

## Consideraciones ecológicas y de inocuidad alimentaria en productos de origen vegetal <sup>1</sup>

María S. Tapia de Daza <sup>2</sup> y Rosa V. Díaz <sup>3</sup>

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

**RESUMEN.** En años recientes, los medios de comunicación han prestado mucha atención a problemas microbiológicos emergentes en alimentos de origen vegetal. Las posibilidades de contaminación de las frutas y hortalizas son altas debido a la gran variedad de condiciones a las que son expuestas durante el cultivo, cosecha, procesamiento y distribución. Estas consideraciones adquieren gran interés en el panorama actual presentado por las nuevas técnicas de procesamiento que ofrecen atributos de conveniencia y frescura en respuesta a los cambios en los patrones de consumo y la gran demanda de frutas y vegetales frescos o mínimamente procesados. Existe entonces ahora una gran dependencia del uso de refrigeración y de nuevos materiales y técnicas de empaque. Aunque los productos vegetales frescos no habían sido considerados vectores de importancia en la transmisión de enfermedades, las nuevas tecnologías que aumentan su vida útil, pueden aumentar los riesgos asociados con organismos patógenos en especial de naturaleza psicrotrofica al retardar el desarrollo de la flora competitiva deteriorativa. Adicionalmente cualquier etapa del procesamiento puede modificar los microambientes de los alimentos y abrir nuevas posibilidades a patógenos que por razones ecológicas nunca hubiesen estado presentes naturalmente en el producto. En este artículo se revisan aspectos ecológicos y de inocuidad así como brotes de enfermedades atribuidas al consumo de productos de origen vegetal causados por *Salmonella* y *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila* y *Campylobacter jejuni*.

**SUMMARY.** Ecological and food safety considerations in products of plant origin. Media have paid much attention in recent years to emerging microbiological problems in foods of plant origin. The potential for contamination of fruits and vegetables is high because of the wide variety of conditions to which produce is exposed during growth, harvest, processing and distribution. These considerations acquire great significance in the current scenario of the new processing techniques that offer attributes of convenience and fresh-likeness in response to changes in consumption patterns and increased demand of fresh and minimally processed fruits and vegetables. Thus, reliance on low temperature storage and on improved packaging materials/techniques have increased. Even if produce had not been considered a major vector for foodborne diseases, technologies that extend shelf-life by decreasing the rate of product deterioration might increase the risks associated with pathogenic microorganisms, especially of psychrotrophic nature, by allowing sufficient time for their growth when retarding the development of competitive spoilage organisms. Processing steps that modify the food microenvironment open new possibilities to support pathogens that, for ecological reason, would have never been naturally present in produce. Ecological and safety aspects related to fruits and vegetables as well as foodborne disease outbreaks traceable to produce and reportedly due to *Salmonella* and *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter jejuni* are reviewed.

### INTRODUCCION

En sondeos de opinión recientes, el peligro microbiológico viene a ocupar un lugar relevante entre los peligros asociados

con los alimentos, debido en parte a la gran cobertura otorgada por los medios de comunicación en los últimos años, a problemas microbiológicos emergentes como *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni* (1).

En la microbiología formal de los alimentos, los mayores peligros microbiológicos en el contexto de la inocuidad alimentaria, habían estado siempre asociados con los alimentos de origen animal ya que las especies patógenas para el hombre y los animales se consideraban de rara ocurrencia en las frutas, hortalizas y productos de origen vegetal en general. Los productos de origen vegetal se incorporaron por la puerta

1 Parte de este trabajo fue presentado en conferencia dictada por M.S. Tapia en el II Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos, Montevideo, Uruguay, Nov. 29 - Dic. 5 de 1992, habiendo sido actualizado al año 1994.

2,3 Profesores/Investigadores Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, U.C.V. Apdo. 47097, Caracas, 1941-A, Venezuela.

grande a las categorías de alimentos de riesgo microbiológico alto, cuando en la década de los sesenta se identificaron las aflatoxinas y a los granos y cereales como nichos ecológicos apropiados para mohos potencialmente aflatoxigénicos.

Dejando a un lado esta categoría de alimentos y haciendo referencia sólo a las frutas y hortalizas, la microbiología moderna a de los alimentos ha dado un gran vuelco en la jerarquización de los alimentos en base a los peligros microbiológicos, como una consecuencia de varios aspectos: a. La potencial ocurrencia de patógenos en productos de origen vegetal y el reconocimiento de la asociación de distintos patógenos de amplia distribución en el ambiente con cultivos vegetales; b. El reconocimiento reciente de que algunos de los patógenos considerados «emergentes» son capaces de crecimiento competitivo a 5°C en productos vegetales frescos (estos organismos parecen haber penetrado la línea de defensa moderna contra enfermedades del pasado relacionadas con alimentos: el uso de bajas temperaturas, conduciendo a una re-evaluación del concepto de ausencia de patógenos/uso de refrigeración (2); c. La posible presencia de aflatoxinas y de otras micotoxinas en los productos de frutas y hortalizas; d. cambios en los patrones de consumo como consecuencia de las preferencias de los consumidores en base a exigencias de frescura y conveniencia, en particular para productos de frutas y vegetales.

No es posible hacer consideraciones de inocuidad alimentaria en frutas y productos de origen vegetal sin hacer referencia a aspectos de ecología microbiana, sobre todo hoy en día cuando el escenario de la preservación de alimentos está cambiando y las marcadas tendencias en las necesidades de los consumidores modernos estimulan la exploración de diferentes y nuevas aproximaciones ecológicas en la preservación de los alimentos (3).

### Ecosistemas en productos de origen vegetal

Cuando son colonizados por microorganismos, los alimentos representan ecosistemas bien definidos y los distintos métodos de preservación persiguen establecer y controlar estos ecosistemas de manera de alcanzar un grado deseado de estabilidad e inocuidad. Adicionalmente, los procedimientos de contaminación que reducen la carga microbiana inicial de las materias primas e ingredientes y los procedimientos para evitar recontaminación post-proceso, cambian igualmente la microflora original del ecosistema y afectan los tipos de asociaciones microbianas que puedan establecerse posteriormente (3). Cada asociación microbiana es específica y peculiar para el tipo de alimento que coloniza, siendo afectada por parámetros intrínsecos y extrínsecos que ejercen una presión ecológica que determinará no sólo la naturaleza de la microflora saprófita alterante, sino también la colonización del alimento por ciertos patógenos. Estos factores han sido discutidos extensamente en la literatura (4,5,6,7). El tipo y la composición del producto tiene una gran influencia sobre los organis-

mos que se establecen (ej. los mohos y levaduras predominan en frutas por su pH ácido y su alto contenido de azúcares, mientras que en vegetales, más ricos en almidón, las bacterias constituyen mejores competidores 8,9).

