AJ. 2004. Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated post harvest insect disinfestations procedures. *J Food Prot.* 67:181 – 184.
- Pouch Downes, F. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of food .Fourth edition. Ed. American Public Health Association. 239-330
- Prado, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Serie Boletín Técnico. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile. 169: 203 p
- Prakash A, 2000 Effects of low-dose gamma irradiation on the shelf-life and quality characteristics of cut romaine lettuce packed under modified atmosphere, *J Food Sci* 65:549-553.
- Ramamurthy M.S. 2004. Improvement of shelf-life and microbiological quality of minimally processed refrigerated capsicum by gamma irradiation. *Internat. J. Food Sci..Nutrit.*, 55, (4): 291 -299.
- Rangel Fajardo D.M. 2009. Incidencia y fuentes de contaminación de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y bacterias indicadoras en zanahoria a lo largo del cultivo, acondicionamiento y empaque de dos empresas productoras. Tesis de maestría.

- Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro. México 30-79.
- Ries, A.A, S. Zaza, C. Langkop, R.V.Tauxe and P.A. Blake. 1990. A multistate outbreak of *Salmonella chester* linked to imported cantalope. Abstract. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy p.238.
- Rico Romero, L. 2003. Perfil de contaminación microbiana de una planta productora de jitomate hidropónico. Tesis de maestría. Facultad de química. Universidad Autónoma de Querétaro. Queretaro Qro., México.
- Riser, E. C., J. Grabowski, and E. P. Glenn. 1984. Microbiology of hydroponically-grown lettuce. *J. Food Prot.* 47:765–769.
- Rodríguez A., C. Nerín and R. Batlle. 2008. New Cinnamon-Based Active Paper Packaging against *Rhizopus stolonifer* Food Spoilage. *J. Agric. Food Chem.* 56:6364-6369.
- Robb, K.L. 1989. Analysis of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) as a pest of floricultural crops in California greenhouses. Ph.D. dissertation. University of California, Riverside, California, USA. 135 p.
- Ruiz-Moyano S.,M., A. Benito, E. Martín, A. Aranda, Hernández and M. Cordoba 2009. Characterization of molds isolated from smoked paprika by PCR-RFLP and micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Food Microbiol.* 26(8) 776- 782
- Ryser E.T. and E.H. Marth. 1991. *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Deker, New York.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación). 2002. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Centro de Investigación en Alimentos y desarrollo A.C.
- Salguero Navas, V.E., J.E. Funderburk, T.P. Mack, R.J. Beshear and S.M. Olson .1994. Aggregation indices and sample size curves for binominal sampling of flower-inhabiting *Frankliniella* species (Thysanoptera: Thripidae) on tomato. *J. Econ. Entomol.* 87:1622-1626.
- Sánchez, S., R. Martínez, J. Castillo and E. Fernández. 2008. Antagonismo de levaduras nativas contra la pudrición azul (*Penicillium expansum* link) en frutos de manzana. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol3 (4):359-366.
- Schlech, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A. W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Ncholls and C.V. Broome. 1983. Epidemic Listeriosis- Evidence for transmission by food. *N. Eng. J. Med.* 308:203.
- Serna Villagomez N. 2004. Incidencia de *Salmonella entérica* y *Escherichia coli* en jitomates de invernaderos hidropónicos. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México 51-62.
- Sleator, R.D., C.G.M. Gahan and C. Hill. 2003. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *App. Environ. Microbiol.* 69, 1–9.

- Sorrells, K.M., D.C. Enigl and JR. Hatfield.1989. Effect of pH, acidulant, time, temperatura, on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 50:730.
- Tauxe V.R. 2002. Emerging foodborne pathogens. Internat. J. Food Microbil.. 78:31-40
- Tauxe, R.V., 1997. Emerging foodborne disease: an evolving public health challenge. Emer. Infect. Dis. 3 (4), 425– 434.
- Tommasini, M.G., and S. Maini. 1995. *Frankliniella occidentalis* and other thrips harmful to vegetal and ornamental crops in Europe.. Biological Control of Thrips Pests. Veenman Drukkers, Wageningen, The Netherlands. p. 1-42
- Trip,G.,G.J.,J.A Thijssen, Renkema and R.B.M.Huirne.2002.Measuring managerial efficiency: the case of commercial greenhouse growers.Agric.Econ 27:175-181.
- Vázquez Barrios E. 1998. Sensibilidad de la almendra de genotipos criollos de nuez pecanera (*Carya illinoensis* (Wangenh) K.Koch) originarios del centro de la República Mexicana, a la infección por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* toxigenicos. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro México. 30-35.
- Vázquez-Boland, J.A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez- Bernal, W. Goebe, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehlan and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14, 584–640.
- Vilmorín Díaz, F. 1977. El cultivo del pimiento dulce tipo Bell. Ed. Diana México.21-30.
- Viñas I, J. Usual, N. Teixido, V. Sanchis.1998. Biological control of major postharvest pathogens on Apple with *Candida sake*. Int. J.Food Microbiol.40: 9-16.
- Warrington, P.D. 1988. Water quality criteria for microbiological indicators. Ministry of environment and Parks. Water Management Branch, Resource Quality Section. Victoria BC. 234p
- Weidenborner, M. 1995. Mold spectra of various food in relation to plating medium. J. Food Prot. 58: 661-665.
- Weingold, S.E., D.J. Guzewich and J.K. Fudala. 1994. Use of foodborne disease data for HACCP risk assesment. J.Food Prot. 57:820-830.
- Weis, J., and H.P.R. Seeliger.1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30: 29.
- Wood, R.C.C., Hedberg, and K. White. 1991. A multistate outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes.Abstr. Epidemic Intelligence Serv. 40 th Annu.conf. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.p69
- Xuan Guo, W. Marc, Van Iersel, Jinru Chen, E. Robert, Brackett, and Larry R. Beuchat. 2002. Evidence of Association of *Salmonella* with Tomato Plants Grown Hydroponically in Inoculated Nutrient Solution. App. Environ. Microbiol. 68 (7) p. 3639–3643

- Yoon Y, J.D. Stopforth, P.A. Kendall, JN Sofos. 2004. Inactivation of *Salmonella* during drying and storage of Roma tomatoes exposed to predrying treatments including peeling, blanching, and dipping in organic acid solutions. J Food Prot. 67:1344 – 1352.
- Zamani M, A. Sharifi Tehrani, AA. Ali Abadi . 2007. Evaluation of antifungal activity of carbonate and bicarbonate salts alone or in combination with biocontrol agents in control of citrus green mold commun .Agric. Appl Biol Sci 72(4):773-7
- Zhuang, R.Y., LR. Beuchat and F.J. Angulo. 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperatura and treatment with chlorine. Appl.Environ. Microbiol. 61:2127-2131
- Zipcodezcohttp://zipcodezoo.com/default.asp .Bisby, F.A., Y.R. Roskov, M.A. Ruggiero, T.M. Orrell, L.E. Paglinawan, P.W. Brewer, N. Bailly, J. van Hertum, eds (2007). [Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2007 Annual Checklist](#). Species 2000: Reading, U.K. Global Biodiversity Information Facility. Accessed January 20, 2008. <http://www.gbif.org> Mediated distribution data from 3 providers.