

VARIEDAD DE MICROFLORA PRESENTE EN VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) RELACIONADOS CON PROCESOS DE BENEFICIADO

VARIETY OF MICROFLORA PRESENT IN VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) AND ITS RELATIONSHIP WITH CURING PROCESSES

Luna-Guevara, J.J.¹; Ruiz-Espinosa, H.¹; Herrera-Cabrera, E.B.²; Navarro-Ocaña, A.³; Delgado-Alvarado, A.²; Luna-Guevara, M.L.^{1*}

¹Colegio de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Av. San Claudio y Esq. con 18 Sur S/N, Ciudad Universitaria, Col San Manuel, Puebla, Puebla, México. ²Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, Boulevard Forjadores de Puebla 25, Col Santiago Momoxpan, Municipio San Pedro Cholula, Puebla, Puebla, México. ³Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F. México.

Autor de correspondencia: maria.luna@correo.buap.mx

RESUMEN

Se evaluaron grupos indicadores de inocuidad tales como: Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Coliformes Totales (CT) y Hongos y Levaduras (Hyl) para determinar la diversidad de enterobacterias presentes en silicuas verdes (Vv) y beneficiadas (Vb) de vainilla (*Vanilla planifolia*) provenientes de cuatro procesos de beneficiado, considerando que la información microbiológica de los frutos y su relación con tipos de beneficiado es limitada. Los procesos evaluados fueron: rústico (BR1, BR2), tradicional (BT) y semitecnificado (BST). Los análisis microbiológicos identificaron enterobacterias utilizando medios de cultivo selectivos, diferenciales y pruebas confirmatorias con el sistema VITEK. Con las especies identificadas se calcularon los índices de diversidad Simpson (D), Shannon-Wiener (H') y Chao (SChao₁). Los recuentos microbianos reflejaron altos niveles de contaminación microbiológica, las BMA no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en ambos estados de la silicua, a diferencia de CT cuyos valores disminuyeron notablemente (≤ 10 UFC/g). Los H y L se redujeron significativamente con el beneficiado (10^1 a 10^3 UFC/g) excepto en frutos de BR1. Las especies aisladas con mayor frecuencia en Vv y Vb fueron *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*; mientras que *E. coli* y *Citrobacter freundii* fueron identificadas únicamente en Vb. Los índices D, H y SChao₁ reflejaron mayor diversidad en procesos BR1 y BR2. Los resultados obtenidos se enfocan al diseño de acciones preventivas para la inocuidad en el beneficiado de vainilla.

Palabras clave: Microflora, inocuidad, índices de diversidad.

ABSTRACT

The safety indicators groups, such as Total Aerobic bacterial count (TAB), Total Coliform (TC), and Fungi and Yeast (F&Y), to determine the diversity of enterobacteria present in green (Vv) and cured (Vb) vanilla siliques (*Vanilla planifolia*) from four curing processes, considering that the microbiological information of the fruits and their relationship with the types of curing is limited. The processes evaluated



were: rustic (BR1, BR2), traditional (BT) and semi-technified (BST). The microbiological analyses identified enterobacteria using selective, differential cultivation media, and confirming tests with the VITEK system. With the species identified, the Simpson (D), Shannon-Wiener (H') and Chao (SChao₁) diversity indices were used. The microbe recounts reflected high levels of microbiological contamination; AMB did not present significant differences ($p > 0.05$) in both states of the silique, in contrast with TC whose values decreased notably (≤ 10 UFC/g). The F&Y decreased significantly with curing (10^1 to 10^3 UFC/g), except in BR1 fruits. The species isolated with highest frequency in Vv and Vb were *E. aerogenes*, *E. cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*, while *E. coli* and *Citrobacter freundii* were identified only in Vb. The D, H and SChao₁ indices reflected a higher diversity in the BR1 and BR2 processes. The results obtained are focused on the design of preventive actions for the safety of vanilla curing process in vanilla curing.