La mayoría de las bacterias que se encuentran en las superficies de vegetales recién cosechados son saprófitos, siendo *Pseudomonas* y el grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* de las enterobacterias, dos de los grupos más frecuentes. Entre los psicrotrófos capaces de desarrollarse en los productos vegetales, sólo unos pocos afectan la calidad de los mismos durante el almacenamiento, siendo las que causan mayor daño las especies pectinolíticas causantes de degradación de los tejidos (*Erwinia carotovora*, *Pseudomonas* spp. fluorescentes: *P. aeruginosa*, *P. luteola*, *P. fluorescens*, *Bacillus* spp., *Cytophaga johnsonae*, *Xanthomonas campestris*, *Vibrio fluvialis*) (9,10,11). *Enterobacter* spp., algunas bacterias acidolácticas y *Pseudomonas* spp. no fluorescentes, constituyen algunas de las especies de bacterias que no son necesariamente destructivas para los tejidos vegetales (9). Muchos de estos organismos no se asocian normalmente con diarreas y se consideran no-patógenos, sin embargo, como algunos se han asociado con enfermedades en humanos, se les llama patógenos oportunistas que causan infecciones extraenterales generalmente de origen nosocomial. Wright et al. (12) aislaron en altos contajes *Klebsiella*, *Enterobacter*, y *Serratia* a partir de ensaladas de vegetales servidas a pacientes de un hospital de Pennsylvania. Las ensaladas habían sido preparadas con vegetales lavados con agua corriente y drenados por períodos no mayores de 5 minutos hasta ser cortados. Los vegetales usados incluían tomates, rábanos, céleri, zanahorias, endivias, pepinos y lechuga, concluyéndose que los vegetales son reservorios de estos organismos que pueden efectuar la colonización e infección de pacientes susceptibles. Existe también la preocupación de la presencia potencial de bacterias de significado en salud pública en productos vegetales por razones de su proximidad con el suelo, donde pueden sobrevivir organismos como *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*. El contacto con agua de irrigación contaminada, abonos orgánicos, animales, pájaros, prácticas antihigiénicas durante la cosecha, etc., puede permitir la contaminación con organismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, etc. Se ha reportado que el suelo puede contener valores de  $10^6$  clostridios/g en la rizósfera de los ecosistemas suelo-planta (*C. perfringens* y clostridios butíricos entre las especies más comunes). Esto da una idea de las amplias posibilidades de contaminación de los vegetales que crecen cerca del suelo. Lund (13) reporta valores de  $6 \times 10^3$  esporas de clostridios pectinolíticos/g de piel de tubérculos de papa, siendo ésto probablemente, sólo una fracción de los clostridios totales presentes. Se considera que los tejidos internos de las frutas y vegetales son estériles, sin embargo, durante las operaciones comerciales de lavado, pelado, cortado, rebanado y empacado, puede ocurrir un aumento considerable en la contaminación de los productos a

menos que se tomen precauciones especiales.

Estas consideraciones adquieren especial interés en la actualidad con el auge de la nueva generación de productos de frutas y hortalizas frescos sometidos a las llamadas operaciones de procesamiento mínimo, que ofrecen características especiales de conveniencia a los consumidores modernos. Un número de tecnologías han sido desarrolladas para aumentar la vida útil tanto de productos vegetales enteros como procesados mínimamente tales como ensaladas preparadas, vegetales pre-cortados, frutas peladas y vegetales enteros de larga duración. Entre ellas se citan el uso de bajas dosis de radiación gamma, procesos de esterilización no-térmica, uso de aditivos y métodos combinados, empaques en atmósferas controladas y/o modificadas, absorbentes o emisores de gases, etc. Estas tecnologías persiguen el objeto común de extender la vida útil reduciendo la tasa de deterioro organoléptico y generalmente involucra el uso de recipientes cerrados o uso de algún tipo de empaque, en conjunción con refrigeración (14). De esta manera mientras una de las grandes metas de la tecnología de alimentos y de la fisiología post-cosecha había sido la extensión de la vida útil de los productos frescos enteros, uno de los retos recientes es el de aplicar los conocimientos generados para lograr el mismo objetivo, ahora con productos cortados, preparados o procesados parcialmente (9). Una preocupación reciente es que las nuevas tecnologías de empaque que extienden la vida útil de productos refrigerados, pueden también aumentar los peligros microbianos asociados con la proliferación de microorganismos patógenos y/o sus toxinas (15).

Así, si bien los productos frescos no habían sido considerados un vector importante en transmisión de enfermedades, con las nuevas tecnologías que extienden la vida útil comestible de las frutas y hortalizas, se puede proporcionar suficiente tiempo para la proliferación de patógenos y/o producción de sus toxinas, en productos que sometidos a una manipulación convencional no podrían sustentar estos patógenos sin haberse vuelto antes organolépticamente inaceptables. El amplio espectro de procesos y de técnicas y materiales de empaque disponibles en la actualidad, ampliado aun más por la gran cantidad de combinaciones posibles entre ellos, hace que se conforme un cuadro totalmente nuevo para las consideraciones de calidad y de inocuidad alimentaria de los productos de origen vegetal (16).

### **Inocuidad de productos de origen vegetal**

A menos que hayan sido fertilizados con desechos humanos o animales, o irrigados con agua que contenga esos desechos, las frutas y vegetales frescos deben estar normalmente libres de la mayoría de los patógenos entéricos de origen animal y humano. Sin embargo, si bien la presencia de formadores de esporas como *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* no tiene mayores consecuencias en vegetales crudos, estos organismos pueden representar problemas potenciales de salud en vegetales cocidos que han sido mantenidos a temperaturas inadecuadas.

Han sido pocos los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con consumo de productos de origen vegetal. Cuando se considera la enorme variedad y cantidad de productos frescos que se comercializan anualmente, un análisis microbiológico rutinario de frutas y vegetales frescos resulta poco práctico y hasta innecesario, si se siguen buenas prácticas agrícolas junto con prácticas higiénicas durante la cosecha, empaqueo y transporte de los productos al mercado (17). Así, es posible decir que en su mayoría, las frutas y hortalizas, se encuentran entre los alimentos más seguros e inocuos. El pH ácido de la mayoría de las frutas previene el desarrollo de la mayoría de los patógenos, mientras que en vegetales, la flora deteriorativa competitiva estará en ventaja con respecto a la flora patógena. Aunque la mayor parte de las frutas y vegetales contienen los nutrientes necesarios para sustentar el crecimiento rápido y progresivo de patógenos infecciosos o toxigénicos (lo cual les confiere por definición la condición de alimentos de riesgo con potencial peligro microbiano), los mismos poseen barreras naturales que previenen la entrada y subsecuente proliferación de microbios al interior (cutícula, piel, testa de semillas, cáscaras de nueces, etc.). Estas barreras pueden sin embargo ser debilitadas o destruidas por una manipulación inapropiada o por algún tipo de procesamiento aplicado (por ej. tratamiento térmico con escaldado o cocción) (18).

Los brotes de gastroenteritis causados por la ingestión de frutas y hortalizas ocurren con una frecuencia mucho menor que las causadas por otros tipos de alimentos, siendo por lo general las enfermedades asociadas con su consumo, de naturaleza infecciosa. En los episodios de brotes producidos por consumo de frutas y hortalizas (frescos y procesados convencionalmente o con tecnologías de procesamiento mínimo) que se discutirán a continuación, se hará mención especial a brotes causados por modificación de microambientes en productos del origen vegetal que han favorecido la patogénesis mientras se lograba la extensión de la vida útil por control de flora deteriorativa.

***Salmonella* y *Shigella*.** Cuatro grandes brotes de gastroenteritis han sido causados recientemente por el consumo de frutas y vegetales frescos (crudos). Dos de estos brotes han sido causados por el consumo de lechuga contaminada con *Shigella sonnei*. Se cree que en uno de los brotes, la contaminación pudo haber ocurrido en el campo o en el depósito. En el otro se ha atribuido a manipulación del producto cortado y rebanado por un operario contaminado, siendo después el producto empacado en bolsas plásticas y almacenado a temperaturas de abuso (19).

