

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PRODUCCIÓN  
DE CHILE PIMIENTO MORRÓN EN INVERNADERO”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**ING. QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**DANIELA TREVIÑO MEJÍA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PRODUCCIÓN  
DE CHILE PIMIENTO MORRÓN EN INVERNADERO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**ING. QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**DANIELA TREVIÑO MEJÍA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA**

**SINODALES**

**Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA**  
DIRECTOR

**Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO**  
SINODAL

**M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA**  
SINODAL

**M. en C. DULCE ESTHER AVILA VEGA**  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Microbiología de frutas y hortalizas	3
II.1.1 Enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas	4
II.2 Chile	6
II.2.1 Aspectos generales	7
II.2.2 Producción	7
II.2.2.1 Exportación	9
II.2.2.2 Importación	9
II.3 Pimiento morrón ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	11
II.3.1 Aspectos generales	11
II.3.2 Variedades y tipos de pimiento morrón	13
II.3.3 Producción	15
II.4 Desinfección	16
II.4.1 Definición	16
II.4.2 Tipos de desinfectantes	16
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	21
IV.1 General	21
IV.2 Particulares	21

V.	METODOLOGÍA	22
	V.1 Materiales	22
	V.1.1 Equipo	22
	V.1.2 Medios de cultivo	23
	V.1.3 Reactivos	24
	V.1.4 Soluciones	24
	V.1.5 Material biológico	24
	V.2 Métodos	25
	V.2.1 Descripción de la empresa productora y exportadora de chile pimiento morrón	25
	V.2.2 Perfil microbiológico de chile pimiento morrón producido en invernadero	25
	V.2.2.1 Obtención de las muestras	25
	V.2.2.2 Preparación de las muestras	27
	V.2.2.3 Análisis microbiológico	27
	V.2.2.3.1 Grupos indicadores	27
	V.2.2.3.2 Cuantificación de OCT y <i>E. coli</i> por la técnica de número más probable (NMP) de agua y solución hidropónica	28
	V.2.2.3.3 Detección y aislamiento de <i>Salmonella</i>	30
	V.2.2.3.4 Detección y aislamiento de <i>L. monocytogenes</i>	31
	V.2.2.3.5 Identificación de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR	33
	V.2.3 Evaluación de la eficacia de diversos tratamientos de desinfección en la inactivación <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> en chile pimiento morrón	35
	V.2.3.1 Activación de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. y	35

	<i>E. coli</i>	
	V.2.3.2 Preparación del inóculo	35
	V.2.3.3 Inoculación	35
	V.2.3.4 Aplicación de tratamientos de desinfección	36
	V.2.3.5 Recuento	36
	V.3 Diseño experimental	37
VI.	RESULTADOS	38
	VI.1 Cuantificación de microorganismos indicadores en chiles pimiento morrón y materiales obtenidos a lo largo de su producción	38
	VI.1.1 Incidencia de BMA y H/L en aire	41
	VI.1.2 Incidencia de OCT y <i>E. coli</i> en agua y solución hidropónica	42
	VI.2 Incidencia de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i>	45
	VI.3 Eficacia de diversos tratamientos de desinfección en la inactivación de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> en Chile pimiento morrón	47
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
	VII.1 Cuantificación de microorganismos indicadores en chiles pimiento morrón y materiales obtenidos a lo largo de su producción	49
	VII.2 Incidencia de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i>	54
	VII.3 Eficiencia de diversos tratamientos de desinfección en la inactivación de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> en Chile pimiento morrón	55
VIII.	CONCLUSIONES	58
IX.	BIBLIOGRAFÍA	59
	ANEXO A	66



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción anual de chile seco a nivel nacional	8
2	Procedimiento para la recolección de muestras de chiles pimiento morrón y de diversos materiales asociados a su producción	26
3	Condiciones de amplificación para <i>Salmonella</i> (Lui y col., 2002)	34
4	Condiciones de amplificación para <i>L. monocytogenes</i> (Aznar y Alarcón, 2002)	34
5	Número total de muestras recolectadas en el invernadero productor de chile pimiento morrón	38
6	Coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), incidencia y cuantificación de <i>E. coli</i> en agua y soluciones hidropónicas del invernadero productor de pimiento morrón	44
7	Incidencia de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en chile pimiento morrón de invernadero y materiales asociados a su cultivo y empaçado	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Frutas y verduras en brotes de enfermedades en Estados Unidos en el periodo 1990-2004 (CSPI, 2006)	5
2	Exportaciones de chile producidos en México (SIAP, 2010)	10
3	Importaciones de chile a México (SIAP, 2010)	10
4	Corte longitudinal y transversal del fruto (León, 2010)	12
5	Estructura de la pared del fruto (León, 2010)	13
6	Pimiento morrón tipo california (Linares, 2004)	14
7	Pimiento morrón tipo lamuyo (Linares, 2004)	14
8	Pimiento morrón tipo italiano (Linares, 2004)	14
9	Reacciones del cloro en presencia de agua (Garmendia, 2006)	18
10	Preparación del pimiento morrón	27
11	Recuento de BMA, OCT y H/L por la técnica de vaciado en placa	28
12	Recuento de OCT y <i>E. coli</i> por la técnica de NMP	29
13	Pre-enriquecimiento de las muestras en CL	30
14	Aislamiento de <i>Salmonella</i> en pimiento morrón por el método tradicional	31
15	Pre-enriquecimiento de las muestras en caldo UVM	32
16	Enriquecimiento de las muestras en caldo fraser	32
17	Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> en pimiento morrón de invernadero	33
18	Diagrama de flujo de pruebas de desinfección con diferentes germicidas aplicados en los chiles pimiento morrón	37
19	Contenido de BMA, OCT y H/L en chile del invernadero y almacenado cámara fría	40
20	Contenido de BMA, OCT y H/L de fibra de coco y superficies	41
21	Hongos y levaduras obtenidos de muestras de aire	42



22	Contenido de BMA y H/L de muestras de aire	42
23	Contenido de BMA de muestras de agua y soluciones hidropónicas	44
24	Cultivos de <i>Salmonella</i> en placas de XLD y sulfito bismuto	45
25	Cultivo de <i>Listeria</i> en placas de agar MOX	45
26	Confirmación de cepas de <i>Salmonella</i> mediante PCR.	46
27	Log UFC/chile inicialmente inoculados y después del secado	48
28	Reducción de <i>Salmonella</i> spp. y <i>E. coli</i> tras la aplicación de los tratamientos	48

## RESUMEN

Los sistemas dirigidos al control de peligros microbianos en frutas y verduras deben fundamentarse en información objetiva sobre cómo se gesta la contaminación. El presente trabajo se realizó en una empresa productora de pimiento morrón con un buen nivel tecnológico. El objetivo fue caracterizar microbiológicamente el proceso de producción del chile e identificar posibles fuentes de contaminación de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Adicionalmente se evaluó la eficacia de tratamientos de desinfección. Se colectaron 250 muestras de pimiento morrón y 324 muestras de materiales asociados a su producción (agua, soluciones hidropónicas, aire y superficies). Se cuantificó la población de grupos indicadores de interés sanitario (bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y hongos y levaduras) y la incidencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Por otra parte, se evaluó la eficacia del hipoclorito de sodio, ácido peracético y Nobac citrus (ácidos orgánicos) para la inactivación de *E. coli* y *Salmonella* spp. en pimiento morrón. En términos generales, las poblaciones de los grupos indicadores fueron aceptables en todos los materiales analizados. Se detectó *E. coli* en el 86.7% de las muestras de solución hidropónica y en el 11% de los chiles, mientras que *Salmonella* y *Listeria* spp. se aislaron en el 6.5 y 6.7% de las muestras de chile y bandas transportadoras, respectivamente. Los tres desinfectantes probados fueron efectivos para la reducción de *Salmonella* y *E. coli* alcanzando reducciones mayores a 5 logaritmos. Los resultados evidencian que la contaminación de tipo fecal puede ocurrir eventualmente dentro de los invernaderos y probablemente pueda asociarse a la manipulación por parte de los trabajadores.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Las frutas y hortalizas son productos que generalmente se consumen en fresco, por lo que se han visto implicadas en brotes de salmonelosis y listeriosis, entre otros. Esto ha sido alarmante ya que durante los últimos años el consumo de este tipo de alimentos ha ido en aumento poniendo en riesgo la salud pública.

Para disminuir el riesgo asociado al consumo de este tipo de productos, la principal medida es evitar la contaminación de los productos con microorganismos patógenos que puedan afectar la salud del consumidor y con microorganismos deterioradores que afecten la integridad del producto produciendo pérdidas a los productores. Esta contaminación superficial de frutas y hortalizas varía en número y tipo, dependiendo del producto y del manejo, previo y posterior a la cosecha, que dicho producto haya recibido.

México es el segundo país exportador de pimiento morrón a nivel mundial seguido de China, por lo que es importante que los productores tengan en cuenta que es necesario cumplir ciertos lineamientos en la producción para la obtención de productos de buena calidad y de esta manera evitar la pérdida de compradores en el extranjero.

Una empresa productora de pimiento morrón ubicada en el estado de Querétaro solicitó la cooperación del área científica para poder analizar los diferentes puntos de la producción para identificar los riesgos microbiológicos e implementar medidas correctivas para la obtención de un producto inocuo y de buena calidad. De esta manera se evitaran pérdidas monetarias y se permitirá la exportación y venta nacional e internacional del pimiento morrón producido en dicha empresa.

Detectar los puntos de contaminación durante la producción de pimiento morrón en invernadero es importante para diseñar y hacer efectivas las medidas de control.

Recurrir a programas como prácticas sanitarias de agricultura, prácticas sanitarias de operación y el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC), son enfoques ampliamente recomendados para prevenir o eliminar a los microorganismos patógenos de frutas y verduras crudas. No es posible implementar el sistema de APPCC de manera confiable cuando no existe un respaldo científico. De ahí la importancia de evaluar la eficiencia de la operaciones en cada etapa de producción del chile.

En este trabajo se llevó a cabo un monitoreo microbiológico a lo largo del proceso de producción del chile pimiento morrón. Adicionalmente se evaluó la eficacia de diversos tratamientos de desinfección para la inactivación de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en la superficie de chile.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Microbiología de frutas y hortalizas

Las frutas y hortalizas se han convertido en uno de los alimentos más deseados hoy en día por los consumidores, y en consecuencia se ha incrementando su consumo. Desafortunadamente este cambio en los patrones de ingesta también ha repercutido en el aumento de brotes de enfermedad asociados a su consumo (Beuchat, 1996). En respuesta las instituciones gubernamentales han tenido que diseñar programas encaminados al aseguramiento de la inocuidad de los productos hortofrutícolas y para proteger a los consumidores contra los peligros microbianos (FDA, 2001). Por otra parte el aumento en el reporte de brotes de salmonelosis en los Estados Unidos asociados con frutas y verduras frescas también se asocian a una distribución más amplia alrededor del mundo y a la disponibilidad durante prácticamente todo el año (Geldreich y Bordner, 1970; Hedberg y col., 1994).

Generalmente, las hortalizas frescas albergan una población diversa de microorganismos, siendo frecuentes los niveles de  $10^5$ - $10^7$  UFC/g (Acevedo y col., 2001). Entre las bacterias más comunes 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).

En el caso de frutas y hortalizas crudas la carga microbiana está influenciada por numerosos factores. Las manos del personal requerido para recolectar, clasificar, atar y envasar, así como la maquinaria utilizada para estas operaciones, contribuyen al incremento en la carga microbiana y en la distribución que éstos puedan tener en el producto. La recolección daña a menudo el producto, con el resultado de que algunos nutrientes son liberados, con lo que se favorece el crecimiento microbiano, y se ofrece una puerta de entrada a los microorganismos

que causan deterioro. Los contenedores y vehículos utilizados para el transporte son una fuente adicional de microorganismos.

Hasta que los productos alcanzan mercados mayoristas o minoristas, pueden sufrir todavía manipulaciones adicionales. Pueden ser desembalados, limpiados, rehumedecidos, reempaquetados y dispuestos para su venta. Todo esto puede ser hecho higiénicamente y con la refrigeración adecuada o bien en ausencia de cualquiera de las dos condiciones. Algunas frutas y hortalizas pueden ser troceadas o picadas para su inclusión en ensaladas de tipo “delicatesen”. Los microorganismos se desarrollarán más rápidamente en los productos troceados, debido a la mayor disponibilidad de nutrientes y agua. La mayor manipulación de estos productos incrementa la oportunidad para que ocurra la contaminación (incluidos patógenos), causada bien por el manipulador o bien por las superficies de trabajo o los utensilios previamente expuestos a otros alimentos. La falta de control de la temperatura y la humedad durante el almacenamiento y distribución de los alimentos pueden propiciar el crecimiento de la población bacteriana (ICMSF, 1985).

#### II.1.1 Enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas.

Teóricamente cualquier fruta u hortaliza puede ser vehículo de bacterias, virus o parásitos patógenos al hombre. Se han involucrado muchos tipos de frutas y verduras incluyendo lechuga, germinados de alfalfa, perejil, chayote y melón, así como el jugo de naranja y manzana no pasteurizado (Beuchat, 1996).

De acuerdo a lo reportado por la CSPI (2006), en el periodo del 1990 al 2004, las frutas fueron vehículo de 130 brotes de enfermedad con 8,284 casos mientras que las verduras se asociaron a 231 brotes con 11,957 casos, destacando productos como papa, lechuga, melón, etc. (Figura 1).

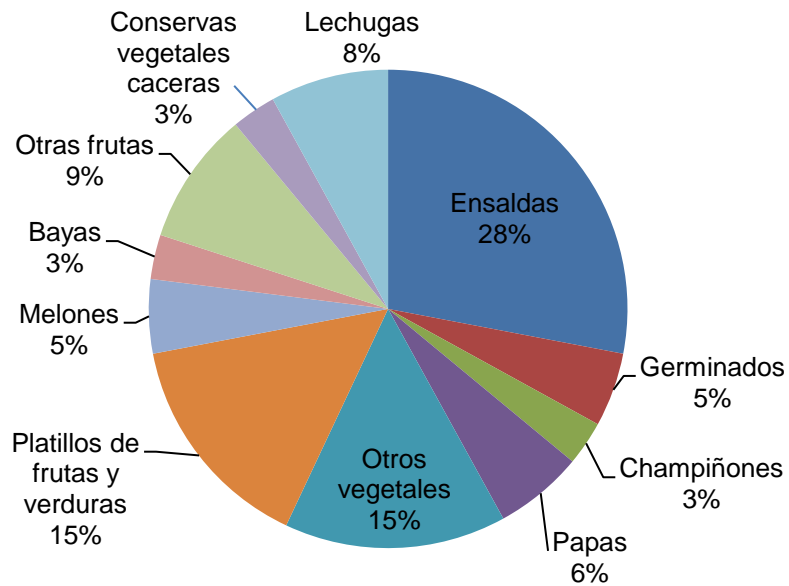


Figura 1. Frutas y verduras en brotes de enfermedades en Estados Unidos en el periodo 1990-2004 (Fuente: CSPI, 2006).

Entre las bacterias patógenas implicadas en brotes asociados al consumo de verduras se incluyen aquellos que provienen de las tres fuentes generales de contaminación: exclusivamente humanos (*Vibrio cholerae*, *Salmonella Typhi*, *Shigella*), zoonóticos típicos (*Salmonella*, *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7) y comunes en el medio ambiente (*Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*).

En los Estados Unidos en el período de 1973 a 1997 se registraron 190 brotes con 16,058 casos, 598 hospitalizaciones y 8 muertos asociados al consumo de verduras, frutas, ensaladas o jugos. En este registro estuvieron implicados *Salmonella* (30 ocasiones), *E. coli* O157:H7 (13), *Shigella* (10), *Campylobacter* (84), *B. cereus* (1), *Y. enterocolitica* (1), *S. aureus* (1), Virus de hepatitis A (12), Norovirus (9), *C. cayetanesis* (8), *G. lamblia* (5) y *C. parvum* (3) (Férrandez-Escartín, 2008).