Key words: Microflora, safety, diversity indices.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es el segundo saborizante natural más importante en la industria alimentaria cuya demanda sostenida duplica la oferta actual de producción (Anilkumar, 2004; SAGARPA, 2010). El 95% de la producción mundial se obtiene de los frutos procesados (silicuas) de *V. planifolia* (Azofeifa et al., 2014), y debe mantener requisitos de calidad y cumplir con requerimientos de inocuidad. En relación con estos últimos la vainilla puede presentar contaminación por agentes bacterianos, virales y especies fúngicas, causando pérdidas significativas en los frutos verdes. Algunos de los géneros aislados más importantes son *Azotobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Colletotrichum* (Odoux, 2011). Para darle valor agregado al fruto en estado verde, se somete al proceso de beneficiado (Dignum et al., 2001) donde se desarrollan reacciones enzimáticas, procesos térmicos, y una importante actividad microbiana, responsables en parte de la generación del sabor y olor de la vainilla beneficiada (Ranadive, 1994), sin embargo, también en silicuas beneficiadas se han aislado los patógenos *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Serratia* sp., entre otros (Roling et al., 2001). La información acerca de la contribución microbiológica que realizan estos géneros sobre la inocuidad de las vainas beneficiadas, es limitada, por tal motivo, se cuantificó, aisló e identificó la microflora presente en frutos verdes y beneficiados de vainilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la región del Totonacapan de Papantla, Veracruz, México (20° 27' N y 97° 19' O). Para la selección y clasificación de los procesos de beneficiado se recabó información de campo mediante el uso de un instrumento evaluativo de 91 reactivos, e identificaron cuatro sistemas de beneficiado: (Beneficio 1: BR1), (Beneficio 2: BR2), (Beneficio 3: BT), (Beneficio 4: BST).

Material vegetal. Se obtuvieron 400 muestras de frutos verdes y beneficiados sin daño físico ni crecimiento microbiológico aparente provenientes de los diferentes beneficiados locales. Se utilizaron las normas: NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994 para Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), organismos Coliformes Totales (CT), Mohos y Levaduras, respectivamente. Para *Salmonella* se recurrió a la NOM-114-SSA1-1994. Para el aislamiento de la microflora se realizó un enriquecimiento previo, de acuerdo con Roling et al. (2001), mientras que para la identificación, se seleccionaron: morfologías coloniales y pruebas bioquímicas básicas IMViC. Las pruebas confirmatorias fueron mediante el sistema VITEK (BioMérieux Inc. Missouri, USA), con tarjetas de Gram negativos GNI (BioMérieux Inc. Missouri, USA); y para el cálculo de índices de diversidad en silicuas beneficiadas fue acuerdo a Shannon-Wiener (H') (Ecuación 1), Shannon y Weaver (1949), Simpson (D) (Ecuación 2), Hunter y Gastón, (1988), y Chao (Ecuación 3).

Índice de Shannon-Wiener (H')

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Ecuación 1

Índice de Simpson (D)

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{n=i}^s n_i(n_i-1)$$

Ecuación 2

Índice de Chao (SChao₁)

$$SChao_1 = S_{obs} + \left(\frac{n_1^2}{2n_2} \right)$$

Ecuación 3

Donde: p_i = Proporción de individuos de la especie i respecto al total, s = Número de especies,

S_{obs} =Número de especies observadas, n_1 =Número de especies observadas i , n_2 =Número de especies observadas dos veces.

Se desarrolló un diseño completamente al azar teniendo como fuentes de variación el tipo de frutos (verdes y beneficiados) y tipo de beneficiado (BR1, BR2, BST y BT), considerando un análisis de varianza (ANOVA) con $\alpha=0.05$. Los resultados fueron evaluados con el paquete estadístico MiniTab (versión 17), teniendo como respuestas los recuentos microbianos de los grupos indicadores analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación del cuestionario a productores (Cuadro 1) aportó la descripción en cada etapa de los procesos de beneficio aplicados localmente, identificando nueve etapas,

las cuales presentan diferencias en cuanto a condiciones de recepción y marchitamiento de las silicuas; abreviándolos de la siguiente forma: beneficiado rústico (BR1 y BR2), tradicional (BT) y semitecnificado (BST).

De acuerdo con Dignum *et al.* (2001) y Odoux (2011) el beneficiado incluye las etapas de marchitamiento (tratamiento térmico) que interrumpe la **maduración** manteniendo la actividad enzimática del proceso fermentativo; el **sudado** que consiste en ciclos de exposición de silicuas al sol y almacenarlas en canastas o contenedores de madera para resguardar la temperatura y humedad; el **secado** o tendido de silicuas para prevenir crecimiento de microorganismos y el **acondicionamiento** de silicuas en cajas durante tres a cuatro meses para obtener el aroma característico.