Uno de los brotes más espectaculares en el que se ha involucrado frutas ha sido la contaminación superficial de melones con *Salmonella chester*. Este brote ocurrió en 1990 y abarcó 30 estados de USA, resultando sólo en dos muertes a pesar de calcularse la enorme cifra de 25.000 individuos eventualmente infectados. Se vinculó la enfermedad con el

consumo de melón cortado y servido en «salads bars», presumiéndose que los organismos de la corteza sin lavar de la fruta pasaron al interior de la misma al ser ésta cortada en trozos (18). También en 1990 se reportó un brote causado por *Salmonella javiana* asociado con tomates, que afectó a 174 personas en cuatro estados americanos (13). Ya se habían reportado tres brotes de salmonelosis en USA atribuidos a melones, uno de ellos en un reporte de 1955, y otros en informes de los Centers for Disease Control, que reportan gastroenteritis producida por *Salmonella oranienburg* asociadas con consumo de melones pre-cortados (20). Un reporte de 1991 de los Centers for Disease Control apunta adicionalmente a melones, como los vectores de infecciones por *Salmonella poona*, ocurridos en 15 estados de USA y dos provincias de Canadá, en el que se presumieron más de 400 infectados y un total de 185 casos confirmados en USA y 56 en Canadá. Se atribuyó nuevamente el brote a melones pre-cortados servidos en «salads bars». El organismo se multiplicó mientras se mantenía en estos servicios (21). En julio de 1991, la FDA giró instrucciones de lavar bien las frutas antes de ser cortadas, eliminar la corteza de las piezas cortadas, mantener la fruta a temperaturas inferiores a 45°F y no exhibir los melones cortados por más de dos horas después de haber sido cortados (18).

***Clostridium botulinum***. A pesar de los numerosos brotes de naturaleza infecciosa en los que frutas y productos de origen vegetal han sido los vehículos, la mayoría de los brotes ocurridos atribuibles a los mismos han sido causados por un patógeno toxigénico, *Clostridium botulinum*, cuyo crecimiento se asocia a alimentos de baja acidez. Aunque la sola presencia de este organismo no es suficiente para causar la enfermedad, se deben dar condiciones para que las esporas de este organismo no sean destruídas y puedan germinar y producir la toxina.

El desarrollo de nuevos métodos de preservación y de técnicas de empaque abren nuevas posibilidades para el desarrollo de este temido patógeno en productos en los que no se consideraba posible su desarrollo bajo los esquemas tradicionales. En realidad, cualquier etapa de un proceso en la que se modifique el microambiente alrededor de un producto todavía metabólicamente activo puede originar problemas de grandes magnitudes, sobre todo si el pH del alimento no es ácido (13). Un ejemplo clásico en este sentido lo constituye el uso de empaques flexible en champiñones frescos. En este caso, la alta actividad respiratoria de los hongos consume oxígeno, y debido a las restricciones al paso de este gas desde el exterior por razones de permeabilidad del empaque, *C. botulinum* puede crecer y producir la toxina, como fue demostrado por Sugiyama y Yan (22). En caso de que esta posibilidad no hubiese sido prevista y confirmada por los investigadores, las consecuencias pudiesen haber sido desastrosas (8). Algunos brotes de botulismo que se señalan a continuación han sido consecuencia de determinadas condi-

ciones particulares de procesamiento y distribución que conllevaron al desarrollo de condiciones especiales en los microambientes de esos ecosistemas alimentarios permitiendo el desarrollo de *C. botulinum*.

Tres brotes de botulismo tipo A por consumo de ensalada de papas ocurrieron en USA, en Colorado (6 personas en 1969 y 8 personas en 1978) y Nuevo México (34 personas en 1978). En al menos tres de los incidentes, las ensaladas habían sido preparadas con papas horneadas en papel de aluminio que habían sido mantenidas varios días a temperatura ambiente y no mostraban signo alguno de deterioro (23, 18). En 1984 se atribuyó un caso simple de botulismo a papas horneadas servidas en un restaurant de USA. La FDA considera a las papas horneadas o cocidas como «alimentos potencialmente peligrosos», y recomienda su mantenimiento a temperaturas <7°C ó > 60°C (24). Se ha reportado que tanto especies proteolíticas como no-proteolíticas de *C. botulinum* pueden sobrevivir los procesos comerciales de cocción empleados en la producción de papas empacadas al vacío y producir la toxina durante el almacenamiento, antes de que se presenten signos evidentes de deterioro (25,26,13). Un brote de botulismo Tipo A, ocurrido en Peoria, Illinois en 1983, en el que 28 personas fueron hospitalizadas y una murió, se debió al consumo de cebollas sofritas (sautéed) en margarina, sometidas en un restaurant a temperaturas de «mantenimiento en caliente» inapropiadas. Al examinar cebollas crudas obtenidas del mismo restaurant, se encontró que contenían elevadas concentraciones de esporas de *C. botulinum*. Se concluyó que la margarina permitió probablemente crear condiciones de anaerobiosis que permitieron la producción de la toxina (27). Entre julio y septiembre de 1985 se presentaron 36 casos de botulismo por un producto comercial de ajo embotellado en aceite de soya, servido en un restaurant de Vancouver, Canadá (28). En 1989 se presentaron tres casos más de botulismo atribuido a un producto de «ajo en aceite». En todos los casos, los productos permanecían organolépticamente aceptables a pesar de contener una elevada concentración de toxina (13). Después de estos incidentes, la FDA ordenó a las compañías fabricantes dejar de manufacturar cualquier mezcla de cebolla o ajo en aceite, cuya estabilidad dependiese solamente de la refrigeración. A estos productos se les debe incorporar factores de preservación adicionales como antimicrobianos o agentes acidificantes (13). En 1984 ocurrió un brote de botulismo tipo A en Japón que afectó a 36 personas, muriendo 11 de ellas. El agente causal fue un producto comercial de raíces de loto, fritas, rellenas de mostaza y empacadas al vacío. Se consideró que el uso de refrigeración después de rellenar las raíces, el aumento del pH y de la  $a_w$ , y la aplicación de tratamiento térmico en el proceso fueron factores determinantes en la producción la toxina, más que el empaque al vacío. Este último sin embargo influyó en la decisión de adquirir el producto por los consumidores quienes asumieron que era un producto de mayor vida útil y probablemente más seguro e inocuo (29,13). En 1987, cuatro artistas de un circo es Sarogota, Florida,

sufrieron síntomas de botulismo después de consumir ensalada de repollo (coleslaw) de pH 3.5, pero preparada con repollo mínimamente procesado cortado y empacado en atmósfera modificada donde probablemente se dieron las condiciones para el crecimiento y producción de la toxina por el clostridio (30).