Dentro de los principales microorganismos patógenos de humanos que se han encontrado involucrados en estos brotes están las bacterias como *E. coli* O157:H7

(Besser y col., 1993; Ackers y col., 1998; Hilborn y col., 1999), *Salmonella* (Cook y col., 1998; Isaacs y col., 2005) y *Listeria monocytogenes* (Lin y col., 2002). El agente causal de la mayoría de los brotes de enfermedades ha sido *Salmonella* spp. En los Estados Unidos esta bacteria fue la causante de brotes de enfermedades por consumo de germinados (Mahon y col., 1997), tomate (Cummings y col., 2001), rebanadas de tomate (Wood y col., 1991), rebanadas de melón (Ries y col., 1990) y rebanadas de sandía (Blostein, 1993).

Recientemente en Estados Unidos se reportó un brote entre los meses de abril y agosto del 2008 en donde el agente etilógico fue *Salmonella* Saintpaul. Un total de 1407 personas en 43 estados fueron afectadas. El alimento implicado fue chile jalapeño y serrano cultivados en un rancho en México (Maki, 2009).

No solo la *Salmonella* spp. puede causar enfermedades en los humanos, sino existe un gran número de microorganismo patógenos como lo es la *Listeria monocytogenes* que se ha reportado su presencia en muestras de aguas residuales. Estas aguas residuales son usadas para el riego de los cultivos, por lo que contaminan la vegetación para consumo humano (MacGowan y col., 1994).

## II.2 Chile

El chile es un fruto de sabor picante y acre de la familia de las Solanáceas. Originario de México, centro y Sudamérica. Existen cientos de tipos de diversos tamaños, colores y formas. Es ingrediente indispensable de los guisos de México, dependiendo su uso se consideran verdura o condimento. Es el chile, de hecho, el que define, caracteriza y hace único el sabor de un platillo, es llamado "el Rey de la cocina mexicana" (Bringuier y col., 2006).



### II.2.1 Aspectos generales

La planta mide entre 30 y 80 centímetros de altura, el fruto presenta características variadas: dulce o picante según el estímulo gustativo que provoca; su color varía según el grado de madurez entre los que se encuentra: rojo, anaranjado, verde, blanco o purpúreo.

La planta del chile se adapta a diferentes tipos de suelo, pero se desarrolla mejor a profundidades de 30 a 60 centímetros y en suelos franco arenoso, franco limosos o franco arcillosos, con alto contenido de materia orgánica. Se recomienda un pH superior a 5.5 para favorecer su desarrollo.

El clima para el cultivo del chile debe ser cálido ya que a temperaturas debajo de los 10°C y por arriba de los 35°C su desarrollo no es el adecuado.

La sustancia picante llamada capsaicina que se concentra en numerosas semillas y venas es un químico cien veces más picante que la pimienta y que estimula la liberación de neurotransmisores y activa los puntos receptores de dolor de la lengua y el paladar. El cerebro responde con endorfinas que incrementan el metabolismo liberando más saliva y sudor. El nivel de picante puede variar de una planta a otra, debido a las condiciones medioambientales y del suelo en que se encuentra la planta (SIAP, 2010).

### II.2.2 Producción

El chile tiene una producción de 1.8 millones de toneladas –alrededor de 150 mil hectáreas sembradas en el país–, que representan un valor comercial de más de siete mil millones de pesos, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial como productor de esta hortaliza. La preferencia en los mercados internacionales condujo

a que en el 2004 el 25 por ciento de la producción total se destinara a la exportación.

Evidentemente el chile tiene una gran importancia histórica y cultural en nuestro país lo que lo sitúa como un alimento básico en la dieta nacional. La preferencia de esta hortaliza a nivel nacional se mantiene a un nivel medio al registrar un consumo per cápita de 14.5 kilogramos.

La producción en México del chile seco ancho se reporta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Producción anual de chile seco a nivel nacional.

Producto	Producción anual en volumen (toneladas)	Valor comercial de la producción anual (pesos)
Chile seco costeño	1,124	48 millones 238 mil
Chile seco guajillo	28,373	Mil 394 millones 177 mil
Chile seco pasilla	3,949	201 millones 801 mil
Chile seco (sin clasificar)	18,573	606 millones 525 mil
Chile seco tabaquero	134	9 millones 972 mil

Fuente: SAGARPA, 2005.

Zacatecas, ubicado como el principal productor de chiles con 60 por ciento de la producción nacional, registra anualmente una producción de chiles secos (guajillo, ancho, pasilla y árbol), de cerca de 50 mil toneladas (valor comercial de más de mil 978 millones 994 mil pesos); en chile verde tiene una producción de 107 mil 475 toneladas al año (valor comercial de más de dos mil 210 millones 625 mil pesos).

El segundo lugar en el cultivo de chile seco, lo ocupa el estado de San Luis Potosí, con el 27 por ciento de la superficie cosechada con un valor de producción de más de 970 millones 743 mil pesos. Otras entidades productoras de esta hortaliza son: Aguascalientes y Chihuahua (SAGARPA, 2005).

En la última década la superficie sembrada de chiles registró una tasa de crecimiento media anual de -0.6%, sin embargo, el rendimiento aumentó: la producción mantuvo un ritmo de crecimiento de 1.5%. El comportamiento es resultado de la incorporación de cada vez más avanzados sistemas de producción y de la proliferación de invernaderos y otros esquemas de agricultura protegida (SIAP, 2010).

#### II.2.2.1 Exportación

De acuerdo con las cifras mundiales del comercio de la FAO, México es el principal exportador de chile verde y sexto lugar en ventas de chile seco en el extranjero. En la Figura 2 se observa que en diez años la tasa de crecimiento promedio anual del volumen exportado fue de 14.6%. El ingreso del país por concepto de exportaciones fue de 720 millones de dólares en 2009, el volumen triplicó al del año 2000.

#### II.2.2.2 Importación

En la Figura 3 se puede observar el aumento en la importación de chile a México. Teniendo como proveedores de chile a 41 países, de los cuales China es el principal con 26 mil 243 toneladas. En el continente americano destacan Perú (10 mil 258 toneladas) y Estados Unidos (mil 385 toneladas) (SIAP, 2010)

**Exportaciones: serie histórica**

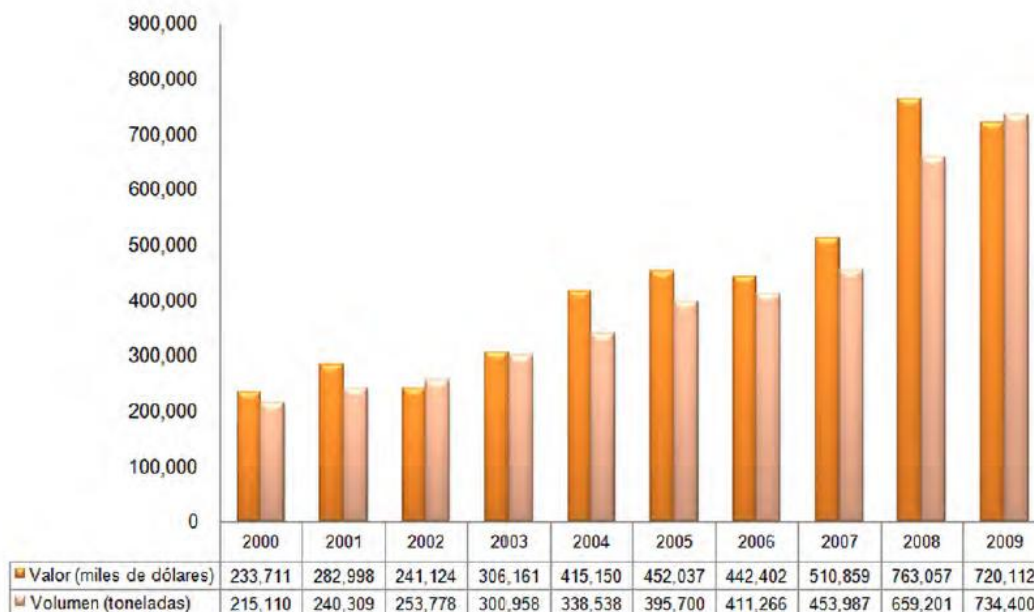


Figura 2. Exportaciones de chile producidos en México. Se reporta la cantidad en volumen del producto así como el valor en miles de pesos (Fuente: SIAP, 2010).

**Importaciones: serie histórica**

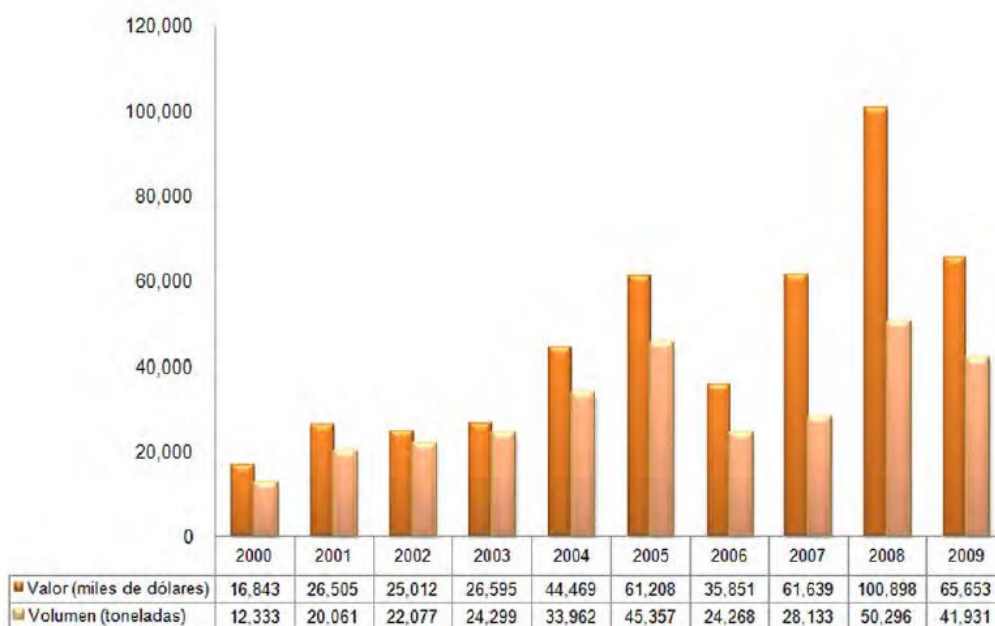


Figura 3. Importaciones de chile a México. Se reporta la cantidad en volumen del producto así como el valor en miles de pesos (Fuente: SIAP, 2010).

### II.3 Pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.)

El pimiento morrón pertenece a la familia de las Solanáceas y a la especie *Capsicum annuum* L (Linares, 2004). Es una planta originaria de América tropical (Ecuador, Perú y norte de Chile); alcanzó gran difusión por todo el mundo después del descubrimiento de América. Da un producto para consumo inmediato en estado fresco y guisado (Giaconi y Escaff, 2004).

En México se domesticó su cultivo y es donde se encuentra su centro de diversidad. Se cultiva en muchos de los climas tropicales y templados de todo el mundo, especialmente desde el norte de Colombia hasta el sur de Estados Unidos. También se cultiva en Argentina. Es un cultivo importante en México y República Dominicana (FAO, 2006).

#### II.3.1 Aspectos generales

La familia de las Solanáceas son plantas herbáceas (pero leñosas en su base), de modesto tamaño entre 0.75 a 1.0 m de alto, tienen un tallo frágil, erecto y verde, con ramas que se subdividen en dos partes, tiene las hojas grandes y de color verde intenso brillante, de forma oblonga (más largas que anchas), lanceolada o globosa. Sus flores son escasas de color blanco (FAO, 2006; Bianchini y Corbeta, 1974).

El fruto es de color variable (verde, rojo, amarillo, naranja, violeta o blanco); algunas variedades van pasando del verde al anaranjado y al rojo a medida que van madurando. Su tamaño es variable, pudiendo pesar desde uno cuantos gramos hasta más de 500 (Tamaro, 1974).

El fruto es una baya de dos hasta cinco celdas; hueca en su interior, las paredes que las separan son incompletas y en la parte apical del fruto las celdas se

comunican; las paredes que las separan son incompletas y en la parte apical del fruto las celdas se comunican (Figura 4). La pared del fruto o pericarpo (Figura 5), incluye la epidermis compuesta por una capa de células isodiamétricas de paredes externas engrosadas, y una zona de dos a cuatro capas de colénquima, que junto con la epidermis forma una cáscara fina pero resistente.

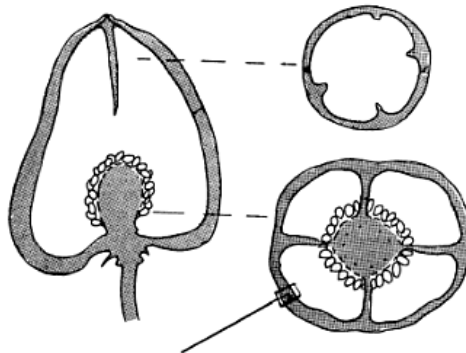


Figura 4. Corte longitudinal y transversal del fruto (Fuente: León, 2000).

El mesocarpo es un tejido carnoso, de parénquima con cristales o cromatóforos amarillos o rojos; la banda exterior está constituida por células isodiamétricas, mientras que en la interior son alargadas en sentido radial, más grandes; entre ellas pasan haces vasculares muy finos. Entre la última capa del mesocarpo y el endocarpo se encuentran las llamadas “células gigantes”, más bien vesículas, en que las células son muy pequeñas y de paredes muy delgadas (León, 2000).

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.

Las semillas, de color amarillo paja, crecen en placentas centrales situadas en la base del fruto (León, 2000).

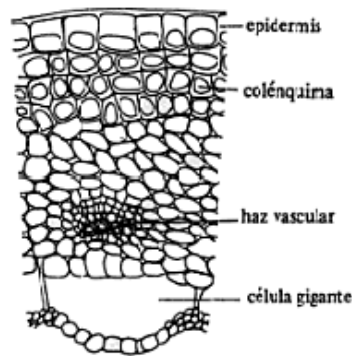


Figura 5. Estructura de la pared del fruto (Fuente: León, 2010).

### II.3.2 Variedades y tipos de pimiento morrón

Existen diferentes variedades de pimiento morrón:

- Variedades dulces: son las que se cultivan en los invernaderos. Presentan frutos de gran tamaño para consumo en fresco y procesado.
- Variedades de sabor picante: suelen ser variedades de fruto largo y delgado.
- Variedades para la obtención de pimentón: son un subgrupo de las variedades de fruto largo y delgado.

Dentro de las variedades de fruto dulce se pueden diferenciar tres tipos de pimiento:

-Tipo California: frutos cortos (7-10 cm), anchos (6-9 cm), con tres o cuatro cascotes bien marcados, con el cáliz y la base del pedúnculo por debajo o a nivel de los hombros y de carne más o menos gruesa (3-7 mm). Son los cultivares más exigentes en temperatura (Figura 6), y los más utilizados en el mercado.



Figura 6. Pimiento morrón tipo california (Fuente: Linares, 2004).

- Tipo lamuyo: son frutos largos y cuadrados de carne gruesa. Los cultivares pertenecientes a este tipo, suelen ser más vigorosos (de mayor aporte y más largos) y menos sensibles al frío que los de tipo California (Figura 7).



Figura 7. Pimiento morrón tipo lamuyo (Fuente: Linares, 2004).

- Tipo italiano: son frutos alargados, estrechos, acabados en punta, de carne fina, más tolerantes al frío (Figura 8) (Linares, 2004).



Figura 8. Pimiento morrón tipo Italiano (Fuente: Linares, 2004).



### II.3.3 Producción

Su densidad de siembra es aproximadamente 30000 plantas por hectárea. El inicio de la cosecha se da entre los 90 y 115 días después de la siembra y se prolonga durante dos o tres meses. Se adaptan bien a los climas cálidos y no toleran las heladas. Es una planta de día corto y la temperatura para su mejor desarrollo está entre 21 y 26°C, se debe procurar no bajar de 16°C. Necesita de una precipitación de 1000 mm. Existen variedades que se diferencian por el destino de su producción y por su carácter dulce o picante (FAO, 2006).

En 2009 en México se obtuvo un volumen de 161 mil 830 toneladas de pimiento morrón. (SIAP, 2010)

La producción de este fruto en invernadero ha tomado gran importancia en los últimos años ya que la ventaja del sistema de invernadero sobre el método tradicional a cielo abierto, es que, bajo invernadero, se establece una barrera entre el medio ambiente externo y el cultivo.