Análisis microbiológicos

La contaminación de la vainilla puede ocurrir durante la cosecha o etapas del manejo y procesamiento de los frutos (silicuas) en el beneficiado (Sarter, 2011). Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos de los indicadores sobrepasaron los límites permitidos por la NOM-182-SCFI-2011 (Cuadro 2).

Las BMA presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre tipos de beneficiado mostrando valores más altos en vainas verdes (2.8×10^5 UFC/g) y beneficiadas (1.2×10^5 UFC/g) provenientes del sistema BR1. De acuerdo con los reportes de McKee (1995) los recuentos totales o BMA en especias entre las cuales está considerada la vainilla, varían entre 10^4 a 10^8 UFC/g y dependen del tratamiento que hayan recibido previamente a su consumo tales como, lavado, escaldado

Cuadro 1. Etapas y condiciones consideradas en los sistemas de beneficiado de silicuas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

Etapa del Beneficiado	Beneficiado Rústico 1 (BR1), Rústico 2 (BR2)	Beneficiado Tradicional (BT)	Beneficiado Semitecnificado (BST)
Recepción	Textura rígida, Color amarillento en las puntas, madurez fisiológica (9 meses). Longitud=1° calidad, 17 a 22 para 2° calidad 15 a 17 de 3° calidad 12 a 15 cm, menos de 15 cm, zacatillo.	Madurez fisiológica (9 meses, Textura Rígida Longitud=1° calidad 18 a 20 cm, para 2° calidad 15 a 17 cm y 3° calidad 12 a 14 cm.	Color Verde o Amarillento Longitud=1° calidad 16 a 18 cm, 2° calidad 12 a 15 cm
Despezonado	Desprender la vaina del raquis con un movimiento hacia atrás sin dañar el fruto	Retirar la vaina del raquis con un movimiento hacia atrás	Retirar la vaina del raquis
Primera Clasificación	3 Categorías, 1°, 2° y 3° calidad incluyendo Pinta, Rajada	3 Categorías, 1°, 2° y 3° calidad incluyendo Rajada	2 Categorías, 1° y 2° calidad, separando por tamaño y grosor
Matado	Exposición al sol aprox. 45-50 °C	Inmersión en agua a 100 °C/1-2s	Inmersión en agua a 80-85 °C/10s
Sudado	Cajones de madera envuelto con petate y cobijas a 50 °C durante 24 a 36 h	Cajones de madera a 45 °C durante 12 h	Cajones de madera o plástico a 50-55 °C durante 48 h
Tendido	Se exponen los frutos al sol a 50 °C de 2-4 h dependiendo de condiciones climáticas	T 45 °C durante 3 h dependiendo de condiciones climáticas	Se utiliza T 60 °C durante 2 h
Reposo	Utilizado para enfriar vainas durante 2 a 4 días	Utilizado para enfriar vainas durante 3 días	Utilizado para enfriar vainas durante 3 días con 2 o 3 revisiones
Segunda Clasificación	3-4 Categorías, con flexibilidad, 20 al 35% H y de color café oscuro	3 Categorías y rajada con flexibilidad, gran brillantes, 25% de H y de color café oscuro	3 Categorías con flexibilidad, gran brillantes, 27% de H, color café oscuro y con 16-17.9 de vainillina
Empacado	Bolsas de polietileno	Bolsas de polietileno y después en cajones de madera de cedro	Bolsas de polietileno y al vacío

Cuadro 2. Recuento de grupos indicadores de inocuidad analizados en silicuas verdes (Vv) y beneficiadas (Vb) de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews.