Aun los productos sometidos a procesamientos tradicionales pueden tener problemas de crecimiento de *C. botulinum*. Aunque la mayoría de las frutas y algunos vegetales como el ruibarbo son lo suficientemente ácidos para inhibir completamente el crecimiento de *C. botulinum* solamente por pH, otros productos como alcachofas enlatadas o marinadas, champiñones, pimentones, melones e higos si van a ser enlatados, se les debe adicionar acidulantes como ácido cítrico, acético, otros ácidos orgánicos o jugo de limón. Esta consideración es de suma importancia en el caso de procesar caseramente tomates con valores de pH lo suficientemente altos (ej. 4.7) para permitir el crecimiento de *C. botulinum*. O'daugh y Plufg (31) reportan 35 incidentes de botulismo asociados con alimentos ácidos o acidificados en USA desde 1910 hasta 1975 (tomates y productos de tomates en su mayoría, seguidos de peras, albaricoques y encurtidos). De los productos incriminados, 34 habían sido procesados caseramente y muchos de ellos contenían microorganismos ácido tolerantes como levaduras, mohos, y diplococos. Slocum et al. (33) señalan a tomates enlatados como la causa de dos de estas muertes, siendo el pH del producto 4.21, y habiendo aislado del mismo bacilos aeróbicos y diplococos. Estos mismos autores reportan nueve brotes de botulismo, tres de albaricoques enlatados, tres de peras, y tres de tomates. Una revisión reciente de botulismo en USA desde 1889 hasta 1983, realizada en 1984 por el Center for Disease Control de Atlanta (33) indica que un total de 27 de los brotes son atribuidos a frutas y 20 más a condimentos y salsas, como encurtidos picantes de tomate, salsa de chile y chiles encurtidos. Aunque los encurtidos comerciales no ha estado nunca involucrados en casos de botulismo, se ha reportado tres casos por consumo de pepinillos de fabricación casera y uno por pepinos también envasados caseramente. Ito et al. (34) demostraron que un pH de 4.8 es suficiente para inhibir el desarrollo de *C. botulinum* en pepinos recién empacados e investigaron adicionalmente la tasa de penetración del ácido acético al centro del pepino, la cual fue muy rápida (10.5 h). En una revisión de botulismo humano en USA y Canadá se citan 12 casos de botulismo por higos procesados y envasados caseramente (34). Los brotes causados por frutas se han debido comunmente a sub-procesamiento, ya que los procesadores caseros evitan aplicar tratamientos térmicos severos que son detrimentales para la textura y flavor de las frutas. No ha ocurrido ningún incidente de botulismo por higos enlatados comercialmente. En el caso de las cinco muertes en USA en 1915 por consumo de albaricoques enlatados caseramente, Dickinson, citado por Haushild (24) reportaba sin entender su completo significado que... «todos los albaricoques eran aparentemente de buena calidad, excepto algunos que lucían mohosos en la superfi-

cie». Hoy se sabe que las levaduras sobrevivientes y mohos del género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mycoderma* y *Trichosporom* tienen la habilidad de producir elevaciones localizadas de pH, que bien pueden permitir el crecimiento de *C. botulinum*, aunque el pH total del producto esté por debajo de 4.6. Meyer y Gunnison (35) reportaron un pH de 3.86 en las peras que causaron un brote de botulismo en California encontrando células de levaduras más no de mohos. Se han descrito brotes de botulismo causados por moras enlatadas caseramente con pH de 3.4., por tomates con pH de 4.5 y por jugo de tomate con pH de 4.2 (33). Huhtanen et al. (33) en sus clásicos experimentos de inoculación de jugo de tomate con *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp., observaron como se desarrollaron gradientes de pH que variaban desde 7.0 y 7.8 en las inmediaciones del crecimiento del moho, hasta 4.3 y 4.6 en el fondo de latas de jugo de tomate sin agitar (cuyo pH inicial había sido de 4.2), después de 9 y 19 días de incubación. Al inocular este jugo mohoso con esporas de *C. botulinum*, estas germinaron, se desarrollaron y produjeron la toxina. Este trabajo indica que el pH inicial de un producto no es el único factor de importancia en la prevención del desarrollo de *C. botulinum* en tomates u otros productos ácidos. Así, si se desarrollan mohos en la superficie, se eleva el pH del producto sobre el cual se encuentran, aunque el producto haya tenido un pH inicial muy bajo y la toxina puede ser producida a esos altos valores. Cualquier persona desinformada puede remover el crecimiento fúngico visible y consumir el resto del producto que contiene la toxina preformada. Lo que es aun más, un análisis del pH del producto, después de realizar un mezclado rutinario arrojará resultados en el rango de productos de alta acidez. Este parece haber sido el caso de un brote de botulismo de nueve casos con dos muertes, ocurrido en la antigua U.R.S.S. causado por consumo de jugo mohoso de tomate, cuyo pH oscilaba entre 3.8 a 4.5 en las diferentes latas examinadas (33).

Montville (36) investigó el efecto metabiótico de *Bacillus licheniformis* (contaminante común de los tomates, cuyas esporas pueden sobrevivir procesos de pasteurización) sobre *C. botulinum* en sistemas aeróbicos de jugo de tomate de pH inicial de 4.4. Se demostró que *B. licheniformis* al crecer desarrollaba un gradiente de pH con valores de 7.35 a 7.55 en la superficie, 4.76 a 6.20 en el medio y 4.50 a 4.68 en el fondo de los frascos. El pH total de la mezcla variaba entre 4.78 a 5.90. *C. botulinum* pudo crecer y producir toxina en estas condiciones. Dujaili y Anderson (37) aislaron 24 cepas de *Bacillus* spp., que elevan el pH del jugo de tomate y producen deterioro no efervescente, a partir de fuentes naturales como suelo de jardín, papas, tomates frescos, lechuga sin lavar, hojas de calabacín y de vainitas, etc. Estos organismos formadores de esporas, no productores de gas eran morfológica y fisiológicamente diferentes tanto de *B. coagulans* como de *B. licheniformis* y son contaminantes normales los productos hortícolas, los cuales si no son lavados adecuadamente, pueden pasar a los frascos donde serán envasados, elevando el pH sin signos evidentes de gas. En caso de que los contaminantes

sean típicas bacterias deteriorativas heterofermentadoras oportunistas, la producción de gas constituye un signo visible que advierte el sub-procesamiento. Recientemente, Rodríguez et al. (38) investigaron el crecimiento anaeróbico de especies seleccionadas de *B. licheniformis* (anaerobio facultativo) y de *B. subtilis* (aerobio) en jugo de tomate envasado asépticamente para demostrar el riesgo potencial de metabiosis entre estas cepas mesofílicas de *Bacillus* y *C. botulinum*. Las cepas de *B. subtilis* no crecieron en condiciones estrictas de anaerobiosis, aunque sí pudieron utilizar cantidades residuales de oxígeno y ambos requieren oxígeno para crecer en jugo de tomate de pH 4.4.

Aun con productos comerciales pueden ocurrir problemas, así se han descrito casos de botulismo tipo B en Francia y Tipo A en Taiwan por espárragos tipo español enlatados y maní envasado en vidrio, respectivamente (39).

