

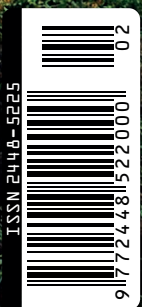
2

julio-diciembre de 2014

ISSN 2448-5225

e-CUCBA

CUCBA | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA



FECHA EFECTIVA DE PUBLICACIÓN: 26 DE DICIEMBRE DE 2014

Nota del editor

Con la intención de llegar a un público más extenso que hacen uso de las tecnologías actuales, se decidió publicar la revista Scientia-CUCBA exclusivamente en formato digital. En México, el Instituto Nacional de Derechos de Autor, establece que se reinicie la serie con un ISSN distinto y a partir del “número uno” para la versión electrónica. Por desgracia, el título para la versión electrónica no puede utilizarse porque “Scientia” es un vocablo ya ocupado con anterioridad por lo que tuvo que proponerse un nombre nuevo: **e-Cucba**. Esto no significa que se trate de otra revista, por ello no será necesario alterar los registros de la versión impresa que de ella se tengan en las bibliotecas.

Esta versión electrónica puede consultarse de manera libre en la dirección: <http://e-cucba.cucba.udg.mx> y está diseñada para imprimirse en papel tamaño carta (21.59 × 27.94 cm).

Serán bienvenidos todos los trabajos en las diferentes áreas de la Biología, Ciencias Agropecuarias y Forestales para su revisión y posible publicación; la “información para los autores” se encuentra en la dirección antes citada. Las propuestas deben dirigirse a: servando.carvajal1@gmail.com

Editor's note

With the intention to make it possible for more readers to have easy access to our publications we have decided to publish our bulletin Scientia-CUCBA exclusively in digital format. Unfortunately, the title to the electronic version can not be used because "Scientia" is a word already occupied previously, so we had to propose a new one: **e-CUCBA**. This does not imply that it is a new journal and therefore libraries should not designate a new title for e-Cucba. However, the Mexican Instituto Nacional de Derechos de Autor requires distinct ISSN number beginning with “number one” for the first electronic volume. Please note this difference in future citations.

The electronic version is available to anyone in: <http://e-cucba.cucba.udg.mx>. The page is designed to print on letter size paper (8.5 × 11 inches).

We welcome articles regarding any aspects of Biology and Agricultural and Animal Sciences and Forestry for review and possible publication. Information for contributors is available at the address cited above. Proposals should be sent to: servando.carvajal1@gmail.com



Vista del Valle de Teuchitlán, desde la zona arqueológica de Guachimontones, municipio de Teuchitlan, Jalisco, México.
Fotografía de Servando Carvajal.

e-Cucba, Año 1, Número 2, julio-diciembre de 2014, es una publicación semestral, editada por la Universidad de Guadalajara, a través de la Coordinación de Investigación, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, C.P. 45225, La Venta del Astillero, Zapopan, Jalisco, México. Teléfono: (33) 3777-1155, <http://e-cucba.cucba.udg.mx>, servando.carvajal@cucba.udg.mx, editor responsable: Servando Carvajal Hernández. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 04 – 2013 – 091314164100 – 203, ISSN: 2448-5225, otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la actualización de este número Angélica María Velázquez Flores de la Coordinación de Tecnologías para el Aprendizaje. Fecha de la última modificación 26 de diciembre de 2014, con un tiraje de un ejemplar.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad de Guadalajara.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

RECTORÍA GENERAL

Iztcoatl Tonatiuh Bravo Padilla
Rector

Miguel Ángel Navarro Navarro
Vicerrector Ejecutivo

José Alfredo Peña Ramos
Secretario General

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Salvador Mena Munguía
Rector