Tipo de beneficiado	Bacterias mesófilas aerobias		Coliformes Totales		Hongos y levaduras	
	Vv	Vb	Vv	Vb	Vv	V b
BR1	2.8×10^5	1.2×10^5	4.8×10^4	<10*	2.1×10^4	9.5×10^4
BR2	2.5×10^3	2.4×10^3	4.5×10^3	<10*	2.3×10^3	1×10^2
BT	6.2×10^4	6.3×10^3	4.1×10^4	<10*	1.6×10^5	1×10^3
BST	2.1×10^3	4.3×10^3	2.2×10^3	<10*	4.2×10^4	1.5×10^2

**Salmonella* no fue detectada en las silicuas analizadas en 25 g de muestra. BR1, BR2, corresponde a los beneficiados rústicos, BT beneficiado tradicional y BST beneficiado semitecnificado.

y deshidratado. El otro grupo analizado fueron los CT conformado por los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, y en general los recuentos en frutos verdes fueron mayores en BMA con diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$), siendo los recuentos más altos en silicuas utilizadas en beneficios BR1 y BR2 con valores de 4.8×10^4 y 4.5×10^3 UFC/g, respectivamente.

Los CT en silicuas beneficiadas disminuyeron notablemente (valores estimados menores a 10 UFC/g), lo cual puede atribuirse a condiciones del marchitamiento. Según lo reportado por Te Giffel *et al.* (1996) las comunidades bacterianas presentes en los frutos verdes después del marchitamiento (inmersión en agua caliente 65-70 °C por 2 min) se ven inhibidas, sin embargo, pueden persistir especies del género *Bacillus* sp., debido a su naturaleza termofílica y producción de esporas. Asimismo Havkin-Frenkel y Frenkel, (2006) reportaron que actividad de agua (0.84-0.89), contenido de vainillina (2.5%) y humedad (25% a 30%) son factores que tienen un efecto inhibitorio sobre la microflora presente en vainas beneficiadas. Los recuentos de H y L en silicuas verdes alcanzaron valores de entre 2.3×10^3 y 1.6×10^5 UFC/g (Cuadro 2), lo cual de acuerdo con Tombe *et al.* (1982) los principales hongos que afectan a la vainilla corresponden a *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Sclerotium* sp. y *Colletotrichum* sp., mismos que además de infectar al fruto son capaces de dañar tallos, raíces, hojas y brotes. Los valores de H y L en silicuas beneficiadas se redujeron de 10^1 a 10^2 UFC/g en comparación con silicuas verdes, excepto en frutos provenientes de BR1 (Cuadro 2); sin embargo, de acuerdo con Roling *et al.* (2001) *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., provocan pudrición negra y verde, en silicuas beneficiadas, además de micotoxinas.

Frecuencia de aislamiento de enterobacterias

Las Figuras 1 y 2 muestran la frecuencia de aislamiento de enterobacterias tanto en silicuas verdes como bene-

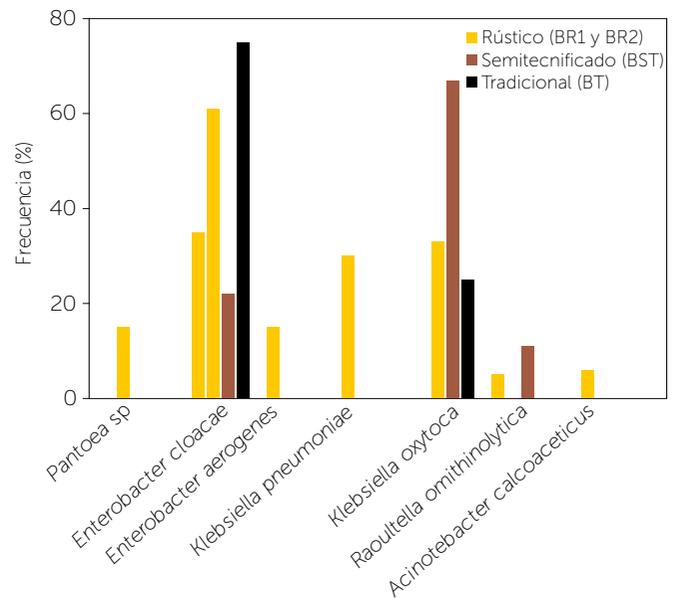


Figura 1. Frecuencia de aislamiento de bacterias aisladas de vainas de vainilla verdes provenientes de diferentes procesos de beneficiado.