**Listeria monocytogenes.** Si ha habido un organismo de los llamados «patógenos emergentes» que ha sido investigado intensamente por su elevada ocurrencia en la naturaleza, particularmente en el ecosistema suelo-planta y en los ecosistemas agrícolas en los cuales se ha investigado ampliamente la ecología del organismo, éste ha sido *Listeria monocytogenes*. Seelinger (40) especula sobre «una etapa primaria saprofítica de *Listeria*» sobre la base del parecido de algunas de sus características bioquímicas y de cultivo, con algunos organismos típicos de las asociaciones suelo-planta. Welshimer y Donker-Voet (41) concluyeron que la evidencia sugiere que *Listeria* puede llevar una existencia saprofítica en la que el ambiente planta-suelo, pudiéndose comparar *Listeria* con *Klebsiella-Enterobacter*, que viven extensamente como organismos libres pero que también colonizan el tracto de animales y humanos pudiendo producir enfermedad. La ecología de *Listeria monocytogenes* en el sistema agroalimentario fue revisada por Van Renterghem et al. (42). Estos autores señalan la alta incidencia del organismo en heces de animales, lo cual se correlaciona con el tipo de alimentación suministrada a los mismos, ya que se ha aislado de vegetación fresca y en descomposición, y en ensilados y forrajes de pobre calidad. El consumo de ensilado mohoso o curado inapropiadamente, presentando valores de pH elevados ha sido correlacionado con brotes de listeriosis (43). Las prácticas de abono y de irrigación pueden contribuir a la diseminación del organismo, particularmente a la introducción de la bacteria en la rizosfera de las plantas, siendo ésta la razón por la que los vegetales se encuentran regularmente contaminados con *Listeria*, partiendo de la base que la rizósfera planta-suelo sea el reservorio natural. Esto es particularmente cierto para las raíces como papas y rábanos, no así para zanahoria, la cual parece contener un factor anti-listeria (44), probablemente un compuesto fenólico. Se ha demostrado la presencia de *L. monocytogenes* en aguas negras, aguas fluviales y efluentes industriales y hasta de plantas de tratamientos de aguas servidas de diversas localidades y países (46,47), concluyéndose que la práctica de utilizar productos de tratamientos de agua como

fertilizantes, puede ser una ruta para la contaminación de la vegetación destinada al consumo humano y animal.

Ya a partir de 1967, Blendon y Szatalowicks (47), al notar que entre 1933 y 1966 se habían reportado 731 casos de listeriosis humana, señalaron la posibilidad de que productos vegetales como la lechuga pudiesen estar contaminados con *L. monocytogenes* y ser capaz de causar infección. No fue hasta 1985 cuando ocurrió el fatal incidente en Canadá en el que murieron 18 de 41 canadienses como consecuencia del consumo de ensalada de repollo, de la cual se logró aislar e identificar positivamente al organismo, cuando se empezó a despertar interés en el significado para la salud pública que podía tener *L. monocytogenes* en hortalizas, frutas y otros productos de origen vegetal. Ho et al (48) reportaron en 1979 un brote de infección por *L. monocytogenes* que involucró 23 pacientes de un hospital de Boston. Tres platos fueron considerados sospechosos: atún, ensalada de pollo y queso, y los únicos ingredientes comunes a los tres fueron fueron céleri crudo, tomates y lechuga. Se concluyó que el consumo de estos tres vegetales podía haber sido la causa de la infección. Desafortunadamente para el momento del brote no se analizaron los alimentos para tratar de aislar el organismo y poder realizar un estudio epidemiológico completo.

Por el contrario, el estudio epidemiológico del brote canadiense de 1981 ocurrido en la Provincia Marítima de Canadá es un modelo en su tipo. Entre el 1º de marzo de 1991 y el 1º de septiembre de ese año ocurrieron 34 casos de listeriosis perinatal y siete casos en adultos. Un survey de control de casos después de repetidas entrevistas apuntó en la dirección de una ensalada de repollo en la historia común de las dietas de los casos y los controles. Se pudo obtener muestra de ensalada del refrigerador de uno de los pacientes, que resultó ser positiva para *L. monocytogenes* sero tipo 4b, la cual era la cepa epidémica y la cepa aislada de la sangre de los pacientes. La ensalada se había preparado comercialmente con repollo y zanahoria obtenidas de mayoristas y granjeros locales cuya distribución había sido limitada a la Provincia Marítima. Después de un prolongado enriquecimiento en frío, se pudo aislar *L. monocytogenes* a partir de dos paquetes sin abrir de ensalada de repollo adquirida en dos supermercados del área de Halifax. Siguiendo la pista de las fuentes de los vegetales crudos, se pudo identificar un productor quien además de cultivar repollos, también mantenía rebaños de ovejas, y dos de las ovejas habían muerto de listeriosis. Al revisar las prácticas agronómicas del productor se pudo constatar que se había abonado el terreno donde se cultivaban los repollos con excremento de oveja tanto fresco como compostado. Finalmente, desde la última cosecha en octubre hasta la primavera, los repollos habían sido mantenidos en almacenamiento refrigerado. Durante la época del brote se despacharon 2250 kg a los fabricantes de la ensalada (43).

Es indudable que la presencia de *L. monocytogenes* en el ecosistema planta-suelo, combinado con la naturaleza psicotrófica del organismo involucra un peligro para la salud

pública, sobre todo en la actualidad cuando el consumo de ensaladas frescas y de ensaladas «listas para comer» ha aumentado tanto. Esto ha conducido a la realización de numerosos surveys de productos frescos y congelados destinados para consumo humano y expendidos comúnmente en los supermercados. Petran et al (49) analizaron 23 muestras de vegetales en las que se incluían brócoli, remolacha (piel), repollo (hojas externas), zanahorias (piel), tallos de coliflor, corazón y hojas de lechuga, espinaca, tallos de champiñones, mazorcas de maíz y varios vegetales congelados. Archer (50) reporta el análisis de 22 muestras de brócoli, zanahorias, céleri, lechuga, pimentones verdes y papas. Buchanan et al (51) como parte de un extenso survey de productos de diversos orígenes, investigaron dos muestras de ensalada de papas. No se logró aislar *L. monocytogenes* de ninguna de las muestras analizadas en los tres surveys. Farber et al (52) analizaron varios tipos de productos expendidos en Ottawa, incluidos productos vegetales (110 muestras) como lechuga, céleri, rábanos y tomate, no encontrando el organismo en ninguna de ellas. Heisick et al (53) realizaron un survey de un total de 1000 muestras de diez variedades diferentes de vegetales de dos supermercados del área de Minneapolis, encontrándose *Listeria* en repollo, pepinos, lechuga, champiñones, papas y rábanos, pero nunca fue encontrada en brócoli, zanahorias, coliflor o tomates. Este se considera el único survey significativo de productos vegetales frescos reportado hasta ahora.