Esta barrera limita un microclima que permite proteger el cultivo del viento, lluvia, plagas, enfermedades, hierbas y animales. Igualmente, esta protección permite al agricultor controlar la temperatura, la cantidad de luz y aplicar efectivamente control químico y biológico para proteger el cultivo.

La calidad de un producto se ve reflejada en las características perceptibles para los consumidores y es de particular importancia ya que determina si este será comprado o no. Uno de los factores más importantes de la calidad de este alimento es el color ya que solo será consumido si este puede agrandar visualmente al consumidor, la firmeza del fruta es uno de los parámetros objetivos que más información nos proporciona sobre el estado de la maduración, y por tanto es una de las técnicas más utilizadas para su control. De la misma manera en los frutos

maduros, los sólidos totales solubles tienen importancia por estar formados de compuestos orgánicos que, en gran medida, determinan el sabor, los colores y, en general su calidad de la fruta: además, pueden ser utilizados como indicadores de maduración.

En 1990 había aproximadamente 50 has, con algún tipo de producción de vegetales bajo invernadero, en 2001 se elevó a 950 y ahora suman alrededor de 4,069 has; con una diversificación de cultivos, creciendo a razón de 814 has por año de acuerdo a la Asociación Mexicana de Productores de Hortalizas en Invernadero (Elías y col., 2010).

## II.4 Desinfección

### II.4.1 Definición

La desinfección es el proceso de destrucción física de los microorganismos cuya actividad compromete la inocuidad o las características sensoriales de un alimento (Fernández-Escartín, 2008).

### II.4.2 Tipos de desinfectantes

Entre principales agentes químicos antimicrobianos empleados para la desinfección de frutas y hortalizas figuran:

1. Hipoclorito de sodio.
2. Dióxido de cloro.
3. Ácidos orgánicos.
4. Peróxido de hidrógeno.
5. Yodo.
6. Ozono (Parish y col., 2003).

Compuestos de cloro. El hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ) y el hipoclorito de calcio ( $\text{Ca(OCl)}_2$ ), son compuestos ampliamente utilizados en la industria y el hogar. Se les puede conseguir en forma de polvo o soluciones líquidas y a distintas concentraciones, dependiendo del uso que se les vaya a dar. Productos que contiene entre 5 y 70% de hipoclorito de calcio son usados para desinfectar equipos de lecherías y utensilios en los restaurantes. El hipoclorito de sodio a una concentración de 1% se usa para la higiene personal y como desinfectante casero; concentraciones entre 5 y 12% también se emplean como blanqueadores y desinfectantes caseros, y como agentes de saneamiento en la industria alimentaria (Pelczar, 1992).

Cuando el cloro se disuelve en agua se forma ácido hipocloroso y ácido clorhídrico estableciéndose un equilibrio entre las distintas sustancias (reacción 1 Figura 9). A su vez el ácido hipocloroso (reacción 2 Figura 9) está en equilibrio con su forma disociada. Es así que las soluciones de cloro contienen moléculas de  $\text{HOCl}$  (ácido hipocloroso) y sus iones  $\text{H}^+$  y  $\text{ClO}^-$  en equilibrio. De ellos, la forma no disociada del ácido ( $\text{HOCl}$ ) es la forma activa frente a los microorganismos. Cuando se disuelve hipoclorito en agua la reacción que ocurre es a la inversa (reacción 2 Figura 9), es decir el ión hipoclorito formado en la disolución de la sal forma ácido hipocloroso, estableciéndose el mismo equilibrio.

El equilibrio entre estas sustancias químicas depende del pH. Al descender el pH, el equilibrio (reacción 2 Figura 9) se desplaza hacia la forma no disociada o sea el ácido hipocloroso predomina por lo que la acción antimicrobiana es mayor. Los porcentajes de ácido hipocloroso a pH 6 y 8 son de 97 y 23%, respectivamente. Sin embargo a pH más bajos el equilibrio de la reacción (1) de la Figura 9 se desplaza a la formación de cloro gas el cual se libera pudiendo producir intoxicaciones en los aplicadores. Por lo tanto, el pH es un factor de suma importancia a tener en cuenta en las soluciones de cloro. Utilizando soluciones de pH 6 se logra conseguir alta efectividad y estabilidad.

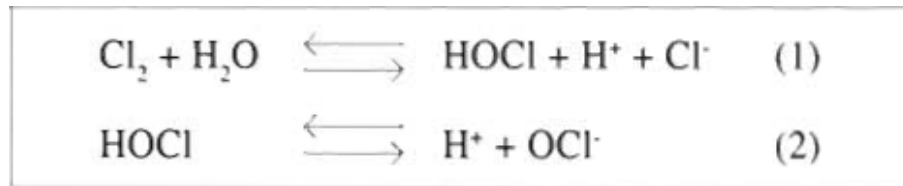


Figura 9. Reacciones del cloro en presencia de agua. El cloro en presencia de agua da la formación de ácido hipocloroso que a su vez se encuentra en equilibrio con su forma disociada (Fuente: Garmendia, 2006).

El modo de acción del ácido hipocloroso se basa en su capacidad oxidante. Es altamente reactivo en presencia de materia orgánica, reaccionando con muchos grupos funcionales oxidándolos. Su actividad antimicrobiana va a depender de la cantidad de cloro residual libre disponible en agua, que entra en contacto con las células microbianas (Garmendia, 2006). La eficacia del cloro para matar los microorganismos patógenos ha sido ampliamente estudiada (Beuchat y Ryu, 1997) En general, se utiliza en concentraciones entre 50 y 200 ppm durante 1 o 2 minutos (FDA, 2001).

Existen numerosos estudios donde se evalúa la efectividad del cloro en frutas y hortalizas. Por ejemplo, Pao y Davis (1999) demostraron que la cantidad de *Escherichia coli* inoculada en superficies de naranjas se reducía 2 órdenes/cm<sup>2</sup> luego de la inmersión en solución de 200 ppm de cloro por 8 minutos. Otros estudios demostraron que la atomización de lechugas con cloro (200 ppm) para la remoción de *E. coli* O157:H7 no fue más efectivo que el tratamiento con agua desionizada (Beuchat, 1999).

Ácidos. Los ácidos minerales, como el clorhídrico y sulfúrico, está en función del grado de disociación y por ello la concentración final de hidrogenoides. Los ácidos orgánicos se comportan un tanto diferentes en el sentido de que no toda su actividad germicida se puede atribuir a los hidrogenoides (Pelczar, 1992). Los

ácidos orgánicos se encuentran en su forma no ionizada a pH ácidos. En esta forma el ácido pasa a través de la membrana celular llegando al citoplasma. Debido a que el pH intracelular es cercano a la neutralidad, el ácido se disocia dentro de la célula, acidificando el interior celular causando efectos inhibidores de reacciones enzimáticas y sistemas de transporte (Foegeding y Busta, 1991)

Ácido peracético. El ácido peracético es un fuerte agente oxidante. Se plantea que los grupos sulfhidrilo en proteínas, enzimas y otros metabolitos son oxidados, de manera que pierden la funcionalidad de muchas de estas macromoléculas, lo cual trae como consecuencia la ruptura celular por pérdida de funcionalidad de la membrana citoplasmática (Garmendia, 2006). Su uso como desinfectante de frutas y hortalizas está documentado en varios trabajos, por ejemplo Wright y col. (2000) encontraron que la carga de manzana inoculadas con *E. coli* O157:H7 bajaba 2 órdenes cuando se trataba con ácido peracético (80 ppm). Por otra parte, cuando se usa 40 y 80 ppm de ácido peracético se reduce significativamente la población de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en superficies de melón (Park y Beuchat, 1999). La FDA (2001) aprueba su uso para la desinfección directa de frutas y hortalizas a una concentración de 40 a 80 ppm.

### **III. HIPÓTESIS**

- 1) La cuantificación de grupos indicadores de interés sanitario a lo largo del cultivo, cosecha y empaque de chile pimiento morrón puede emplearse para la detección de las posibles fuentes de contaminación con microorganismos patógenos que ocurren en los invernaderos.
- 2) El hipoclorito de sodio es el germicida más eficiente en la desinfección de pimientos morrón.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Determinar el perfil microbiológico de chiles pimiento morrón producidos en invernaderos mediante la técnica de hidroponia, y evaluar la eficacia de diversos germicidas empleados para la desinfección del fruto.

### IV.2 Particulares

- Determinar la presencia de grupos indicadores en chile pimiento morrón y materiales asociados a su cultivo, cosecha y empaque.
- Determinar la incidencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en chiles pimiento morrón producidos en invernadero.
- Evaluar la eficiencia del hipoclorito de sodio, ácido peracético y nobac citrus<sup>®</sup> (ácidos orgánicos de semillas de cítricos) para la inactivación de *E. coli* y *Salmonella* spp. en pimiento morrón.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Equipo

Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C

Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)

Baño María de precisión

Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial

Bolsas de polietileno de diferentes capacidades (Whirl-Pack®)

Campana de flujo laminar (Alder y Veco)

Centrifuga de mesa

Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)

Esponjas (Nasco Whirl-Pack®)

Gradillas

Hieleras portátiles

Homogenizador (BagMixer Interscience)

Incubadora de 22 °C (Pecision Scientific, Seward 400)

Incubadora de 35 °C

Kit de pipetas para PCR

Muestreador de aire (Mikrobiologie MAS, 100 Merck)

Potenciómetro

Termociclador (TC-3000)

Transiluminador UV

Vortex (Daiger Vortex Genie 2)

Micropipetas



## V.1.2 Medios de cultivo

Agar cuenta estándar (ACE), (BD Bioxón)

Agar lisina-hierro (LIA), (BD Bioxón)

Agar papa dextrosa con ampicilina al 1% y rosa de bengala al 6% (APD)

Agar Oxford modificado (MOX), (Acumedia)

Agar rojo violeta bilis (ABRV), (Merk)

Agar soya tripticasa con rifampicina (200 ppm), (ASTR)

Agar sulfito bismuto (ASB), (BD Bioxón)

Agar triple azúcar hierro (TSI), (BD Bioxón)

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), (BD Bioxón)

Base caldo rojo fenol más manitol (Merck Darmstadt)

Base caldo rojo fenol más xilosa (Sigma)

Base caldo rojo fenol más ramnosa (Sigma)

Caldo de enriquecimiento fraser (FB), (BD DIFCO)

Caldo lactosado

Caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB), (BD Bioxón)

Caldo laurila sulfato con MUG (BD DIFCO)

Caldo neutralizante, (BD DIFCO)

Caldo tetrionato (BD Bioxón)

Caldo rappaport (BD Bioxón)

Caldo soya tripticasa (CST), (BD Bioxón)

Caldo soya tripticasa con rifampicina (200 ppm), (CSTR)

Caldo de enriquecimiento de la Universidad de Vermont (UVM), (Acumedia)

Medio de SIM (BD Bioxón)

Peptona de caseína (DP), (BD Bioxón)

### V.1.3 Reactivos

Agua destilada estéril

Buffer TAE 1X

Citrato férrico de amonio

Gel de agarosa

Reactivo de kobac

### V.1.4 Soluciones

Ácidos orgánicos de semillas de cítricos (10%) (Nobac citrus<sup>®</sup>)

Solución de bromuro de etidio

Solución de hipoclorito de sodio (200 ppm), (Vita<sup>®</sup>)

Solución de ácido peracético (80 ppm), (Tsunami<sup>®</sup>)

Solución salina isotónica (0.85% NaCl)

### V.1.5 Material biológico

Cepas

*Salmonella entérica*. Se emplearon cuatro serovares: Montevideo, Abaetetuba, Thompson, Typhimurium.

*Escherichia coli*. Todas las cepas eran resistentes a rifampicina (200 ppm). Las cepas fueron obtenidas de la colección del Laboratorio de Microbiología e Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

## V.2 Métodos

### V.2.1 Descripción de la empresa productora y exportadora de chile pimiento morrón

En el municipio de Colón, Querétaro se encuentra ubicada una empresa productora y exportadora de chile pimiento morrón. La empresa cuenta con dos invernaderos de 7.5 hectáreas, destinados a la producción de chile mediante la técnica de hidroponía.

La cosecha de los pimientos se lleva a cabo manualmente con cuchillos cortando el tallo y dejando al fruto con un pedúnculo de aproximadamente 3 a 4 cm de largo. Una vez cortados, los chiles son recolectados en contenedores metálicos que son enganchados a carros para ser transportados al área de empaque donde se vierten en una banda de recepción para ser conducidos a la banda de selección. Los chiles son clasificados manualmente de acuerdo al tamaño y forma.

Finalmente, los pimientos ya seleccionados son empacados en cajas plastificadas para exportación y de cartón para mercado nacional. El producto empacado se almacena en una cámara fría a 10°C y 97% de humedad relativa hasta su comercialización.

### V.2.2 Perfil microbiológico de chile pimiento morrón producido en invernadero

#### V.2.2.1 Obtención de las muestras

La empresa se visitó periódicamente para llevar a cabo la recolección de muestras. Primeramente se realizó un estudio observacional con el objetivo de detectar prácticas de manejo y fuentes potenciales de contaminación que pudieran comprometer la inocuidad microbiana del pimiento morrón.

Se tomaron muestras en el área de cultivo (chile pimiento, fibra de coco, solución hidropónica, agua, cuchillos, carros transportadores y aire de invernadero), en el área de empacado (bandas transportadoras) y en el área de almacenamiento (aire y chiles). La recolección de muestras se llevó a cabo como se describe en el Cuadro 2, empleando guantes y material estéril.

Cuadro 2. Procedimiento para la recolección de muestras de chiles pimiento morrón y de diversos materiales asociados a su producción.

Materiales a muestrear	Procedimiento de muestreo
Pimiento morrón	Los pimientos fueron tomados y guardados en bolsas de polietileno.
Fibra de coco	Se tomó una muestra significativa de fibra de coco y se colocó en bolsas de polietileno.
Solución hidropónica y agua	Se colocó en bolsas de polietileno (Whirl-Pack <sup>®</sup> ) y se cerraron herméticamente.
Cuchillos	Con una esponja (Whirl-Pack <sup>®</sup> ) húmeda se frotaron firmemente la superficie de la navaja de los cuchillos.
Carros transportadores	Con una esponja (Whirl-Pack <sup>®</sup> ) húmeda se frotó la superficie de los carros transportadores (100 cm <sup>2</sup> ).
Aire	Se utilizó un muestreador de aire durante un minuto para absorber un volumen total de 100 L de aire, utilizando placas de ACE y APD para la determinación de BMA y H/L.
Bandas transportadoras	Con una esponja (Whirl-Pack <sup>®</sup> ) húmeda se frotó la superficie de las bandas (100 cm <sup>2</sup> ).

Todas las muestras fueron perfectamente selladas, y guardadas en hieleras portátiles hasta su análisis, el cual se llevó a cabo dentro de las 24 hrs posteriores a su recolección. Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de

Microbiología de los Alimentos 2 del Departamento de investigación y Posgrado de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

#### V.2.2.2 Preparación de las muestras

Pimiento morrón: cada unidad experimental fue colocada en una bolsa de polietileno con 50 mL de DP y se frotó enérgicamente con las manos desde el exterior de la bolsa durante 1 minuto (Figura 10).



Figura 10. Preparación del pimiento morrón.

Fibra de coco: se pesaron 25 g de fibra de coco en una bolsa de plástico, se le adicionaron 225 mL de DP y se homogenizaron durante 1 minuto.

Superficies (cuchillos, carros transportadores y bandas transportadoras): a las bolsas con las esponjas (Whirl-pack) se adicionaron 25 mL de DP y se homogenizaron durante 1 minuto.

#### V.2.2.3 Análisis microbiológico

##### V.2.2.3.1 Grupos indicadores

Los grupos indicadores a analizar fueron bacterias mesófilas aerobias (BMA), organismos coliformes totales (OCT) y hongos y levaduras (H/L). Los recuentos de BMA, OCT y H/L se efectuaron por los métodos tradicionales (Pouch, 2001). Se llevaron a cabo por vaciado en placa utilizando ACE para BMA, ABRV para OCT y APD para H/L e incubando a 35 °C/48 h, a 35 °C/48 h y a 22° C/5 días respectivamente (Figura 11).