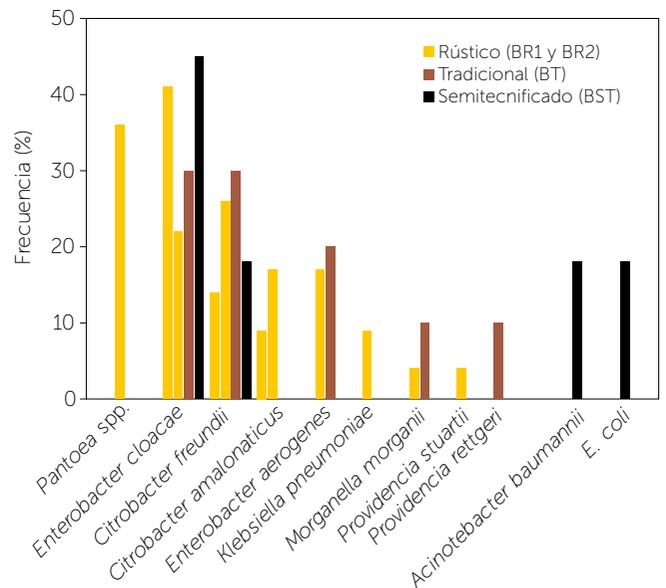


Figura 2. Frecuencia de aislamiento de bacterias aisladas de silicuas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, provenientes de diferentes procesos de beneficiado.

ficiadas, y el género *Enterobacter cloacae* fue aislado en frutos verdes provenientes de los cuatro tipos de beneficiado, de igual forma, *Klebsiella oxytoca* se recuperó en vainas de los procesos BR2, BT y BST, registrando la mayor frecuencia de aislamiento (Figura 1). Los géneros *Acinobacter calcoaceticus* y *Raoutella ornithinolytica* fueron aisladas específicamente en frutos verdes provenientes de los procesos BR2 y BT respectivamente. De acuerdo con García Lozano *et al.* (2013) a *Raoutella ornithinolytica* se le ha relacionado con mecanismos de patogenicidad muy similares al género *Klebsiella* sp. Las vainas provenientes del proceso BR1 presentaron crecimiento de *Pantoea* sp., la cual está asociada con infección de estructuras tales como, hojas, flores y fruto, así como, con formación de manchas amarillentas e incluso necrosis en la planta (Jiménez *et al.*, 2007).

La microflora aislada en frutos beneficiados se muestran en la Figura 2, registrando la mayor frecuencia de aislamiento la especie *Citrobacter freundii* en los cuatro tipos de beneficiado; mientras que la especie *C. amolonaticus* fue aislada particularmente en los procesos rústicos BR1 y BR2; y *Morganella morganii* así como, *Morganella* sp., fueron identificadas en frutos beneficiados provenientes de los procesos BR2 y BT. Las especies *Providencia stuartii*, *Acinobacter baumannii* y *Escherichia coli* fueron las que presentaron menor frecuencia de aislamiento, y específicamente *P. stuartii* fue recuperada solamente en vainas sometidas al proceso BR2, mientras que *A. baumannii* y *E. coli* se identificaron en frutos procesados por BST. Cabe mencionar que las vainas procesadas con BST alcanzaron temperaturas aproximadas de 80 °C (Cuadro 1) durante el marchitamiento, de ahí que la presencia de las enterobacterias mencionadas pudiera deberse a una recontaminación en etapas posteriores del proceso de beneficiado, lo anterior coincide con lo reportado por Sarter (2011). Algunos estudios sugieren que la vainillina contenida en frutos beneficiados (2.5%) tiene efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Samonella entérica* debido a su habilidad para afectar la integridad de la membrana citoplasmática e inhibir la actividad respiratoria (Fitzgerald *et al.*, 2004; Rupasinghe *et al.*, 2006). Sin embargo McKee (1995) reporta que la sobrevivencia de *E. coli* y *Bacillus cereus* en especias se atribuye a las condiciones ambientales y de manipulación por parte de los productores durante su procesamiento.

Microflora en silicuas verdes y beneficiadas

Las especies *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae* y

Klebsiella pneumoniae fueron las que se aislaron en frutos verdes y beneficiados. Específicamente *Klebsiella pneumoniae* se observó en BR1 y BR2 en frutos verdes y beneficiados, mientras que para *E. aerogenes* fue posible registrar su presencia en frutos verdes de BR1 y en beneficiados de BR2 y BT. Las especies mencionadas tienen en común la temperatura óptima de crecimiento cercana a los 37 °C, la cual se alcanza en los sistemas de producción y condiciones de almacenamiento durante el beneficiado de la vainilla. Lo anterior coincide con lo evaluado por McKee (1995) quien aisló a *Enterobacter* sp., *Clostridium* sp., *E. coli* y *Klebsiella* sp., en especias expuestas a condiciones de almacenamiento similares a las mencionadas.