Se puede concluir que siempre que se emplee un adecuado procedimiento de aislamiento y haya suficiente tiempo para examinar un número representativo de muestras, es un hecho fácilmente confirmable, que un determinado porcentaje de los vegetales crudos que se comercializan en los mercados de productos frescos, contienen *Listeria* spp., incluida *L. monocytogenes*, siendo su incidencia mayor en los vegetales de raíz (papas, rábanos). Sismur y Walker (54) examinaron 10 variedades diferentes de ensaladas pre-empacadas expendidas en dos supermercados de Inglaterra, encontrándose en 4 de 60 muestras investigadas. Estas ensaladas eran de dos tipos: repollo, celery, pasas, cebollas y zanahorias y lechuga, pepino, rábanos, berro puerro e hinojos. Los dos tipos de ensaladas contenían repollo, pepino y/o rábanos, que son precisamente tres de los cuatro tipos de vegetales de los que se aisló *L. monocytogenes* en USA. Bending y Strangeways (55) propusieron que un paciente de post-operatorio de 74 años de un hospital de Londres pudo haber adquirido septicemia y meningitis listérica, como consecuencia de haber consumido lechuga contaminada. Esto parece indicar que la lechuga cruda aún lavada, puede representar un riesgo para la salud de pacientes debilitados o inmunosuprimidos. Steinbruegge et al (56) investigaron la habilidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir y crecer en lechuga fresca y preparada en la forma de un producto «listo para servir», encontrándose la potencialidad del producto mínimamente procesado de sustentar su crecimiento. El consumo de champiñones salados no cocidos, preparados caseramente, a los que se les determinó carga de

$10^6$  ufc/g de *Listeria monocytogenes*, ha sido vinculado con un caso no fatal de septicemia listérica en un ciudadano finlandés aparentemente sano (17). En Suiza se logró aislar *Listeria monocytogenes* en 3 de 64 ensaladas crudas (dos ensaladas mixtas y una ensalada de perejil obtenidos a nivel de supermercado (17). Recientemente, Miranda et al. (57) realizaron un análisis de 56 muestras de vegetales adquiridos en supermercados de un área del Estado Cojedes, Venezuela: repollo morado y blanco, berro, cilantro, lechuga y tomate, encontrándose *Listeria monocytogenes* en berro, cilantro, lechuga y repollo morado. El temor de las implicaciones de la presencia de *L. monocytogenes* en productos vegetales es tanto que el aislamiento casual del organismo de ensalada de papas, obligó en abril de 1990, a un productor de Virginia, a retirar del mercado 5700 libras de producto que había sido distribuido en el sureste de USA (17).

De la misma manera han sido numerosos los estudios realizados sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* inoculada en espárragos frescos, brócoli y coliflor (58), repollo y jugo de repollo (59, 60), lechuga (61), tomates y productos de tomates frescos y procesados (62), berro y jugo de berro (63), empacados tanto en aire como en atmósferas modificadas, con diferentes tipos de películas de empaque, temperaturas de almacenamiento, modo de preparación (enteros, rebanados, cortados), sometidos o no a clorinación, a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, etc. En todos estos estudios se encuentra que el organismo puede permanecer viable por períodos superiores a los de la vida útil promedio de los diferentes productos cuando son sometidos a las técnicas de preparación, empaque y distribución comúnmente empleadas en la industria de alimentos.

***Aeromonas hydrophyla*:** Los productos vegetales frescos deben también ser considerados como una fuente potencial de importancia de *Aeromonas* sp. citotóxicas y deben ser considerados en la epidemiología de las gastroenteritis presuntamente producidas por *Aeromonas hydrophyla*. A esta conclusión llegan Callister y Agger (64), después de investigar perejil, espinaca, céleri, brotes de alfalfa, brócoli y lechuga y encontrar *Aeromonas* spp. en todos los casos, con el agravante que los contajes aumentaron de 10 a 1000 veces durante dos semanas de almacenamiento a 5°C. Díaz et al (65) encontraron en Venezuela resultados similares al determinar la incidencia de *Aeromonas* sp. en lechuga, berro, repollo, escarola y perejil. Con toda la evidencia recogida hasta ahora que señala al organismo como un patógeno entérico de significación (a pesar de la controversia en relación a su papel en la etiología de gastroenteritis aguda por agua y alimentos), la presencia del organismo debe ser considerada con preocupación en los productos vegetales.

***Campylobacter jejuni*:** *Campylobacter jejuni* fue aislado de 3 (1.5%) de 200 muestras de expendio al detal de champiñones frescos empacados en películas de cloruro de

polivinilo, lo que revela un riesgo elevado de desarrollo de enteritis por *Campylobacter* en individuos que consumen estos hongos. Pareciera ser que las fuentes posibles de contaminación puedan ser a) el material de cubierta que se aplica a los lechos cubiertos de micelio en la producción comercial de champiñones b) el agua que se emplea para humedecer esta cubierta y c) operarios infectados. El compost que siempre es pasteurizado, no parece ser la vía de contaminación de los hongos. Aunque *Campylobacter jejuni* es un organismo muy sensible a condiciones de stress ambiental, las condiciones de microaerofilia que se desarrollan en el interior de las bolsas, junto a las temperaturas de comercialización (<10°C) parecerían favorecerle (66).

### CONCLUSIONES

Es indudable que nos encontramos en un momento en el que los riesgos de presencia de muchos patógenos en productos de origen vegetal deben ser re-evaluados. Para citar un ejemplo, recientemente se invalidó la prohibición de la FDA del uso de sulfitos en papas (por el riesgo para los alérgicos sulfitosensibles) con el argumento por parte de la industria, que este compuesto previene el crecimiento de *Clostridium botulinum* y su producción de toxina, sin embargo, experiencias recientes demuestran que el NaHSO<sub>3</sub> extiende significativamente la aceptabilidad de papas crudas peladas y rebanadas mantenidas a temperaturas de abuso (ambiente) pero no inhibe la germinación y producción de toxinas por *Clostridium botulinum* en papas empacadas al vacío, las cuales permanecen aceptables, pero tóxicas (67). Así, una de las principales consideraciones de inocuidad alimentaria en el escenario actual de las nuevas tecnologías de procesamiento, es determinar si el deterioro (pérdida de la condición de comestibilidad) aparece antes o después de una posible patogénesis, ya que estas tecnologías han sido diseñadas fundamentalmente para extensión de vida útil, con lo que se proporciona tiempo adicional para que la flora patógena no deteriorativa que pueda estar presente en los productos se multiplique, aumentando así los peligros de salud pública asociados con productos frescos de origen vegetal. Estas evidencias (65, 68, 69, 70, 71) legitiman los cuestionamientos que han surgido acerca de la inocuidad de estos productos refrigerados conservados con tecnologías tipo atmósferas modificadas/controladas. Igualmente en la medida en que se continúa generando información sobre patógenos de importancia en salud pública, se vislumbran nuevos riesgos para los consumidores. Para citar otro ejemplo en este sentido, Abdul-Raouf et al (71) demostraron recientemente la capacidad de *Escherichia coli* 0157:H7 de crecer en ensaladas de vegetales (lechuga, pepinos y zanahoria rebanados) sometidos a condiciones de procesamiento y almacenamiento que simulan las empleadas rutinariamente en prácticas comerciales. Esto advierte de los riesgos de una eventual contaminación cruzada de las ensaladas con productos cárnicos. Aun productos como la

cidra de manzana, no pasteurizada, ha sido confirmada como un vehículo en brotes de gastroenteritis y del síndrome urémico hemolítico, indicando que la acidez del jugo de manzana es inadecuado para inhibir ciertos patógenos, entre ellos *Escherichia coli* 0157:H7 (72). Recientemente en 1994, se ha podido demostrar también la sobrevivencia de un patógeno como *Vibrio cholera* a diferentes valores de pH (fuera del rango de a<sub>w</sub> <0,943 o pH <5,2) en lechuga mantenida al menos dos semanas a temperaturas de refrigeración (73).