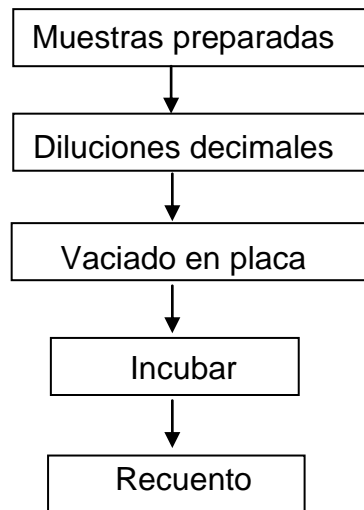


Figura 11. Recuento de BMA, OCT y H/L por la técnica de vaciado en placa.

#### V.2.2.3.2 Cuantificación de OCT y *E. coli* por la técnica de numero más probable (NMP) de agua y solución hidropónica

Las muestras de solución hidropónica y agua no tuvieron una preparación previa a su procesado. Para su análisis se usó la técnica de NMP utilizando una combinación de 7 tubos con CL de los cuales 5 fueron inoculados con 10 mL, 1 con 1 mL y 1 con 0.1 mL. Los tubos fueron incubados a 35 °C de 24 a 48 hrs y aquellos que resultaron positivos (formación de gas) fueron confirmados en CLBVB y en caldo lauril sulfato con MUG para determinar la presencia de *E. coli*. Los tubos de caldo lauril sulfato con MUG fueron incubados a 44.5 °C/48 h (Figura 12).

El caldo lauril sulfato con MUG permitió comprobar la presencia de *E. coli* mediante tres pruebas: 1) la producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa, 2) producción de indol por la utilización del triptófano al agregarle el reactivo de Kovac (el 95% de las cepas de *E. coli* son indol positivas), 3) presencia de fluorescencia al ser expuesto a luz UV (365 nm) debido a la presencia del 4-metilumbeliferona el cual se produce cuando la enzima producida por *E. coli*  $\beta$ -D-glucoronidasa (GUD) utiliza el ácido 4-metilumbeliferol- $\beta$ -D-glucoronico (MUG), (Pouch, 2001).

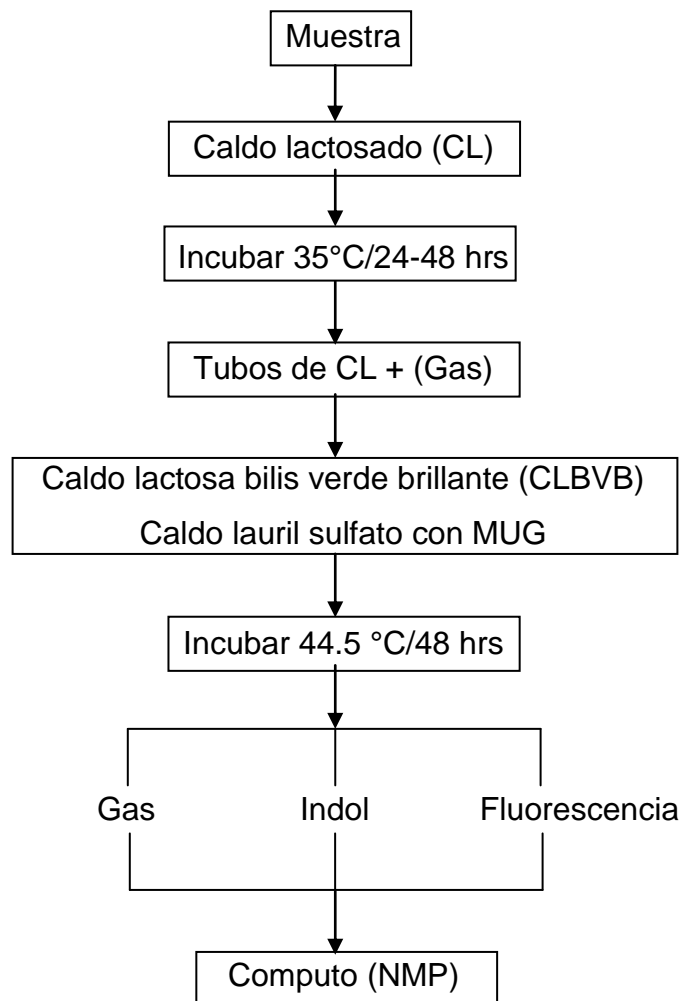


Figura 12. Recuento de OCT y *E. coli* por la técnica de NMP.

El NMP se determinó con la siguiente ecuación:  $NMP/mL \text{ o } g = P/(N \cdot T)^{1/2}$ , donde P es el número de tubos positivos, T es el volumen analizado (mL o g) y N es el volumen de muestra negativo (Swanson y col., 2001).

#### V.2.2.3.3 Detección y aislamiento de *Salmonella*

La detección de *Salmonella* en chiles se llevó a cabo en muestras compuestas de cuatro frutos. A partir de estas muestras se tomó una alícuota para agregarla a CL como un tratamiento de pre-enriquecimiento (Figura 13). Este fue homogenizado durante 1 minuto y se incubó a 35 °C/24 horas. Pasado el tiempo se tomaron un mililitro de la muestra y se adicionó a tubos con caldo tetratonato y a tubos con caldo Rappaport como un tratamiento de enriquecimiento que favoreció la multiplicación de *Salmonella* y la inhibición de la flora asociada. Los tubos fueron incubados a 43 °C/24 h.

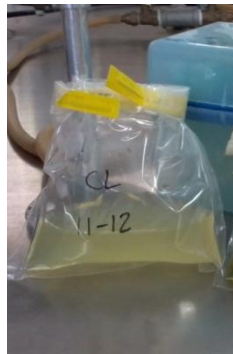


Figura 13. Pre-enriquecimiento de las muestras en CL.

Posteriormente, se utilizaron placas de agar XLD y agar sulfito bismuto para el aislamiento de *Salmonella* a partir de los caldos del tratamiento de enriquecimiento mediante un estriado en las placas, las cuales se incubaron a 35°C/48 h. Las colonias que presentaron la morfología característica se aislaron e incubaron en TSI y LIA como pruebas presuntivas de identificación bioquímica y se aplicó test



por serología (*Salmonella* O. Antisuero poly-A- I &Vi) (Figura 14). La confirmación fue realizada mediante PCR (Liu, 2002).

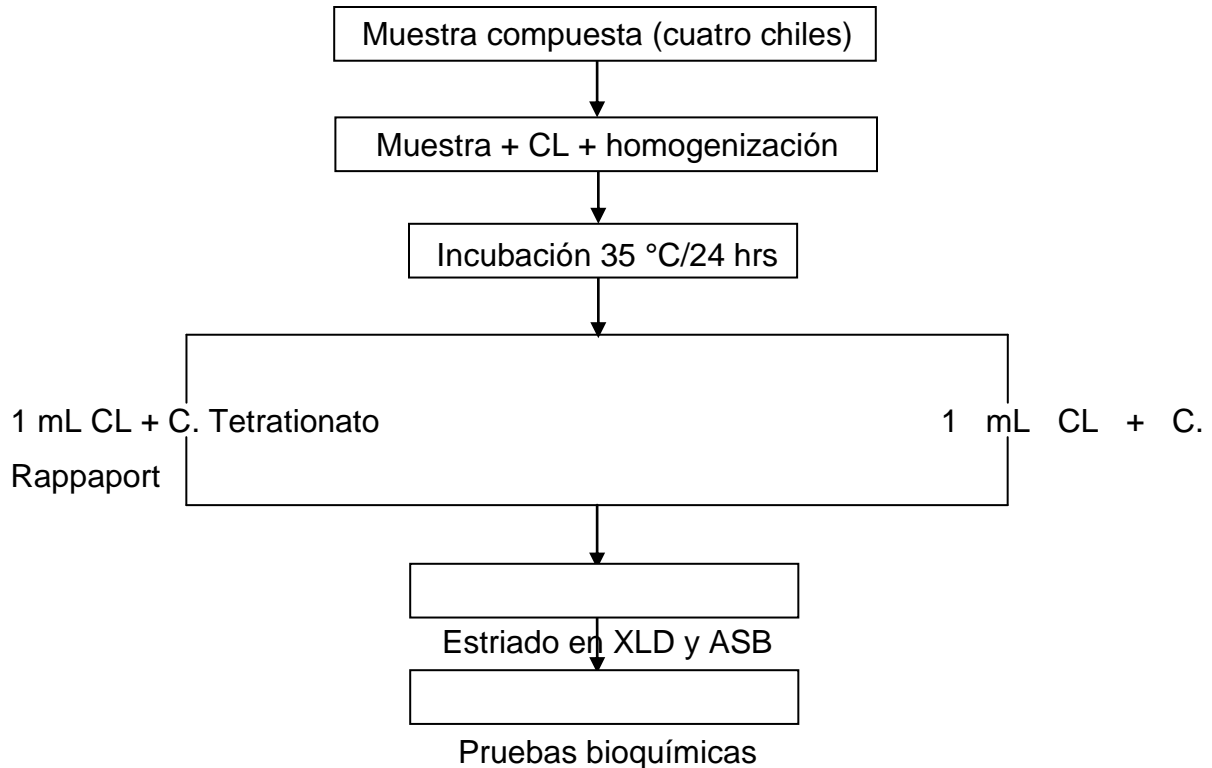


Figura 14. Aislamiento de *Salmonella* en pimiento morrón por el método tradicional.

#### V.2.2.3.4 Detección y aislamiento de *L. monocytogenes*

Se empleó la técnica de la USDA. Primer enriquecimiento: de la muestra conformada por cuatro chiles pimiento se tomó una alícuota a la cual se le agregó caldo UVM hasta obtener un volumen final de 200 mL (Figura 15). Se homogenizó por 1 minuto y se incubó a 30 °C/24 h. Segundo enriquecimiento: transcurridas las 24 h se tomó un mililitro y se agregó a tubos con caldo Fraser adicionado con citrato férrico de amonio al 5% y se incubó a 35 °C/24 h (Figura 16). La diferrización es facilitada al incluirse el citrato férrico de amonio al final de la preparación del medio. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, este resultado es dado

por la formación del 6-7 dihidroxicoumarin que reacciona con los iones férricos, obteniendo una coloración oscura (Pérez, 2010).

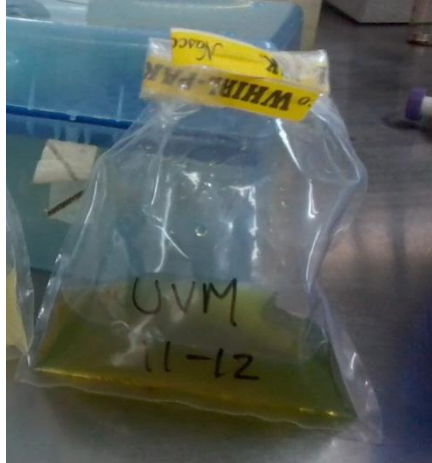


Figura 15. Pre-enriquecimiento de las muestras en caldo UVM.

Terminada la incubación, se utilizó agar MOX para el aislamiento de posibles colonias de *Listeria* tomando una asada del cultivo de cada muestra y sembrándolo por estrías en las placas, las cuales fueron incubadas a 30 °C/24-48 hrs (USDA, 2001). Finalmente, se seleccionaron las colonias sospechosas para someterlas a pruebas bioquímicas (SIM, ramnosa, xilosa y manitol) (Figura 17) y se confirmaron mediante PCR (Aznar y Alarcón, 2002).

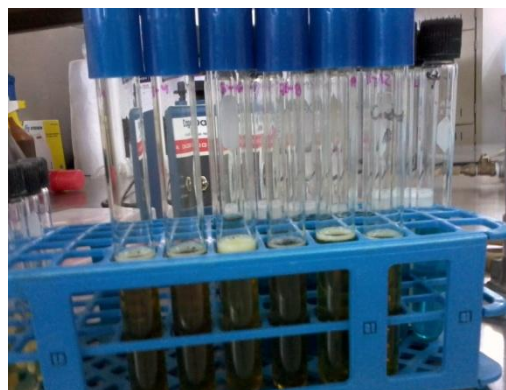


Figura 16. Enriquecimiento de las muestras en caldo fraser.

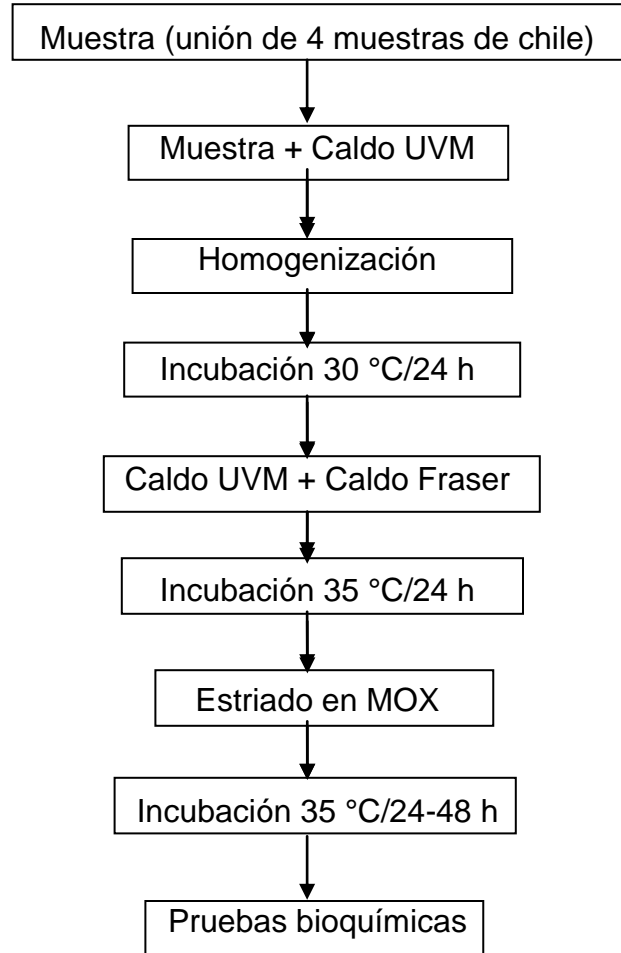


Figura 17. Aislamiento de *L. monocytogenes* en pimiento morrón de invernadero.

#### V.2.2.3.5 Identificación de *Salmonella* y *L. monocytogenes* mediante PCR

Las colonias aisladas presuntivas de acuerdo a las pruebas bioquímicas para *Salmonella* y *L. monocytogenes* fueron activadas en CST a 35 °C/24 h. Transcurrido el tiempo se tomó un mililitro del cultivo y se centrifugó a 4500g durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla restante se resuspendió con 1 mL de agua estéril y se calentó en un baño de agua a 100 °C durante 20 minutos para lisar las células.

Se tomó 1  $\mu$ L de cultivo lisado para amplificar empleando la mezcla de reacción Platinum supermix, iniciadores específicos para cada microorganismo (1.25  $\mu$ M para *Salmonella* y 1  $\mu$ M para *L. monocytogenes*) en un volumen final de 20  $\mu$ L. 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 del ADN en el termociclador se muestran en los Cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Condiciones de amplificación para *Salmonella* (Liu y col., 2002).

	Condiciones	Iniciadores	Secuencia	# De Bases
Desnaturalización	93°C/5 min	InvA 1  InvA 2	CTGTTGAACAACCCATTTG T  CGGATCTCATTAATCAACA AT	20
Amplificación de 30 ciclos	93°C/10 seg 42°C/10 seg 72°C/45 seg			
Extensión final	72°C/10 min			

Cuadro 4. Condiciones de amplificación para *L. monocytogenes* (Aznar y Alarcón, 2002).

	Condiciones	Indicadores	Secuencia	#De Bases
Desnaturalización	94°C/5 min	LM1	CCTAAGACG CCA ATG GA A	18
Amplificación 30 ciclos	94°C/1 min 50°C/1 min 72°C/5 min			
Extensión final	72°C/10 min			

Finalizado el tiempo se tomaron 3.5  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se mezclaron con 1  $\mu\text{L}$  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 observó la imagen del gel en un transiluminador UV.