Diversidad de microflora en silicuas beneficiadas

El Cuadro 3 registra los índices de diversidad de Shannon-Wiener (H'), Simpson (D) y SChao₁, obtenidos a partir del aislamiento e identificación de enterobacterias presentes en silicuas beneficiadas. Los valores de (H') oscilaron de 1.23 a 1.77, siendo mayor en frutos provenientes de BR2, de acuerdo con Pla (2006) los valores de H' son utilizados para evaluar la abundancia en el número de ciertas bacterias aisladas. En BR2 las especies más abundantes correspondieron a *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca* (Figura 2). Una tendencia similar se observó con los valores del índice D, el cual representa cuantos microorganismos de la misma especie hay dentro de un hábitat, y a este respecto, las silicuas de BR2 y BT presentaron los índices D más altos (0.86 y 0.84) siendo nuevamente *E. cloacae* y *K. oxytoca* predominantes. El otro índice evaluado fue el de SChao₁, el cual resulta útil para aquellas poblaciones que presentan poca abundancia en sus clases, tal como, este estudio enfocado en la identificación de la microflora presente en la familia Enterobacteriaceae. (Hughes *et al.*, 2001), y los resultados registrados de SChao₁ permanecieron entre 4 y 17 correspondientes a los beneficios BST y BR2, sin embargo, en las silicuas provenientes de BST se identificaron las especies *Escherichia coli* y *Citrobacter freundii* ambas del grupo coliforme. Existen reportes que relacionan la presencia y sobrevivencia de *E. coli* en ambientes extraintestinales incluyendo vegetales crudos, suelo de cultivo y agua de riego en los cuales este microorganismo puede encontrar los nutrientes necesarios para su desarrollo (Luna Guevara *et al.*, 2012), mientras que la presencia de *Citrobacter* sp., cobra importancia de acuerdo con lo reportado por Abu-Ghazaleh (2006) quien la detectó en agua de riego y suelo de cultivo. Adicionalmente,

Tschape *et al.* (1995) señalan que los aislamientos de *C. freundii* están relacionados con factores de virulencia homólogos a los descritos por los patogrupos de *E. coli*; asociando a *C. freundii* con casos esporádicos de diarrea infantil.

La microflora aislada en silicuas verdes y beneficiadas denotan la importancia de proponer procesos que aseguren la inocuidad de los frutos de vainilla, sin embargo, estudios recientes Gu *et al.* (2015) reportan que la presencia de ciertas especies microbianas contribuye en el perfil de aroma de la vainilla, de ahí que se requieren estudios enfocados a la participación de la microflora presente en las distintas etapas de su beneficiado, resguardando la inocuidad del fruto sin detrimento de los atributos sensoriales.

CONCLUSIONES

Se detectaron niveles altos de contaminación microbiológica de la microflora en silicuas verdes y beneficiadas, y se hace indispensable contar con mejores sistemas de control en la producción y beneficiado que prevengan la contaminación por microorganismos deteriorativos y patógenos en la vainilla, conservando la inocuidad, atributos de calidad y sensoriales que se requieren para garantizar su comercialización.

AGRADECIMIENTOS

A los productores de vainilla de la región del Totonacapan, Puebla-Veracruz, México, al Fondo SAGARPA-CONACYT, por el financiamiento del proyecto: Mejoramiento de la productividad integral del cultivo de vainilla en México, que fortalezca su competitividad (Clave 190442). Subproyecto (SP09): Implementación de estudios de inocuidad y control de procesos y su impacto sobre el perfil sensorial de la vainilla mexicana.

Cuadro 3. Índices de diversidad y microflora presente en silicuas de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews utilizando diferentes sistemas de beneficiado.

Beneficio	Microorganismos	Índices de diversidad		
		H'	D	SChao ₁
BR1	<i>Pantoea</i> spp. <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i>	1.23	0.70	4
BR2	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia stuartii</i>	1.77	0.86	17
BT	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia rettgeri</i>	1.27	0.84	11
BST	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i>	1.28	0.76	4

Donde BR1, BR2, corresponde a los beneficiados rústicos, BT beneficiado tradicional y BST beneficiado semitecnificado. H': índice Shannon-Wiener, D: Índice de Simpson, Schao₁: índice de Chao.