La implementación de un adecuado y completo programa de saneamiento en las industrias procesadoras, el cumplimiento de buenas prácticas agronómicas y de manufactura, y mejor aun si es combinado con un sistema de prevención como el sistema HACCP, permitirá asegurar que los productos de origen vegetal sean producidos libres de peligros microbianos, químicos y físicos. Los empacadores de alimentos deben cuidarse de no procesar productos contaminados aunque mantengan estrictas condiciones de empaque y refrigeración (74). Igualmente los consumidores de la década de los 90, deben ser educados para manipular y almacenar apropiadamente sus alimentos. Así, con las tendencias actuales de consumir productos frescos y sanos y hasta cultivados en el hogar, se pueden correr mayores riesgos como lo demuestra los casos de infección por varios serovares de *Salmonella*, ocurridos en Suecia e Inglaterra por consumo de frijoles chinos (brotes) cultivados en huertos caseros, lo que no ocurre con los preparados comercialmente, y lo que obligó a las autoridades de ambos países a recomendar hervir los brotes antes de ser consumidos (75). Así pues, los consumidores deben estar conscientes de los riesgos de consumir ciertos productos crudos o sub-procesados, de los peligros de la contaminación cruzada entre alimentos crudos y los «listos para servir» o cocinados, y muy particularmente de la necesidad de una higiene personal adecuada especialmente al manipular alimentos. Los alimentos de origen vegetal no pueden ser excluidos de este contexto.

### REFERENCIAS

1. Wolf I. Critical issues in food safety, 1991-2000. Food Technol. 46:64-70, 1992.
2. Palumbo S. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? J. Food Prot. 49:1003-1009, 1986.
3. Gould G. W. Ecosystem approaches to food preservation. J. Applied Bacteriology Symposium Supplement. 73:58S-68S, 1992.
4. ICMSF. Microbial Ecology of Foods Vol. 1. Factors affecting life and death of microorganisms. New York, Academic Press, 1980.
5. Mossel D.A.A. Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. En: Food Microbiology: Advances and Prospects. T.A. Roberts and F.A. Skinner, (Ed) Society for Applied Bacteriology Symposium Series N° 11. London, Academic Press, p. 1-45. 1983.

6. Jay J.M. Modern food microbiology. 4<sup>o</sup> Edición, New York, Van Nostrand Reinhold, 1992.
7. Mossel D.A.A. & C.B. Struijk. The contribution of microbial ecology to management and monitoring of the safety, quality and acceptability (SQA) of foods. J. Applied Bacteriology Supplement. 73: 1S-22S, 1992.
8. Brackett R. Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. J Food Quality. 10:195-206, 1987.
9. King A.D. & H.R. Bolin. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. Food Technol. 43(2): 132-135, 1989.
10. Liao C.H. & J.M. Wells. Diversity of pectolytic, fluorescent pseudomonas causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. Phytopathology 77:673-677, 1987.
11. Barriga M.I., G. Trachy, C. Willemot & R.E. Simard. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. J. Food Sci. 56: 1586-1588, 1991.
12. Wright C., S. Kominos S. & R. Yee. Enterobacteriaceae y *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. Applied Environm. Microbiol. 31: 453-454, 1976.
13. Lund B. Ecosystems in vegetable foods. J. Applied Bacteriol. Symposium Supplement. 73: 115S-126S, 1992.
14. Smith J.P., H.S. Ramaswamy & B.K. Simpson. Developments in food packaging technology. Part II: Storage aspects. Trends Food Sci. Technol. November 111-113, 1990.
15. Hotchkiss J. & M. Banco. Influence of new packaging technologies on the growth of microorganisms in produce. J. Food Prot. 55:815-820, 1992.
16. Ronk R., K. Carson & P. Thompson. Processing, packaging, and regulation of minimally processed fruits and vegetables. J. Food Technol. 43(2): 136-139, 1989.
17. Ryser E. & E. Marth. Incidence of *Listeria monocytogenes* in products of plant origin. En: *Listeria*, listeriosis and food safety. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, p. 513-530, Inc. 1991.
18. Madden J.M. Microbial pathogens in fresh produce the regulatory perspective. J. Food Prote 55: 821-823, 1992.
19. Martin D.L., T.L. Gustafson, J.W. Pelosi, L. Suárez & G.V. Pierde. Contaminated produce-a common source for two outbreaks of *Shigella* gastroenteritis. Am J. Epidmiol. 124:299, 1986.
20. Centers for Disease Control. *Salmonella oranienburg* gastroenteritis associated with consumption of precut watermelons. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 28:522-523, 1979.
21. Centers for Disease Control. Multistate outbreak of *Salmonella poona* infections-United States and Canada. Morbid Mortal. Weely Rep. 39 (SS-1): 15-57, 1991.
22. Sugiyama H. & K.H. Yang. Growth potential of *Clostridium botulinum* in fresh mushrooms packaged in semi-permeable plastic film. Appl. Microbiol. 30:964-969, 1975.
23. Centers for Disease Control. Botulism-New Mexico. Morbid. and Mortal. Weekly Rep. 27:138, 1978.
24. Hauschild A.H.W. *Clostridium botulinum*. En: Foodborne bacterial pathogens. M. Doyle (Ed.). New York: Marcel Dekker p. 11-189. Inc. 1989.
25. Notermans S., J. Dufrenne & M.H.J. Keijbets. Vacuum packed, cooked potatoes: toxin production by *Clostridium botulinum* and shelf life. J. Food Prot 44:572-575, 1981.
26. Lund B.M., A.F. Graham & S.M. George. Growth and formation of toxin by *Clostridium botulinum* in peeled, inoculated, vacuum packed potatoes after a double pasteurization and storage at 25°C. J. Applied Bacteriol. 64: 241-246, 1988.
27. Solomon H.M. & D.A. Kautter. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in sautéed onions. J. Food Protection 49:618-620, 1986.
28. Centers for Disease Control. International outbreak of restaurant-associated botulism-Vancouver, British Columbia, Canada. Morbid and Mortal. Weekly Rep. 27:138, 1975.
29. Hayashi K., S. Sakaguchi & G. Sakaguchi. Primary multiplication of *Clostridium botulinum* type A in mustard-miso stuffing of «karashi-renkon» (deep fried mustard-stuffed lotus roots). Internatl. J. Food Microbiol. 3:311-320, 1986.
30. Solomon H.M., D.A. Kautter, T. Lilly & E.J. Rhodehamel. Outgrowth of *Clostridium botulinum* in shredded cabbage at room temperature under modified atmosphere. J. Food Prot. 51: 831-833, 1990.
31. Odlaugh T.E. & I.J. Pflug. *Clostridium botulinum* in acid foods. J. Food Prot 41:496, 1978.
32. Slocum G.G., H. Welch & A.C. Hunter. An outbreak of botulism caused by home-canned tomatoes. Food Res. 6:179-187, 1941.
33. Huhtanen C.N., J. Naghski, C.S. Custer & R.W. Russell. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in moldy tomato juice. Applied Environ. Microbiol. 32: 711-715, 1986.
34. Ito K.A., J.K. Chen, M.L. Seeger, J.A. Unverferth & R.N. Kimball. Effect of pH on the growth of *Clostridium botulinum* in canned figs. 43: 1634-1635, 1978.
35. Meyer K.F. & J.B. Gunnison. Botulism due to home canned Bartlett pears. J. Infect. Dis. 45: 135-147, 1929.
36. Montville J. Metabiotic effect of *Bacillus licheniformis* on *Clostridium botulinum*: Implications for home-canned tomatoes. Applied Environ. Microbiol. 44:334-338, 1982.
37. Dujaili J.A. & R.E. Anderson. Aciduric, pH-elevating *Bacillus* which cause nonfermentative spoilage of underprocessed tomatoes. J. Food Sci. 56: 1611-1613, 1991.
38. Rodríguez J.H., M.A. Cousin & P.E. Nelson. Evaluation of anaerobic growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in tomato juice. J. Food Prot. 55: 672-677, 1992.
39. Noterman S.H.W. Control in fruits and vegetables. En: *Clostridium botulinum*. Ecology and control in foods. A.H.W. Hauschild and K.L. Doods. (Eds). New York. Marcel Dekker, Inc. 1992.
40. Seelinger H.P.R. Listeriosis, man-made?. Acta Microbiologica Hungarica 36(2-3), p. 107-111, 1989.
41. Welshimer H.J. & J. Donker-Voet. *Listeria monocytogenes* in Nature. Applied Microbiol. 21:516-519, 1971.
42. Van Renterghem B., F. Hysman R. Rygole & W. Verstrate. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. J. applied Bacteriol. 71: 211-217, 1991.
43. Beuchat L.R., Berrang M.E. y R.E. Brackett. Presence and public health implications of *Listeria monocytogenes* on vegetables. En: Foodborne listeriosis. Miller A.J., J.L. Smith & G.A. Somkuti. (Eds). Society for Industrial Microbiology. p. 175-181. 1990.
44. Beuchat L.R. & R. Brackett. Inhibitory effect of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. Applied Environm. Microbiol. 56: 1734-1742, 1990.