V.2.3 Evaluación de la eficacia de diversos tratamientos de desinfección en la inactivación *Salmonella* y *E. coli* en Chile pimiento morrón

V.2.3.1 Activación de las cepas de *Salmonella* spp y *E. coli*

A tubos de 3 mL de CSTR (200 ppm) se le agregaron 30  $\mu\text{L}$  de cada cepa por separado. Cada tubo fue incubado a 35°C durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo se hizo un pase tomando 30  $\mu\text{L}$  de cultivo de cada tubo y se pasaron a tubos nuevos con CSTR (200 ppm). Cada tubo fue incubado a 35°C durante 24 hrs.

V.2.3.2 Preparación del inóculo

De cada cepa activada por separado se tomaron 4 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante fue desechado y la pastilla restante se resuspendió en 4 mL de solución salina al 0.85%. Se hizo un recuento del inóculo en agar ASTR (200 ppm) mediante la técnica de extensión por superficie haciendo las respectivas diluciones decimales. Las placas se incubaron a 35 °C por 48 hrs.

V.2.3.3 Inoculación

Los chiles pimiento morrón fueron inoculados con aproximadamente  $10^8$  UFC/chile de la suspensión celular de *Salmonella* spp. y *E. coli*, cada uno por separado. El

inóculo se aplicó en 10 gotas de 10  $\mu$ L en la superficie del chile. Se dejaron secar en una campana de flujo laminar durante 20 minutos.

#### V.2.3.4 Aplicación de tratamientos de desinfección

El día del experimento se prepararon las soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio (200 ppm), ácido peracético (80 ppm) y nobac citrus<sup>®</sup> (10%). La concentración de las soluciones se verificó empleando la metodología descrita en los anexos A y B. Las soluciones se distribuyeron (50 mL) en bolsas de polietileno. Se incluyó agua como control de arrastre.

Los chiles ya inoculados y secos se sumergieron en las soluciones desinfectantes y en agua durante 5 minutos. Finalizado el tiempo de contacto los chiles se removieron de las soluciones germicidas y se colocaron en otra bolsa que contenía 50 mL de caldo neutralizante.

#### V.2.3.5 Recuento

Se realizó un recuento de cada chile antes del secado, después del secado y después de aplicar el tratamiento con cloro, ácido peracético, Nobac citrus y agua, así como en los controles negativos (chiles no inoculados).

Para llevar a cabo el recuento, cada chile se colocó en una bolsa de polietileno, a la cual se le adicionaron 50 mL de neutralizante y se frotó vigorosamente con la mano durante 1 minuto. Posteriormente se hicieron las respectivas diluciones decimales, y se llevó a cabo el recuento en ASTR mediante la técnica de extensión por superficie. Las placas fueron incubadas a 35 °C por 48 h. Finalmente, se hizo un conteo de colonias con ayuda de un cuenta colonias (Figura 17).

### V.3. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones.

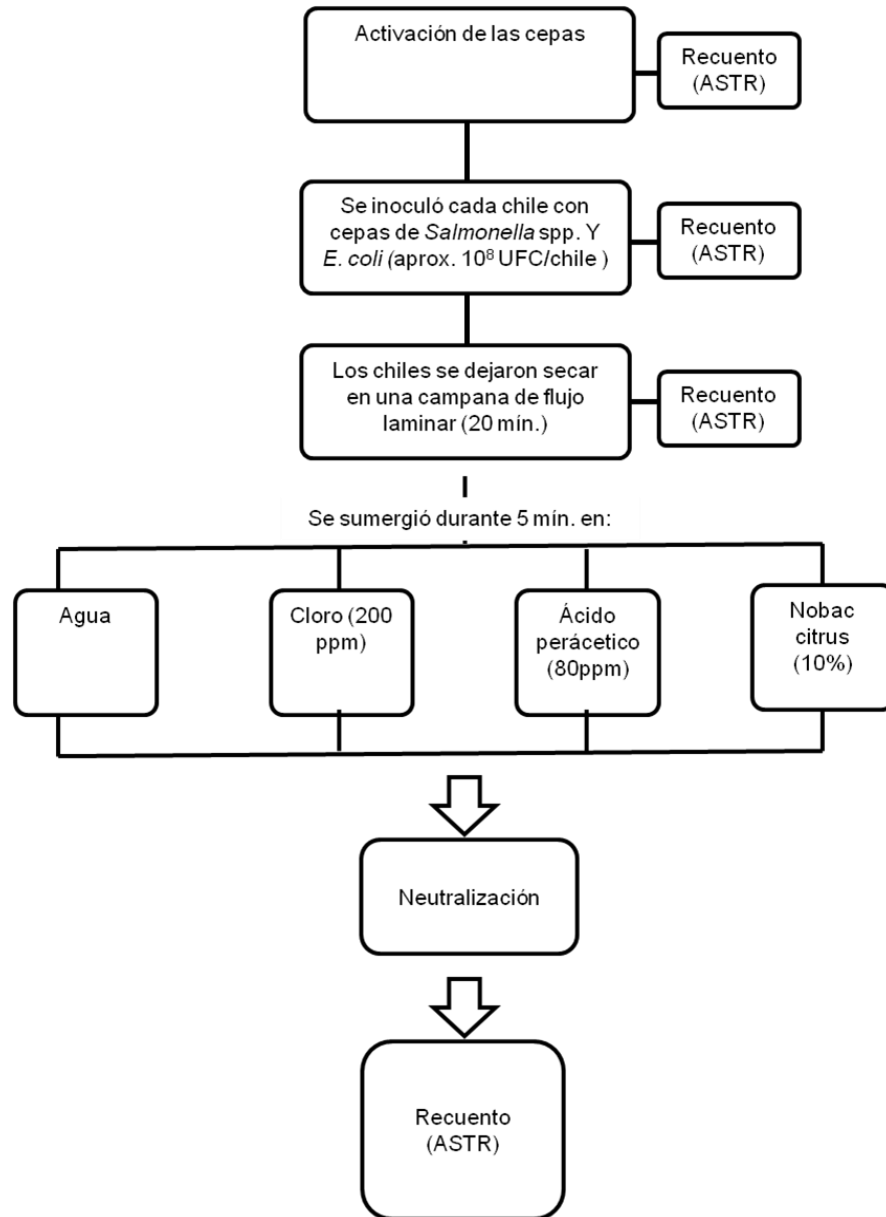


Figura 18. Diagrama de flujo de pruebas de desinfección con diferentes germicidas aplicados en los chiles pimienta morrón.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Cuantificación de microorganismos indicadores en chiles pimiento morrón y materiales obtenidos a lo largo de su producción

Con la finalidad de conocer el perfil microbiológico de chiles pimiento morrón y de los materiales asociados a su cultivo, se llevó a cabo un muestreo completamente al asar en el invernadero durante cuatro meses, donde se visitaba la empresa semanalmente para la toma de muestras.

Cuadro 5. Número de muestras recolectadas en el invernadero productor de chile pimiento morrón.

Muestras	Número de muestras analizadas
Chile pimiento morrón	250
Fibra de coco usada	4
Agua osmosis	10
Agua de tanque recolector	6
Solución hidropónica antes del tratamiento UV	11
Solución hidropónica después del tratamiento UV	8
Solución hidropónica en uso	15
Cuchillos	20
Vagones	20
Bandas transportadoras	90
Aire invernadero	80
Aire cámara fría	60
Total	574



La toma de muestras se llevó a cabo utilizando material estéril y guantes para evitar la contaminación de las muestras. Se tomaron muestras de superficies tales como cuchillos, vagones y bandas transportadoras (bandas de empaque, de recepción, de elevación y de selección), de aire (tanto del invernadero como de la cámara fría donde se almacenan los pimientos ya empacados), de fibra de coco usada que es donde se encuentran las plantas de chiles pimientos morrón plantadas y de las soluciones hidropónicas en distintas etapas de circulación, así como del agua que se utiliza para la preparación de estas soluciones. Teniendo finalmente un total de 574 muestras analizadas, tal como se muestra en el Cuadro 5.

De esta manera se pudo conocer como se distribuye y en que cantidades se encuentran microorganismos indicadores de interés en este estudio.

Como se mencionó se determinó la presencia de BMA, OCT y H/L en 250 muestras de pimiento morrón, de las cuales 125 muestras fueron de chiles obtenidos directamente del invernadero y 125 muestras de chiles almacenados en la cámara fría.

En la Figura 19 se muestra las medianas de BMA, OCT y H/L en chile pimiento morrón tanto de invernadero como el almacenado, donde se puede observar que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre el chile de invernadero y el chile ya almacenado. Para la creación de las gráficas se tomó la mediana, ya que esta es una medida de posición central de un conjunto de datos ordenados de menor a mayor que permite apreciar mejor las tendencias (Pérez, 2010).

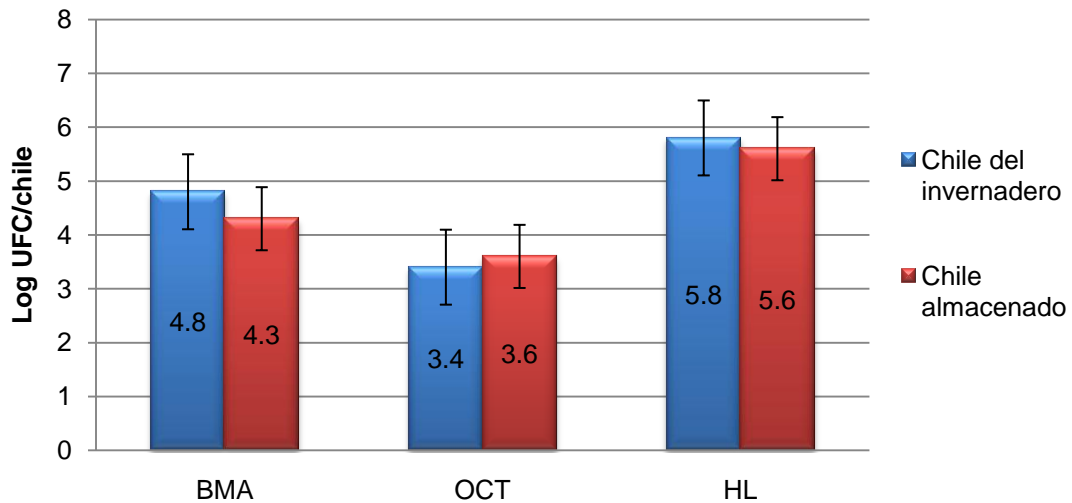


Figura 19. Contenido de BMA, OCT y H/L en chile del invernadero y almacenado en cámara fría.

Por otra parte, se analizaron superficies y fibra de coco, ya que múltiples microorganismos llegan a albergarse en este tipo de lugares, los cuales pueden contaminar a los chiles pimiento morrón cuando están en contacto con ellos.

Se tuvo un total de 134 muestras analizadas en esta parte. A tales muestras se les determinó BMA, OCT y H/L, con la finalidad de conocer las condiciones de higiene del proceso, así como la efectividad de los métodos de limpieza y desinfección llevados a cabo en el invernadero (Figura 20).

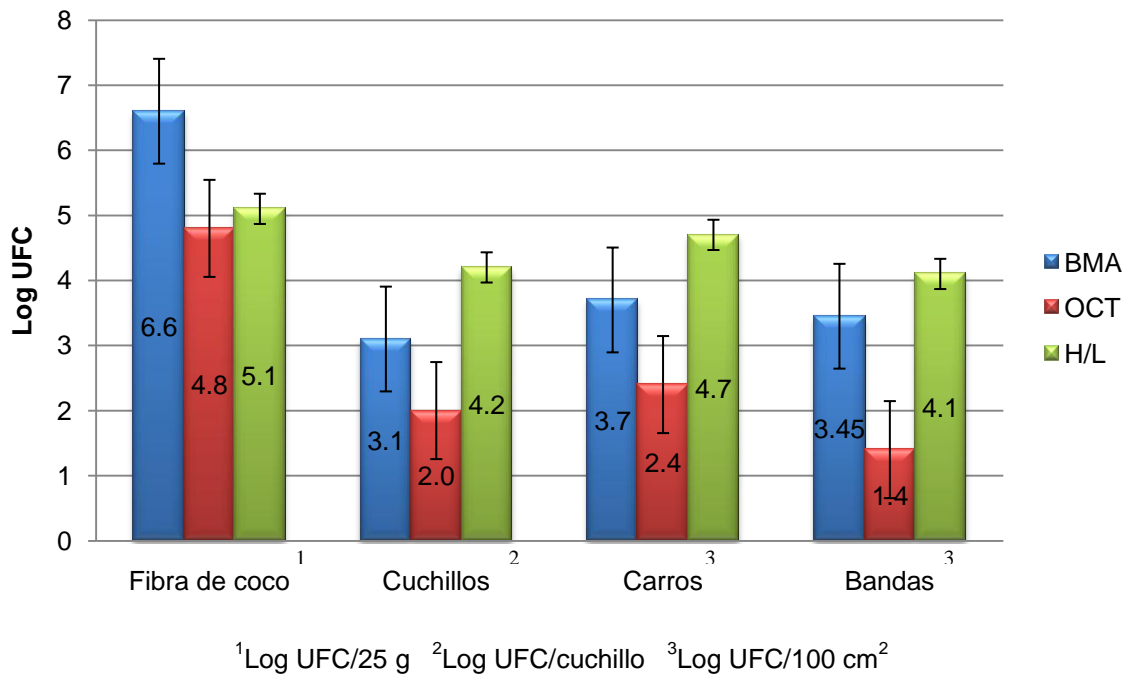


Figura 20. Contenido de BMA, OCT y H/L en fibra de coco y superficies.

### VI.1.1 Incidencia de BMA y H/L en aire

Entendido por aire la atmósfera gaseosa que nos rodea, es posible demostrar en él microorganismos asociados a la actividad humana, o procedentes de la tierra y otros materiales. Las turbulencias naturales en la atmósfera cargan al aire de microorganismos cuya naturaleza está determinada por los materiales que existen en las áreas involucradas. En los actos de toser, estornudar y frecuentemente de hablar, se descargan microorganismos al ambiente, los cuales se dispersan y a la postre sedimentan, sobre los alimentos y equipo de procesamiento (Fernández-Escartín, 2008). Por esto mismo, fue de suma importancia el monitoreo de la calidad microbiológica del aire. Para esto se analizó BMA y H/L (Figura 21) en muestras de aire tomadas en los pasillos de los invernaderos (80 muestras) y en la cámara fría (60 muestras) donde se almacenaban los pimientos ya empacados. Los resultados se observan en la Figura 22.

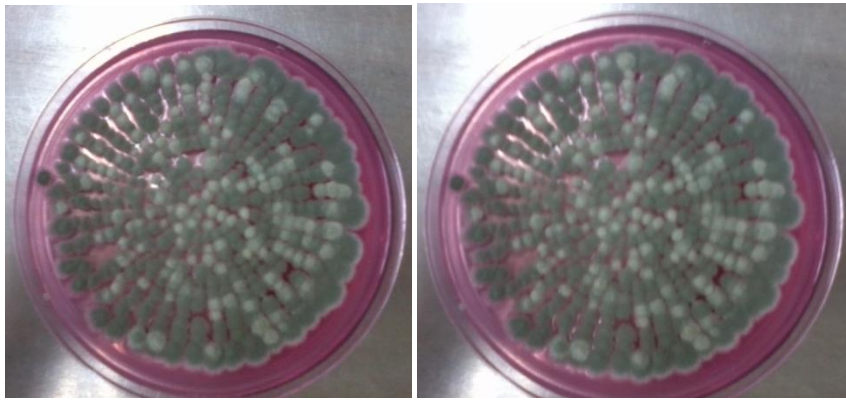


Figura 21. Hongos y levaduras obtenidos de muestras de aire.