LITERATURA CITADA

- Abu-Ghazaleh, B. M. 2006. Inhibition of *Citrobacter freundii* by lactic acid, ascorbic acid, citric acid, *Thymus vulgaris* extract and NaCl at 31 °C and 5 °C. *Annals of Microbiology* 56: 261-267.
- Anilkumar, A. 2004. Vanilla cultivation: A profitable agribased enterprise. *Kerala Calling* 2: 26-30.
- Azofeifa J., Paniagua A. García J. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25 189-202.
- Dignum M., Kerler J. Verpoorte R. 2001. Vanilla production: technological, chemical, and biosynthetic aspects. *Food Reviews International*, 17: 119-120.
- Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., 2004. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology* 97: 104-113.
- García-Lozano, T., Plá, F.J.P., Oroval, E. 2013. *Raoultella ornithinolytica* in urinary tract infections. Clinical and microbiological study of a series of 4 oncologic patients. *Medicina Clínica*.
- Gu, F., Chen, Y., Fang, Y., Wu, G., Tan, L. 2015. Contribution of Bacillus Isolates to the Flavor Profiles of Vanilla Beans Assessed through Aroma Analysis and Chemometrics. *Molecules*, 20: 18422-18436.
- Havkin-Frenkel, D., Frenkel, C. 2006. Postharvest handling and storage of cured Vanilla beans. *Stewart Postharvest Review* 2:1-9.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannon, B. J. 2001. Counting

- the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and environmental microbiology*, 67: 4399-4406.
- Hunter P. Gaston M. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*. 26 : 2465-2466.
- Jiménez, O., Contreras, N., Rodríguez, C. 2007. Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerans* aislada en plantas de gloxinia (*Gloxinia alba*). *Bioagro*, 19, 53-57.
- Luna-Guevara, L., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, E., Torres, A., Avelino-Flores, F., Navarro-Ocaña, A., Parada-Guerra, F. (2012). Diversity of enterobacteria associated with tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits and greenhouse soils. *Scientia Agropecuaria*, 3: 161-169.
- McKee, L.H. 1995. Microbial contamination of spices and herbs: a review. *LWT-Food Science and Technology*. 28: 1-11.
- NOM-182-SCFI-2011. Norma Oficial Mexicana NOM-182-scfi-2011, Vainilla de Papantla, extractos y derivados-especificaciones, información comercial y métodos de ensayo.
- Odoux E., 2011 Vanilla curing. *Medicinal and aromatic plants. Industrial profiles*. Vanilla Ed. Odoux E. and Grisoni M. Florida.173 p.
- Pla, L. 2006. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 31: 583-590.
- Ranadive A. S.1994. Vanilla cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. Vol 34. 517-577. En Charalambous G. (ed.) *Developments in food science*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Holanda.
- Roling W. Kerler J. 2001. Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Applied and environmental microbiology*. 5(67): 1995-2002
- Rupasinghe, H., Boulter-Bitzer, J., Ahn, T., Odumeru, J. 2006. Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. *Food Research International* 39:575-580.
- SAGARPA .2010. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana. Consultado: el 15 de noviembre 2015. En: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAINILLA.pdf
- Sarter S. 2011 Microbial Safety of Cured Vanilla Beans .*Medicinal and aromatic plants. Industrial profiles*. Vanilla Ed. Odoux E. and Grisoni M. Florida. 229 p.
- Shannon C. E., Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. Ed. University Illinois Press. Urbana IL. USA
- Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Leijendekkers, S., Rombouts, F. M.1996. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiology*, 13: 53-58.
- Tombe, M., Nurawan, A., Nazarudin, S. B., Tsuchiya, K., Oniki, M., Matsumoto, K. 1991. Experiments on the introduction of biological and cultural control of stem rot disease of vanilla. *Industrial Crops Research Journal (Indonesia)*.
- Tschape, H.; Prager, R.; Streckel, W.; Fruth, A.; Tietze, E.; Bohme, G. 1995. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of hemolytic uremic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiology and Infection* 114: 441-450.