45. Watkins J. & K.P. Sleath. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. J Appl. Bacteriol. 50: 1-9, 1981.
46. Al-Ghazali M.R. and S.K. Al-Azawi. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in a sewage treatment plant in Iraq. J. Applied Bacteriol. 60:251-254, 1986.
47. Blenden D.C. & F.T. Szatalowicz. Ecological aspects of listeriosis. J. Am Vet Med Assn. 151:1761-1976. 1967.
48. Ho J.L., K.N. Shands, G. Friedland G., P. Eckind & D.W. Fraser. An outybreak of Type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch. Intern. Med. 146:520-524, 1986.
49. Petran R.L., E.A. Zottola & R.B. Gravani. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. J. Foods Sci. 53: 1238-1240, 1988.
50. Archer D.L. Review of the latest FDA information on the presence of *Listeria* in foods. WHO Working Group in Food Listeriosis, Geneva, Switzerland, Feb. 15-19, 1988.
51. Buchanan R.L., H.G. Stahl M.M. Bencivengo & F. del Corral. Comparison of lithium chloride-phenylethanolmoxalactam and modified Vogel-Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry and seafood Appl. Environ. Microbiol. 55:559-603, 1989.
52. Farber J.M., G.W. Sanders & M.A. Johnston. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. J. Food Prot. 52: 456-458, 1989.
53. Heisick J.E., D.E. Wagner M.L. Nierman & J.T. Peeler. *Listeria* spp. found on fresh market produce. Applied.
54. Sizmur K.I. & C.W. Wlaker. *Listeria* in pre-packaged salads. Lancet i:1167, 1988.
55. Bendig J.W.A. & J.E.M. Strangeways. *Listeria* in hospital lettuce. Lancet i:616-617, 1989.
56. Steinbruegge E.G., B.R. Maxcy & M.B. Liewn. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. J. Food Prot. 51:596-599, 1988.
57. Miranda L.D., E. Ortiz de Urbina & M.S. Tapia de Daza. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales de alto consumo en la región venezolana de Cojedes. Presentado en el III Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos, Montevideo, Uruguay, 29 de noviembre-5 de diciembre, 1992.
58. Berrang M., R. Brackett & L.R. Beuchat. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. J. Food Prot. 52:702-705, 1989.
59. Conner D.E., R. Brackett & L.R. Beuchat. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listria monocytogenes* in cabbage juice. Appl. Environ. Microbiol. 52:59-63, 1986.
60. Omary M.B., R.F. Testin, S.F. Barefoot & J.W. Rushing. Packaging effect on growth of *Listeria innocua* in shredded cabbage. J. Food Sic. 58:623-626, 1993.
61. Beuchat L.R. & R. Brackett. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. J. Food Sic. 55:758, 870, 1990.
62. Beuchat L.R. & R.E. Brackett. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated in tomatoes and processed tomato products. Appl. Environ. Microbiol. 57:1367-1371, 1991.
63. Pérez Guaina, V.E. & Tapia de Daza, M.S. Efecto de temperatura y NaCl. en la sobrevivencia der *Listeria monocytogenes* en berro y jugo de berro. XLIII Convención Anual AsoVAC, Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Mérida, Venezuela, Acta Científica Venezolana 44(1) Proc. abstract p. 306. 14-19 de noviembre 1993.
64. Callister S.M. & W.A. Agger. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophyla* y *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. Applied and Environ. Microbiol.. 53:249-253, 1987.
65. Díaz, R., Martínez, A., Tapia, M. & A. Tablante. Enumeración y caracterización de *Aeromonas* sp. en productos de origen animal y vegetal. Presentado en el II Congreso Latinoamericano de Microbiología de Alimentos, Caracas. Proc. Abstract. p. 72. Noviembre 5-10, 1989.
66. Doyle M. & J.L. Schoeni. Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrroms. Applied Environm. Microbiol. 51:449-450, 1986.
67. Solomon H.M., E.J. Rhodehamel & D.A. Kautter. Growth and toxin production under vaccum by *CLostridium botulinum* in sliced raw potatoes with and without sulfite (NaHSO<sub>3</sub>). Presentado en el Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, Chicago 111. Proc. Abstract. p. 168. Julio 10-14, 1993.
68. Macxy R.B. Lettuce salad a carrier of microorganisms of public health significance. J. Food Prot. 41: 435-438, 1978.
69. King A.D., J.A. Magnuson, T. Torok T. & N. Goodman, N. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. J. Food Sci. 56: 459-461, 1991.
70. Beuchat L.R. & R. Brackett. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. Applied Environ. Microbiol. 57:1367-1371, 1991.
71. Abdul-Raouf U.M., L.R. Beuchat & M.S. Ammar. Survival and growth of *Escherichia coli* 0157:H7 on salad vegetables. Presentado en el Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, Chicago, I11. Proc. Abstract p. 170. Julio 10-14, 1993.
72. Zhao T., M. Doyle & R.E. Besser. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in apple cider with and without preservatives. Applied Environ. Microbiol. 59:2526-2530, 1993.
73. Jackson L. & D.A. Golden. Survival of the south american strain of *Vibrio cholera* under various environmental condicions. Presentado en el Institute of Food Technologists 9IFT) Annual Meeting, Atlanta GA. Proc. Abstract p. 172 Junio 25-29, 1994.
74. Bracket R.E. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. En: Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. R.C. Wiley (Ed.) New York-London. Chapman & Hall Inc. 1994.
75. Todd E.C.D. Surveillance of foodborne disease. En: Foodborne Disease Handbook. Diseases caused by bacteria. Y.H. Hui, Gorham, J.R., K.D. Murrel and D.O. Cliver (Eds.) New York. Marcel Dekker Inc. 1994.

Recibido: 18-10-1993

Aceptado : 08-07-1994