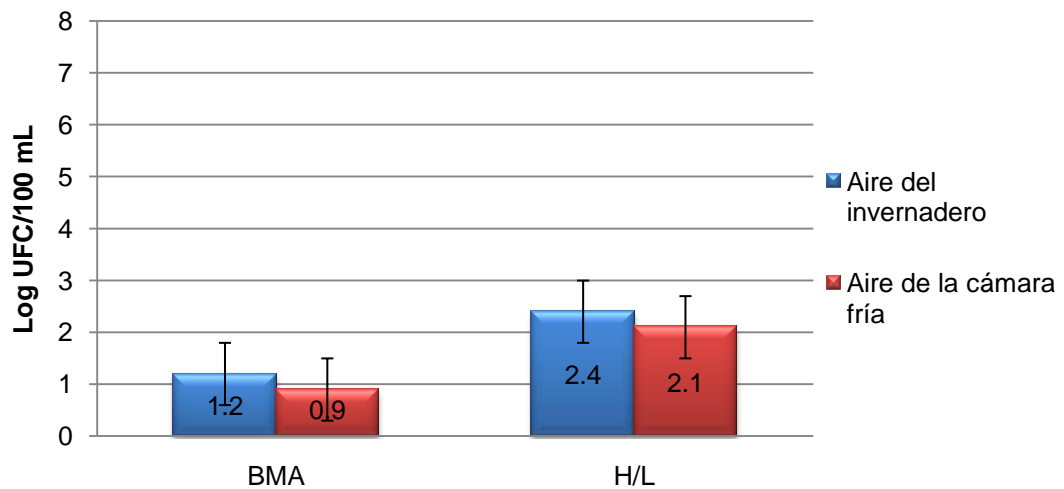


Figura 22. Contenido de BMA y H/L de muestras de aire. Los valores representan la mediana.

### VI.1.2 Incidencia de OCT y *E. coli* en agua y solución hidropónica

Como ya se mencionó anteriormente, el invernadero en donde se cultiva el chile pimiento morrón utiliza el método de hidroponía, la cual es una técnica agrícola en la que se cultiva sin suelo (este es reemplazado por un sustrato inerte) y donde los

elementos nutritivos son entregados en una solución líquida cargada de ellos (FAO, 2003).

Las soluciones hidropónicas se preparan a partir de agua obtenida de un pozo profundo, la cual es pasada por un tratamiento de ósmosis inversa y almacenada en contenedores ubicados en la parte externa del invernadero. El agua tratada con ósmosis es combinada con soluciones hidropónicas recicladas y se les agrega la cantidad respectiva de sales para la preparación final de la solución. Las soluciones recicladas son aquellas que se recuperan de los invernaderos, ya que al regar las plantas del chile pimiento morrón se recolecta la solución hidropónica por medio de tuberías que la conducen nuevamente al área de mezclado donde antes de combinarse para la preparación de nuevas soluciones son tratadas con luz ultravioleta (UV). Al tener la solución final, es transportada a través de tuberías hacia los invernaderos, y mediante mangueras con goteros incrustados en la fibra de coco se riegan las plantas del chile pimiento morrón.

Para el análisis microbiológico de la solución hidropónica se tomaron muestras de la solución hidropónica en el invernadero (15), del agua tratada con ósmosis (10), de las soluciones del tanque recolector (6), de las soluciones hidropónicas recicladas antes del tratamiento de UV (pre-UV) (11) y después del tratamiento de UV (post-UV) (8). Los resultados del contenido de BMA se muestran en la Figura 23.

Para la cuantificación de CF, CT y *E. coli* se utilizó el método de número más probable (NMP). Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 6.

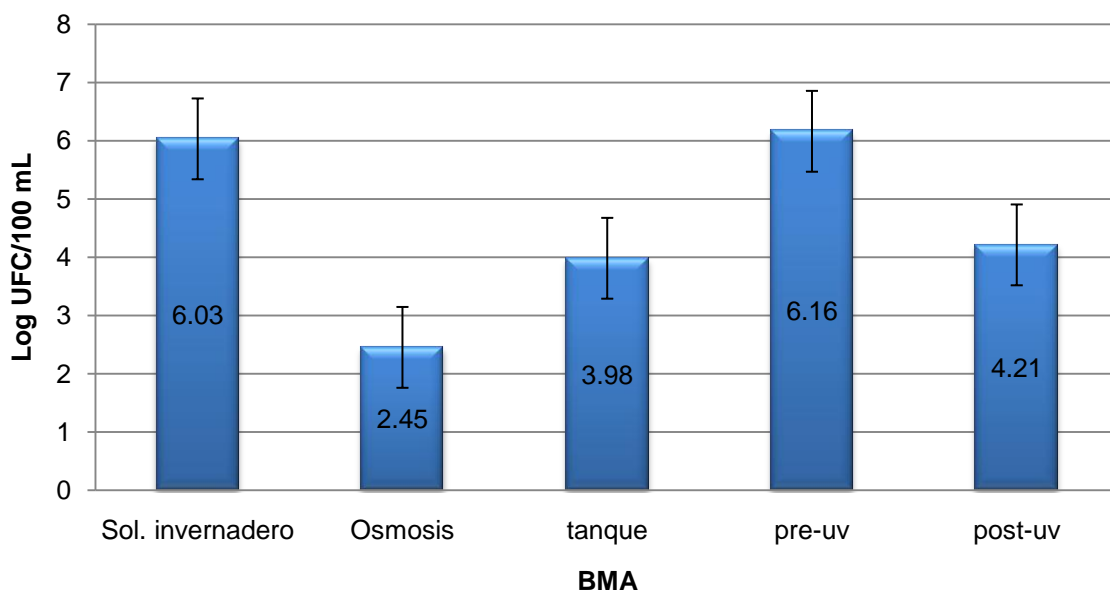


Figura 23. Contenido de BMA de muestras de agua y soluciones hidropónicas.

Cuadro 6. Coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), incidencia y cuantificación de *E. coli* en agua y soluciones hidropónicas del invernadero productor de pimiento morrón.

	CT	CF	<i>E. coli</i>	
	NMP/100ml			+N(%) <sup>1</sup>
Agua tratada con osmosis	2 (2-9) <sup>2</sup>	<2	<2	0/10 (0)
Solución del tanque recolector	7 (2-200)	<2	<2	0/6 (0)
Solución hidropónica antes del UV	200 (21-200)	<2	4 (2- 40)	9/11 (81.8)
Solución hidropónica después del UV	2 (2-2)	4 (2- 40)	<2	1/8 (12.5)
Solución hidropónica en uso	130 (2- 200)	2 (2 -12)	2 (2 -12)	13/15 (86.7)
Total	-	-	-	50

<sup>1</sup> Muestras positivas/número de muestras analizadas (porcentaje de positividad)

<sup>2</sup> Límites

VI.2 Incidencia de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes* en chile pimienta morrón y materiales asociados a su cultivo.

A las muestras analizadas anteriormente (con excepción de las soluciones hidropónicas y el agua) se les determinó la incidencia de las siguientes bacterias: *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes*. En el caso de *E. coli* se utilizó la técnica de NMP y en el caso de *Salmonella* y *Listeria* se llevaron a cabo mediante las técnicas tradicionales, donde se utilizaron controles positivos (Figura 24 y Figura 25 respectivamente) para la detección de posibles colonias sospechosas de *Salmonella* y *Listeria* en las muestras. Los valores obtenidos fueron 11 y 6.5% de positividad de *E. coli* y *Salmonella* respectivamente, en chile pimienta morrón y 6.7% de positividad de *Listeria* en bandas transportadoras.

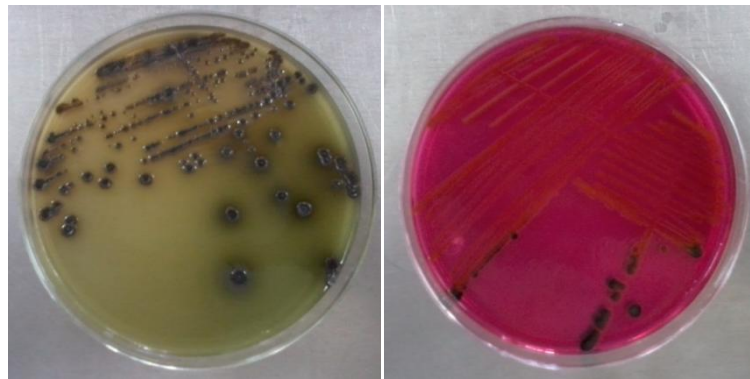


Figura 24. Cultivos de *Salmonella* en placas de XLD y sulfito bismuto.

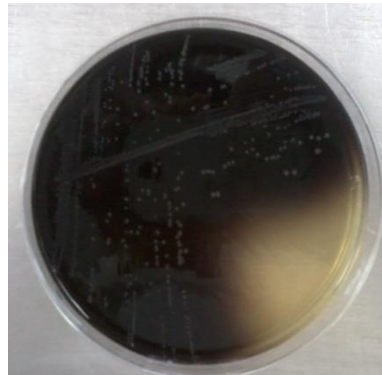
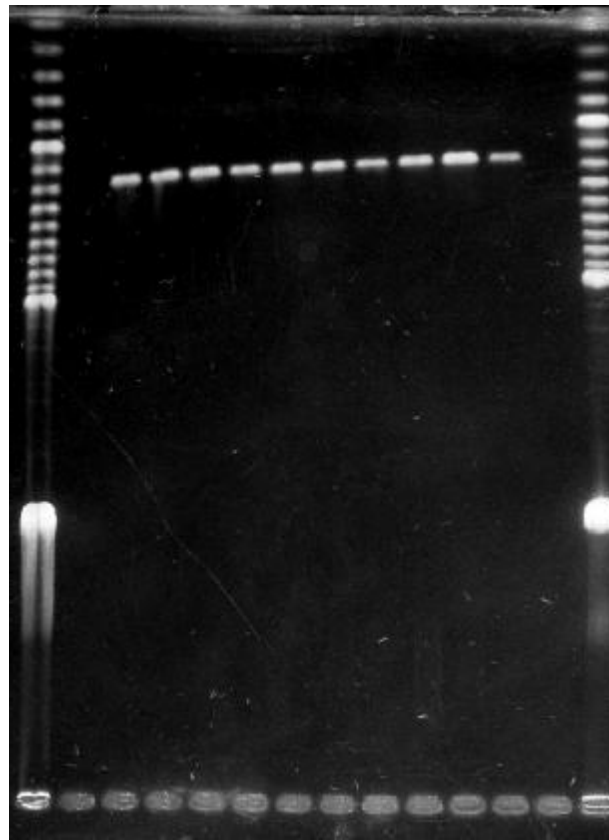


Figura 25. Cultivo de *Listeria* en placas de agar MOX.

En el caso de *Salmonella* y el género *Listeria* las colonias sospechosas que dieron positividad a las pruebas bioquímicas fueron confirmadas mediante PCR como se observa en la Figura 26.



MP A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 A MP

Figura 26. Confirmación de cepas de *Salmonella* mediante PCR. Marcador de peso molecular de 50 pb (MP). Control negativo (A). Control positivo *Salmonella Typhimurium* (B) Cepas aisladas de pimiento morrón (1-9).

El resultado de la incidencia de cada bacteria se muestra a continuación en el Cuadro 7, observándose el número de muestras positivas de cada bacteria en cada material, y la cuantificación de *E. coli* en los chiles pimiento morrón.



Cuadro 7. Incidencia de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes* en Chile pimiento morrón de invernadero y materiales asociados a su cultivo y empaçado.

	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	+/N (%) <sup>1</sup>	NMP/unidad	+/N (%)	+/N (%)	+/N (%)
Pimiento morrón	27/250 (11)	2(1.7-28) <sup>2</sup>	4/62 (6.5)	0/62 (0)	0/62 (0)
Cuchillos	0/20 (0)	-	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)
Vagones	0/20 (0)	-	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)
Fibra de coco	0/4 (0)	-	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)
Bandas transportadoras	0/45 (0)	-	0/45 (0)	3/45 (6.7)	0/45 (0)
<b>Total</b>	27/339 (7.9)	-	4/151 (2.6)	3/151 (1.98)	0/151 (0)

<sup>1</sup>Muestras positivas/ número de muestras analizadas (porcentaje de positividad)

<sup>2</sup>Límites

### VI.3 Eficiencia de diversos tratamientos de desinfección en la inactivación de *Salmonella* y *E. coli* en Chile pimiento morrón

Con el fin de conocer el germicida con mayor capacidad desinfectante en los chiles pimiento morrón, se utilizó agua, nobac citrus<sup>®</sup>, cloro y ácido peracético para desinfectar pimientos previamente inoculados con *Salmonella* spp y *Escherichia coli*. Se hizo un recuento de los logaritmos de las UFC de cada bacteria antes del secado, después del secado y posterior a la desinfección, utilizando como controles negativos chiles pimiento morrón sin inocular. Cada prueba se realizó por triplicado con dos repeticiones.

En la Figura 27 se observan los log UFC de *Salmonella* y *E. coli* en el inóculo, en los chiles antes del secado y en los chiles después del secado en la campana de flujo laminar, para de esta manera observar el impacto de cada paso en la población de cada bacteria.

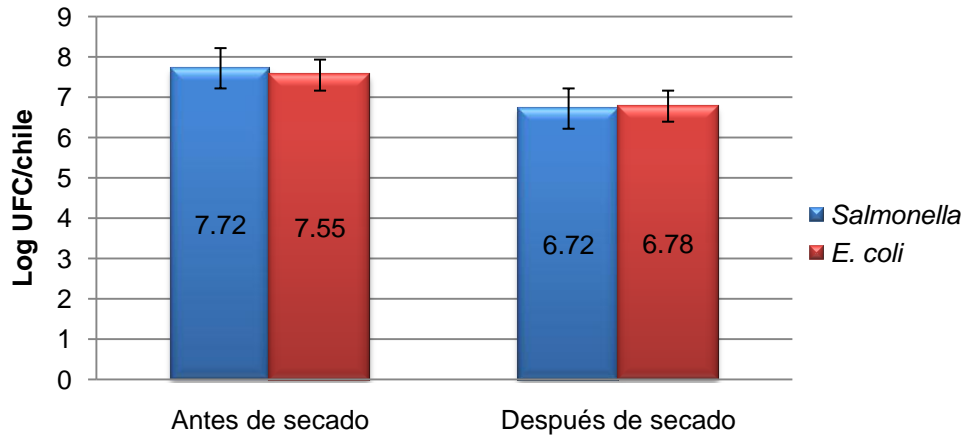


Figura 27. Log UFC/chile inicialmente inoculados y después del secado.

A los logaritmos de UFC/chile obtenidos después del secado se les restó los logaritmos de UFC/chile después de la desinfección de cada chile pimiento morrón para de esta manera conocer las reducciones alcanzadas con de cada desinfectante (Figura 28).

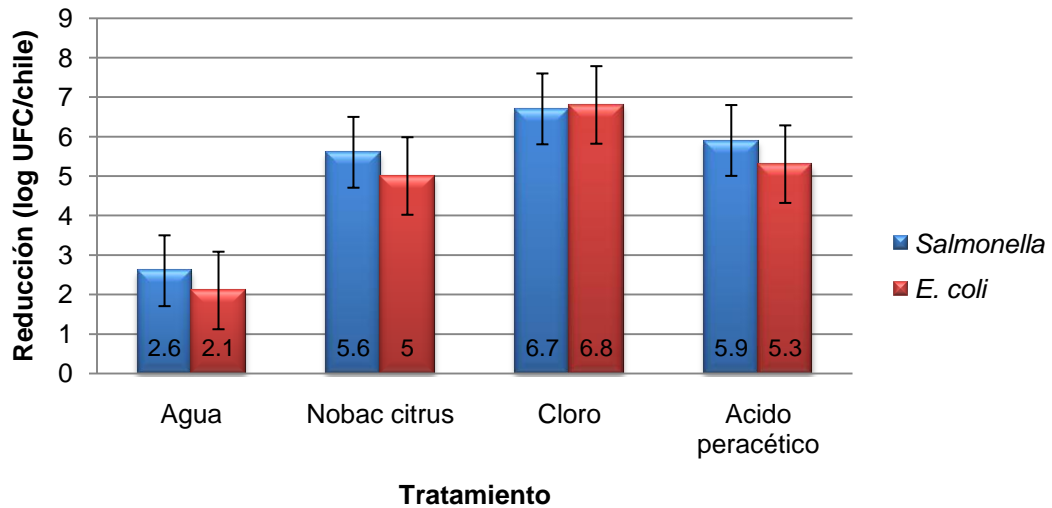


Figura 28. Reducción de *Salmonella* spp. y *E. coli* tras la aplicación de los tratamientos.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### VII.1 Cuantificación de microorganismos indicadores en chiles pimiento morrón y materiales obtenidos a lo largo de su producción

Los resultados obtenidos son de gran importancia para conocer la calidad microbiológica de los productos y de los materiales asociados a su producción. Esta información es útil para detectar los puntos en que los chiles podrían contaminarse con microorganismos patógenos. Finalmente, al conocer estas fuentes de contaminación se podrán tomar medidas correctivas para controlar los peligros.

En cuanto al nivel de microorganismo indicadores en pimiento morrón (Figura 19) no existe una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre pimiento morrón de invernadero y pimiento morrón empacado y almacenado. En general, en el chile, el contenido de hongos y levaduras fue mayor al de BMA oscilando ambas poblaciones entre 5 y 4.8 log UFC/chile, respectivamente. Estos niveles de BMA obtenidos son bajos en comparación a un estudio realizado con zanahorias por Pérez (2010) en donde se presentan niveles de 7.9 log UFC/zanahoria. Los cuales resultan lógicos, ya que los chiles se encuentran unidos a la planta por lo que no tienen contacto con el suelo, en cambio las zanahorias están en contacto directo con el suelo lo que facilita su contaminación.

Las cargas microbianas más bajas se observan en OCT con valores de 3.4 log UFC/chile de pimiento de invernadero y 3.6 log UFC/chile de pimiento empacado. En comparación con los resultados obtenidos por Orozco y col. (2008), estos valores son altos, ya que ellos obtuvieron 0.5 log UFC/fruta al analizar OCT en jitomates de invernadero hidropónico.

Estos estudios se realizaron en el periodo de febrero-mayo 2010, los cuales al ser comparados con un trabajo previamente realizado en la misma empresa por Ávila (2010), se hace notar que los valores de las poblaciones de los grupos indicadores son mayores en la temporada de septiembre-diciembre 2009 que en la época de febrero-mayo 2009 y a su vez los niveles de las poblaciones de los grupos indicadores de la temporada de septiembre-diciembre 2009 son menores a aquellos encontrados en mayo de 2009. Esta disminución en las cargas microbianas puede tener relación con el uso de fungicidas (en el caso específico de H/L), así como con la desinfección periódica de las bandas transportadoras que la empresa fue implementando con el paso del tiempo.

La carga microbiana de hongos y levaduras para algunas hortalizas analizadas en el estado de Chihuahua fue de 1967 UFC/g para chile chilaca, 1025 UFC/g para chile jalapeño y 1740 UFC/g para tomate saladeti (Ávila-Quezada y col., 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo (5.8 y 5.6 log UFC/chile en pimiento de invernadero y pimiento almacenado, respectivamente), en comparación con los valores de Ávila-Quezada y col. (2008) son bajos.

Es evidente que se deben mantener altos los estándares de limpieza e higiene durante el transporte y almacenamiento para este tipo de hortalizas para evitar la presencia de microorganismos patógenos. Ello es de suma importancia ya que estos productos mínimamente procesados se consumen crudos sin tratamiento térmico alguno (Odumeru y col., 1997).

Por otra parte, el análisis de las superficies arrojaron valores de BMA de 3.7 y 3.45 log UFC/100 cm<sup>2</sup> de para carros y bandas respectivamente, así como valores de 4.7 y 4.1 log UFC/100 cm<sup>2</sup> para H/L. Estos niveles de BMA comparados nuevamente con el estudio de zanahorias que realizó Pérez en el 2010 son bajos, ya que en las superficies que intervienen en el proceso de las zanahorias se obtienen valores desde 5.4 a 8.2 log UFC/cm<sup>2</sup>.

De acuerdo a los valores marcados por la NOM-093-SSA1-1994 la carga microbiana de BMA y OCT de las superficies inertes (Tabla 20) se encuentra en valores permisibles, lo que nos hace pensar que el proceso de desinfección de la maquinaria e instrumentos se lleva a cabo de manera correcta. Este hecho es un punto importante, ya que de acuerdo a Aarnisalo y col. (2006) en las empresas donde se procesan alimentos se presentan problemas de higiene en los equipos de procesamiento, debido a que su diseño no facilita la limpieza y existe el riesgo que los microorganismos se quedan adheridos a las superficies y pueden sobrevivir, contaminando los productos para consumo humano al estar en contacto con ellos.

Comparando los resultados de la carga microbiológica de las superficies, con el estudio previamente realizado por Ávila (2010) se marca una disminución en estos valores en el periodo de febrero-mayo 2010 en comparación con el periodo de septiembre-diciembre 2009. Estas diferencias pueden atribuirse a que la empresa mejoró las medidas de limpieza rutinaria como la desinfección periódica de las bandas transportadoras con sales cuaternarias de amonio. Las cuales de acuerdo a Ávila (2010) tuvo un efecto en el contenido de OCT, y en menor medida en la cuenta de hongos. En estos últimos las poblaciones prácticamente permanecieron sin cambio en los diferentes periodos. Todas estas modificaciones a los procesos de saneamiento que se realizaron en la empresa tuvieron como finalidad cumplir con los estándares establecidos por los organismos certificadores para lograr la exportación de frutas y hortalizas a Europa.

En el caso de la fibra de coco se observaron cargas microbianas superiores a la de superficies con valores de 6.6, 4.8 y 5.1 log UFC/25 g de fibra de coco de BMA, OCT y H/L respectivamente (Figura 20). Aunque altos, estos valores podrían considerarse normales dada la naturaleza de la fibra de coco.

Hay que hacer notar que la empresa cuenta con medidas de higiene de los trabajadores para evitar la contaminación del producto en este caso el pimiento morrón. Entre tales medidas destacan el uso obligatorio de gel desinfectante para manos, el desinfectado de zapatos a la entrada de los invernaderos usando tapetes con soluciones desinfectantes y el uso obligatorio de cofias. A pesar de esto se debe de capacitar a los trabajadores de acuerdo a la NOM-120-SSA1-1994 para que presenten una higiene personal que evite la contaminación del producto mediante el lavado constante de manos, así como su desinfección, usar ropa limpia, cubre bocas, evitar toser y estornudar sobre el producto, entre otros.

Las principales fuentes de contaminación aérea en el interior de las plantas procesadoras de alimentos proceden de la atmósfera natural o de los sistemas de ventilación, del aire condicionado, de la actividad de los trabajadores y de las gotas de agua dispersadas durante la aplicación de pistolas a presión al sanear el equipo.

Un estudio realizado por De la Rosa y col. (2000) reportó valores promedio de 13 ufc/mL de bacterias y 1.1 ufc/mL de H/L en una zona de envasado de una industria farmacéutica. De la Rosa y col. (2000) determinaron niveles de alerta y de acción de bacterias y H/L en el aire (100 ufc/mL de bacterias y 200 ufc/mL de H/L) teniendo en cuenta los criterios de las Normas de Correcta Fabricación para zonas limpias de España y las recomendaciones de AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria). De acuerdo a los resultados obtenidos y en comparación con los estudios De la Rosa y col. (2000), la calidad microbiológica del aire presente tanto en el invernadero como en la cámara de refrigeración donde se almacena el pimiento morrón ya empacado es aceptable.

Respecto a la calidad microbiológica de la solución hidropónica y el agua utilizada en la empresa productora de pimiento morrón se observa que los valores más altos de BMA los tiene la solución hidropónica reciclada proveniente del invernadero (6.16 log UFC/100 mL), la cual al ser mezclada con solución nueva pasa por un

tratamiento de luz ultravioleta disminuyendo casi dos logaritmos de la población de BMA (4.21 log UFC/100 mL), ya que la luz ultravioleta tiene un poder de penetración muy baja eliminando la población microbiana solo de la parte de la superficie de la solución hidropónica. La carga microbiana de la solución hidropónica que llega hasta la planta por los goteros (6.03 log UFC/100 mL) es ligeramente menor a la carga microbiológica de la solución hidropónica reciclada antes del tratamiento con UV. Pero de acuerdo a los valores obtenidos del agua del tanque y del agua tratada con ósmosis que son bajos existe un aumento de estos niveles en la solución hidropónica ya presente en el invernadero, lo que nos sugeriría que existe un punto de contaminación en la preparación de las soluciones antes de ser enviadas al invernadero.

De acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994 los niveles de CT para el agua tratada con ósmosis (2 NMP/100 mL) y para la solución tratada con luz UV (2 NMP/100 mL) se encuentran aceptables, mientras que la solución del tanque recolector (7 NMP/100 mL), la solución hidropónica reciclada proveniente del invernadero (200 NMP/100 mL) y la solución hidropónica del invernadero (130 NMP/100 mL) sobrepasan los niveles. Por otra parte, de acuerdo a la misma norma los valores de CF para el agua tratada con ósmosis, la solución del tanque recolector y la solución hidropónica antes del UV son aceptables, mientras los niveles para la solución hidropónica en uso no son aceptables ya que sobrepasan los niveles marcados.

En un estudio realizado por Ávila-Quezada y col. (2008) se obtuvo un valor de 14.9 NMP/mL para CT y un valor de 14.7 NMP/mL para CF en el agua de riego de frutas y hortalizas; valores que sobrepasan los niveles obtenidos en este estudio.

En las normas mexicanas no se considera a *E. coli* para evaluar la calidad higiénica o sanitaria de las frutas y hortalizas. Pero su presencia en niveles altos sugiere una contaminación fecal, ya que su hábitat natural primario es el tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente (Pérez, 2010). En este estudio se cuantificó

y se analizó la incidencia de *E. coli* en las soluciones y en el agua, teniendo como resultado una mayor incidencia de *E. coli* en la solución hidropónica encontrándose en el 86.7% de las muestras analizadas, seguido por la solución hidropónica antes del tratamiento con UV con una positividad de 81.8% y finalmente la solución hidropónica después del tratamiento de luz UV con un valor del 12.5%. Se observa una marcada disminución en el porcentaje de incidencia de *E. coli* con el tratamiento con luz UV.

#### VII.2 Incidencia de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes*

Los resultados obtenidos en el análisis de la incidencia de *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *L. monocytogenes* se presentan en el Cuadro 7. Donde se muestra que las superficies (cuchillos, vagones y bandas transportadoras) y la fibra de coco presentan una incidencia del 0% para todos los microorganismos analizados, con excepción de las bandas transportadoras que presentaron una incidencia de *Listeria* del 6.5%. En el trabajo realizado por Ávila (2010) se reportó una incidencia de *Salmonella* del 2% en bandas transportadoras, y en *Listeria* se tiene una incidencia del 5% en 54 muestras analizadas de bandas transportadoras, un número mayor a las analizadas en este trabajo.

En el caso del chile pimiento morrón, se obtuvo una cuantificación de *E. coli* de 2 NMP/chile y una incidencia del 11%, el cual resulta bajo en comparación al estudio de zanahorias por Pérez (2010) donde se reportó una incidencia del 89%.

En un estudio realizado por Ávila-Quezada y col. (2008) se analizaron muestras de chile chilaca, chile jalapeño, chile serrano, tomate saladeti, tomate grape y melón en busca de *Salmonella* spp. sin detectar alguna. También se cuantificó *E. coli* obteniendo solamente una muestra de chiles chilaca positiva con valores de 22 NMP/mL.



Hay que tener en cuenta que la presencia de un organismo indicador no necesariamente garantiza la presencia de un organismo patógeno (Banks and Board, 1983). Idealmente, la ausencia o la baja concentración de un indicador específico indican que el producto no ha sido expuesto a condiciones que permitieran su contaminación por un patógeno en especial o que presente la oportunidad de crecimiento (IFT, 2000).

El porcentaje de positividad de *Salmonella* spp. en Chile pimiento morrón fue de 6.5% en 62 muestras analizadas. Al comparar esta cifra con un valor de 23% de positividad de *Salmonella* en pimiento morrón colectado en un mercado presentado en un estudio realizado por Wells y Butterfield (1997), se observa que es un nivel bajo. Sin embargo, hay que considerar que *Salmonella* presenta una dosis infectante muy baja, es decir, que bastan tan solo pocas células para provocar un cuadro clínico, por lo tanto se debe tener sumo cuidado en el manejo de los productos para evitar una contaminación con esta bacteria.

### VII.3 Eficiencia de diversos tratamientos de desinfección en la inactivación de *Salmonella* y *E. coli* en Chile pimiento morrón

Los esfuerzos para minimizar la contaminación microbiana de las frutas y hortalizas inicia desde antes de su cultivo, pero desafortunadamente el control de patógenos en la producción agrícola frecuentemente es difícil; por lo que la desinfección de estos productos es básico antes de su consumo.

El inóculo utilizado para las pruebas de desinfección tuvo un valor promedio de 8.43 y 8.63 log UFC de *Salmonella* spp. y *E. coli* respectivamente. El cual al ser aplicado a los pimientos morrón se observó una disminución de casi 1 log UFC. Posteriormente, los pimientos se dejaron secar en campanas de flujo laminar lo que provocó otra disminución cercana a 1 log UFC en la población de cada bacteria.

Para ambos patógenos la reducción observada con los tres germicidas fue mayor a 5 log UFC, lo que los sitúa como buenos desinfectantes de acuerdo a lo establecido en la AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists), ya que refiere que un desinfectante eficaz es aquel que reduce el 99.999% (5 log UFC) de las poblaciones bacterianas sin alterar las características del producto ni comprometer la salud del consumidor (AOAC, 1995). A pesar que los tres desinfectantes actuaron de manera eficaz el hipoclorito de sodio fue el más efectivo con un valor de reducción de 6.7 log UFC, seguido por el ácido peracético con una reducción de 5.87 y 5.26 log UFC para *Salmonella* y *E. coli* respectivamente, y finalmente el nobac citrus<sup>®</sup> (ácidos orgánicos de semillas de cítricos) con una reducción de 5.6 log UFC de *Salmonella* y 5 log UFC de *E. coli* (Figura 27). En comparación con otros trabajos como el de Mazollier (1988) que estudió el efecto del cloro sobre los recuentos de BMA y coliformes termotolerantes durante el lavado de hojas verdes para ensaladas donde obtuvo una reducción en BMA del producto de 1.6 a 2.4 log UFC para concentraciones iniciales de cloro comprendidas entre 50 y 200 ppm y tiempos de contacto entre 5 y 20 min; la reducción en logaritmos obtenida en este trabajo fue notablemente mayor. Por otra parte, los investigadores Pao y Davis (1999) demostraron que la cantidad de *E. coli* inoculada en superficies de naranjas se reducía en 2 log/cm<sup>2</sup> luego de la inmersión en solución de 200 ppm de cloro por 8 minutos. Nuevamente se observa que los resultados que se obtuvieron en nuestro trabajo presentan una reducción mucho mayor en comparación con lo observado por Pao y Davis. Hay que tomar en cuenta que las superficies de los productos son diferentes y aparentemente el pimiento morrón es una superficie lisa que permite una mayor limpieza, mientras que la naranja presenta relieves donde es más difícil que las soluciones fluyan homogéneamente. Finalmente, los resultados obtenidos por Park y Beuchat (1999) concuerdan con lo obtenido en este trabajo, ya que al utilizar ácido peracético (40 y 80 ppm) redujeron significativamente la población de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en superficies de melón.

Los valores obtenidos en la reducción de *Salmonella* y *E. coli* con ácido peracético coinciden con los valores obtenidos en el estudio realizado por Rodger y col. (2004) quienes determinaron la eficacia del ácido peracético (80ppm) sobre *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, obteniéndose valores de disminución de aproximadamente 5 log UFC.

En el caso del agua se observa una reducción mayor de la esperada. Esta gran reducción de los patógenos con el agua se debe a que el chile pimiento morrón cuenta con una capa fina pero resistente llamada pericarpio (León, 2000), que además se encuentra cubierta de una capa de cera, lo que protege al producto de la entrada de microorganismos y facilita su desinfección. Por lo que es importante que los productos hortícolas sean manejados con cuidado para evitar rupturas en sus paredes que puedan favorecer el desarrollo de microorganismos tanto patógenos como deterioradores. El lavado con agua potable en ensayos de laboratorio redujo los recuentos microbiológicos en aproximadamente 0.4 a 1.4 log de UFC/g en rodajas de zanahorias, hojas de espinaca entera acondicionadas, pimientos cortados en pedazos, y en cubos de papa (Izumi, 1999); poco más de 1 log UFC en el número de *Pseudomonas* y enterobacterias psicrotrofas en lechuga (Mazzolier, 1998) y entre 0 y 0.5 log UFC los recuentos de microorganismos totales y enterobacterias en ensaladas listas para consumir (Nguyen-the y Carlin, 1994). Lo que nos hace concluir que, el efecto del arrastre mecánico debido a la aplicación de lavados con agua dependerá del producto, pero en todos los casos muestra un efecto limitado.

## VIII. CONCLUSIONES

Las condiciones del cultivo de pimiento morrón en términos generales de acuerdo a los resultados obtenidos son aceptables. *E. coli* y *Salmonella* no se detectaron en los materiales asociados a la producción de chile pimiento morrón en invernadero. Sin embargo, si se detectaron en el fruto mostrando una incidencia del 11 y 6.5 % para *E. coli* y *Salmonella*, respectivamente. Estos resultados evidencian que la contaminación de tipo fecal puede ocurrir eventualmente dentro de los invernaderos y probablemente pueda asociarse a los manipuladores ya que la recolección ocurre manualmente. Por lo tanto es de suma importancia implementar buenas prácticas de higiene en los trabajadores para evitar peligros que puedan afectar la salud del consumidor.

Los tres desinfectantes probados fueron efectivos para la reducción de *Salmonella* y *E. coli* alcanzando reducciones mayores a 5 log UFC. La naturaleza de la superficie del chile podría ser un factor que facilite la remoción o eliminación de los microorganismos.

La prevención de la contaminación con microorganismos patógenos a lo largo del cultivo del chile pimiento morrón podría lograrse implementando un tratamiento de desinfección al fruto previo a su empaque como medida que ayude a disminuir la incidencia de *Salmonella*.

Este trabajo aporta información relevante acerca del perfil microbiológico que ocurre durante el cultivo, cosecha y empaque del chile pimiento morrón.

## IX. BIBLIOGRAFÍA:

**Aarnisalo** K., Tallavaara K., Wirtanen G., Maijala R. and Raaska L. **2006**. The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food Control*. Vol. 17(12): 1001-1011.

**Acevedo**, L., Mendoza, C. y Oyon, R. **2001**. Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus* sp. y hongos en ensaladas para perros calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol. 51:3-6

**Ackers**, M., Mahon B.E., Leía E., Goode B., Damrow T., Hayes P.S., Viv W.F., Rice D.H., Barrett T.J., Hutwagner L., Griffin P.M. y Slutsker L.. **1998**. An outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of Infectious Diseases*. Vol. 177: 1588-1593.

**AOAC** (Association of Official Analytical Chemists). **1995**. AOAC official method 960.09. Germicidal and detergent action disinfectants, 16<sup>th</sup> ed. Chapter 6, Association of Official Analytical Chemists international, Gaithersburg, MD. 9-11.

**Ávila** D. **2010**. Identificación del hongo causante del deterioro poscosecha en pimiento morrón (*Capsicum annum* L.) y su influencia en el comportamiento de microorganismos patógenos en la superficie del fruto. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 48-62.

**Ávila-Quezada** G., Sánchez E., Muñoz E., Martínez L.R., Villalobos E. **2008**. Diagnostico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton (B. Aires)*. Vol.77: 129-136.

**Aznar**, R., y B. Alarcón. **2002**. On the Specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. *System. Appl. Microbiol.* Vol. 25: 109–119.

**Banks**, J.G. and Board, R.G. **1983**. The incidence and level of contamination of British fresh sausages and ingredients with salmonellas. *J. Hygiene*. Vol. 90: 213-223.

**Besser, R.E., Lett S., Weber J.T., Doyle M., Barrett T., Wells J. y Griffin P. 1993.** An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. JAMA. Vol. 269: 2217-2220.

**Beuchat, L.R.1996.** Patogenic microorganisms associated with fresh produce. J Food Prot. Vol. 59:204-216.

**Beuchat, L.R., Ryu, J. H. 1997.** Produce handling and processing practices. Emerging Infectious Diseases. Vol. 3: 4-5.

**Beuchat, L.R. 1999.** Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. J Food Prot. Vol. 62(8):845-850.

**Bianchini, F., Corbeta, F. 1974.** Frutos de la tierra. Editorial AEDOS. Italia. 94

**Blostein, J. 1993.** An outbreak of *Salmonella javiana* associated with consumption of watermelon. Journal of Environmental Health. Vol. 56: 29-31.

**Bringuier, S., Faurisson, M. y Mouilla, H. 2006.** Proyecto de exportación de tomate verde y chile jalapeño. SE (Secretaria de economía). [http://www.economia.gob.mx/swb/work/models/economia/Resource/968/1/images/RAPPORT\\_MIE.pdf](http://www.economia.gob.mx/swb/work/models/economia/Resource/968/1/images/RAPPORT_MIE.pdf). Enero 13 del 2011.

**Cook, K.A., Dobbs T.E., Hlady G., Wells J., Barrett T.J, Puhr N.D., Lancette G.A., Bodager D.W., Toth B.L., Genese C.A., Highsmith A.K., Pilot K.E., Finelli L. y Swerdlow D.L.. 1998.** Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. JAMA. Vol. 280: 1504-1509.

**CSPI (Center for Science in the Public Interest). 2006.** Newsroom. Disponible en: <http://www.cspinet.org/new/prodhark.html>. Fecha de consulta: 5/02/2011

**Cummings, K., Barrett E., Mohle-Boetani J.C., Brooks J.T., Farrar J., Hunt T., Fiore A., Komatsu K., Werner S.B. y Slutsker L. 2001.** A multistate outbreak of *Salmonella enteritica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. Emerging Infectious Diseases. Vol. 7: 1046-1048.

**De la Rosa, María D.C., Ullán C., Prieto M.P. y Mosso M.A. 2000.** Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica. Anal. Real Acad. Farm. Vol. 66: 5-7.

**Elias, A., Aguilar, A., Godoy, H., Andrade, E., Medina, M. y Hernández, D. 2010.** XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, México. 28, 05: 2-3.

**FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). **2006.** Ficha técnica del pimiento (*Capsicum annuum*). <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ae620s/Pfrescos/PIMIENTO.H> TM. Julio 16 del 2010.

**FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). **2003.** ¿Qué es la hidroponía? <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/aup/pdf/hidrosim/1.pdf>. Febrero 5 del 2011

**Fernández-Escartín, E. 2008.** Microbiología e inocuidad de los alimentos. 2da. Ed. Universidad de Querétaro. Querétaro, México. 757

**FDA** (Food and Drugs Administration). **2001.** Methods to reduce/ eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm090977.htm>. Enero 10 del 2011.

**Foegeding, M. y Busta, F. 1991.** Chemical food preservatives. En Block SS (ed). Disinfection, Sterilization and Preservation. Lea and Febiger. Philadelphia. 802-810.

**Garmendia, G. 2006.** Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Horticultua. Vol. 197: 18-23.

**Geldreich, E. and Bordner, H. 1970.** Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review. J. Milk Food Technol. Vol. 34:184-195.

**Giaconi, V. y Escaff, M. 2004.** Cultivo de hortalizas. 15va. Ed. Salesianos. Santiago de Chile. 244

**Greenberg, A.E., Clesceri L.S. and Eaton A.D. 1992.** Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 th Edition. American Public Health Association, Washington, D.C. 4-38

**Greenspan, F. and Mackellar. 1994.** FMC. Technical Bulletin 4, peracetic acid, 35%. Anal. Chem. Vol. 20: 1061.

**Hedberg**, W., MacDonald, L. and Osterholm, T. **1994**. Changing epidemiology of food-borne disease: A Minnesota perspective. Clin. Infect. Dis. Vol. 18: 671-682

**Hilborn**, E.D., Mermin J.H., Mshar P.A., Hadler J.L, Voetsch A., Wojtkunski C., Swartz M., Mshar R., Lambert F.M., Farrar J.A., Glynn M.K. y Slutsker L.. **1999**. A multistate outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. Archives of Internal Medicine. Vol. 159: 1758-1764.

**ICMSF**, International Commission on Microbiological Specifications for Food. **1985**. Ecología microbiana de los alimentos 2. Edit. ACRIBIA. España. 615-616.

**IFT** (Institute of Food Technologist). **2000**. Expert Report on Emerging Microbiological Food Safety Issues: Implication for control in the 21<sup>st</sup> century. Institute of Food Technologists, Chicago, Ill. J. Food Sci. Vol. 65(8): 40-41.

**Isaacs**, S., Aramini J., Ceibin B., Farrar J., Ahmed R., Middleton D., Howes M., Chan E., Chandran A.U., Harris L.J., Pichette S., Campbell K., Gupta A., Lior L.Y., Pearce M., Clark C., Rodgers F., Jameison F., Brophy I. y Ellis A. **2005**. An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella enteritidis*. Journal of Food Protection. Vol. 68: 191-198.

**Izumi H.** **1999**. Electrolyzed water as a disinfectant for freshcut vegetables. J. of Food Sci. Vol. 64:536-539.

**León, J.** **2000**. Botánica de los cultivos tropicales. 3era. Ed. Agroamérica del IICA. Costa Rica. 332-333

**Lin**, C.M., Moon S.S, Doyle M.P. y McWatters K.H. **2002**. Inactivation of *Escherichia coli* 0157 :H7, *Salmonella enteritica* serotype Enteritidis, and *Listeria monocitogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. Journal of Food Protection. Vol. 65: 1215-1220.

**Linares**, C. **2004**. [http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tierras/manuales/Cultivo\\_pimiento\\_morrón.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Cultivo_pimiento_morrón.pdf). Enero 8 del 2011.

**Liu**, T. **2002**. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. J. Food Prot. Vol. 65:1227-1234.



**MacGowan** A. P., Bowker K., McLauchlin J. y Bennett PM, Reeves DS. **1994**. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. *Int J Food Microbiol.* Vol. 21:325-34.

**Mahon**, B.E., Ponka A., Hall W., Komatsu K., Beuchat L., Shiflett S., Siitonen A., Cage G., Lambert M., Hayes P., Bean N., Griffin P. y Slutsker L. **1997**. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seed. *Journal of Infectious Diseases.* Vol. 175: 876-882.

**Maki**, D.G. **2009**. Coming to grips with foodborne infection- peanut butter,peppers, and nationwide *Salmonella* outbreaks. *N. Engl. J. Med.* Vol. 360(10):949-953.

**Mazollier** J. **1988**. IVe gamme. Lavage-désinfection des salades. *En: Infos-Ctifl Hors série "4e gamme"*. París, France: CTIFL, pp. 20-23.

**Nguyen-the** C, F Carlin. **1994**. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.* Vol. 34:371-401.

**Odumeru** J.A., Mitchell S.J., Alves D.M., Lynch J.A., Yee A.J.. Wang S.L. y col. **1997**. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetable for health-care food services. *J food Prot.* Vol. 60:954-960.

**Orozco**, L., Rico L., Fernández E. **2008**. Microbiological profile of greenhouses in a farm producing hydroponic tomatoes. *J food Prot.* Vol. 71: 63.

**Pao**, S. and Davis, C. L. **1999**. Enhancing microbiological safety of fresh orange juice by fruit immersion in hot water and chemical sanitizer. *Journal Food Protection.* Vol. 62: 759-760.

**Parish**, M.E., Beuchat L.R., Suslow T.V., Harris L.J., Garret E.H., Forbet J.N., Busta F.F. **2003**. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* Vol. 2: 162-163.

**Park** C. M. and Beuchat L. R. **1999**. Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. *Dairy Food Environ Sanit.* Vol. 19:842-7.

**Pelczar**, M. **1992**. *Microbiología.* 4ta. Ed. Mc-Graw-Hill. México. 391, 395.

**Pérez, D. 2010.** Incidencia de *Listeria monocytogenes* en zanahoria cruda y equipo en una planta procesadora. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico en Alimentos. 33.

**Pouch, F. 2001.** Compendium of methods for the microbiological examination of food .Fourth edition. Ed. American Public Health Association.239-330.

**Ries, A.A., Zasa S., Langkop C., Tauxe R.V. y Blake P.A. 1990.** A multistate outbreak of *Salmonella chester* linked to imported cantaloupe, Thirtieth Interscience conference of Antimicrob. Agents Chemother. American Society of Microbiology. Washington, DC. 238 p.

**Rodgers, S.L., Cash N.J., Siddiq M., Ryser E.T. 2004.** A comparison of different chemical sanitizer for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* in solution and in apple, lettuce, strawberries and cantaloupe. Journal of Food Protection. Vol. 67(4): 721-731.

**SAGARPA** (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). **2005.** Exporta México más de 416 mil toneladas de chile a países de América y Europa.<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2005/septiembre/Documents/B276.pdf> Fecha consultada: 9/01/2010

**SIAP** (Servicio de información agroalimentaria y pesquera). **2010.** Un panorama del cultivo del chile. <http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf> Fecha consultada: 8/07/2010.

**Swanson, M. J., Petran, L. and Hanlin H. 2001.** Most probable number technique Cap. 6 Culture method for enumeration of microorganism. In Pouch, F. ND Ito, K. 2001. Compendium of method for the microbiological examination of foods. 4<sup>th</sup> Ed. American Public Healt Association. Vol. 59-61

**Tamaro, D. 1974.** Manual de horticultura. Séptima Edición. Editorial Gustavo Gill. Barcelona, España. 10.

**Watkins J y Sleath K. P. 1981.** Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage sludge and river water. J Appl Bacteriol. Vol.50:1-9.

**Wells**, J.M., and Butterfield, J.E. **1997**. *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Dis.* Vol. 81:867-872.

**Wood**, R.C., Hedberg C. y White K. **1991**. A multistate outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes, In: 40th Annual conference, CDC Epidemic Intelligence Service, Dept. of Health and Human services, Public Health Service., Atlanta, U.S. 69.

**Wright**, J. R., Sumner, S. S., Hackney, C. R., Pierson, M. D., Zoecklein, B. W. **2000**. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on apples using wash and chemical sanitizer treatments. *Dairy Food Environment Sanitization.* Vol. 20:120-126.

## Anexo A

### 1. Valoración del cloro disponible (Greenberg y Col., 1992).

- Colocar 25 ml de la muestra
- Adicionar 10 ml de yoduro de potasio al 10% y 5 ml de ácido acético glacial, agitar
- Titular con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 M hasta aparición de color amarillo pálido.
- Adicionar 1 ml de solución de almidón al 1%, agitar
- Titular con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 M hasta desaparición de color azul

Cálculos:

$$\text{Cloro disponible (ppm)} = \frac{V_1 \times N_1 \times 3.55 \times 10^4}{m}$$

Donde:

V1 = Volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación (ml)

N1 = Normalidad del tiosulfato de sodio

m = Cantidad de muestra

## Anexo B

### 2. Valoración del ácido peracético (Greenspan y Mackellar, 1948)

Determinación del % de peróxido de hidrógeno

- Adicionar 10 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de ácido sulfúrico 1 N
- Agregar dos gotas de indicador de ferroína y mezclar
- Titular con tiosulfato cérico 0.1 N hasta que persista la desaparición del color naranja por un minuto. Registrar la lectura como punto de equivalencia.

Determinación del % de ácido peracético

- Después de alcanzar el punto de equivalencia mencionado anteriormente, agregar 10 ml de solución 2 N de yoduro de potasio y 2 ml de la solución indicadora de almidón (solución 1 %), agitar
- Titular rápidamente con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.1 N hasta que el color naranja original aparezca. Registrar los mililitros de tiosulfato gastados al punto de equivalencia

Cálculos:

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{V_1 \times N_1 \times \text{meqH}_2\text{O}_2 \times F_1 \times 100}{m}$$

Donde:

$V_1$  = Volumen de sulfato cérico consumido en la titulación del  $H_2O_2$  (ml)

$N_1$  = Normalidad del sulfato cérico

meq  $H_2O_2$  = PM  $H_2O_2$  / no.  $e^-$  cargados en la reacción redox = 0.017

$F_1$  = Factor de dilución

$m$  = Cantidad de muestra

$$\% \text{ APA} = \frac{V_2 \times N_2 \times \text{meq APA} \times F_2 \times 100}{M}$$

$V_2$  = Volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación del APA (ml)

$N_2$  = Normalidad de tiosulfato de sodio

meq APA = PM APA / no.  $e^-$  cargados en la reacción redox = 0.038

$F_2$  = Factor de dilución

$m$  = Cantidad de muestra

$$F_1 = \frac{\text{Normalidad real del cerio}}{0.1}$$

$$F_2 = \frac{\text{Normalidad real del tiosulfato de sodio}}{0.1}$$