Salvador González Luna
Secretario Académico

José Rizo Ayala
Secretario Administrativo

Coordinación de Investigación

Servando Carvajal
Coordinador de Investigación

Servando Carvajal
servando.carvajal1@gmail.com

María Luisa García Sahagún
mlgsahagun@gmail.com

Editores

Paul C. Kersey
pasapavi85@gmail.com

Auxiliar en la edición

Contenido

Presencia y persistencia de *Listeria* en cuatro
queserías artesanales de Jalisco, México
Presence and persistence of *Listeria* in four
artisanal cheese plants in Jalisco, Mexico Citar
Beatriz Teresa Rosas-Barbosa, Angélica Luis-Juan Morales, Ricardo
Alaniz-de la O, Agustín Ramírez-Álvarez, Juan Paulo Soltero-Ramos,
Rosalba de la Mora-Quiroz, Paul Martin y Christine Jacquet **3**

Efecto de algas marinas en el desarrollo de
Gerbera jamesonii (Asteraceae)
The effect of seaweed on the development of
Gerbera jamesonii (Asteraceae) Citar
María Luisa García Sahagún, Alicia de Luna Vega, César Zúñiga Campa,
Osvaldo Alejandro Bañuelos Gutiérrez y Mariana Silva Echeverría **39**

Ampliación de la distribución del ocelote
(*Leopardus pardalis*, Felidae) a la subcuenca de
San Marcos, Jalisco, México
Expansion of the distribution of the ocelot
(*Leopardus pardalis*, Felidae) into the San
Marcos sub-basin, Jalisco, Mexico Citar
Oscar Báez Montes y Yadira Fabiola Estrada Sillas **47**

Jorge Roberto González-Tamayo Citar
Servando Carvajal **55**

Comite Editorial Internacional 2013-2016

Anatoli Borodanienko

Universidad de Guanajuato,
México.

Alejandro Castillo Ayala

Universidad de Texas A & M.
U.S.A.

Daniel G. Debouck

Centro Internacional de
Agricultura Tropical (CIAT),
Cali, Colombia.

Eric Esteve

Centro Mas Bove. Tarragona,
España.

René Funes Rodríguez

Centro Interdisciplinario de
Ciencias Marinas (CICIMAR-
IPN), Baja California,
México.

Steve Gliesman

Universidad de California,
Campus Santa Cruz. U.S.A.

Rafael Gómez Kasky

Universidad de Las Villas,
Cuba.

Eduardo González Izquierdo

Universidad de Pinar del Río,
Cuba.

David Hansen

Midamerican International
Agricultural Consortium,
Iowa State University. U.S.A.

Ángel Luque Escalona

Universidad de Las Palmas,
Gran Canaria, España.

Anderson Ferreira P.**Machado.**

Universidade Estadual de
Feira de Santana, BA. Brasil

Xavier Navarro Acebes

Departament de Biología
Cel•lular, de Fisiología i
d'immunologia, Bellaterra,
España.

Guillermo A. Navarro

Centro Agronómico Tropical
de Investigación y Enseñanza
(CATIE) - Turrialba, Costa
Rica.

Michael F. Notan

Collage of Agriculture,
Food & Natural Resources,
University of Missouri,
Columbia, U.S.A.

Oliver Pratseval Algels

Centro de Tecnología de la
Carne. Monells (Girona)
España.

Ruperto Quesada Monge

Instituto Tecnológico de
Costa Rica.

Joan Tibau

Centro de Control Porcino.
Monells (Girona) España.

Enrique Verdú Navarro

Departament de Biología
Cel•lular, de Fisiología i
d'immunologia, Bellaterra,
España.

Francisco Villalpando Ibarra

Organización Meteorológica
Mundial (OMM), Ginebra,
Suiza.



Es una publicación de la Universidad de Guadalajara, que tiene el propósito de difundir el conocimiento generado en Biología, ciencias Agropecuarias y Forestales, entendidas en sentido amplio, así como los resultados de los trabajos de investigación científica desarrollados en sus centros universitarios y en otras instituciones tanto nacionales como del extranjero. Se publican trabajos originales e inéditos en español, inglés, portugués y francés; cada artículo contiene un resumen en español y en inglés, además del propio de la lengua en que esté escrito. No hay límites en el número de páginas ni en la cantidad de fotografías a color.

Diseño y maquetación

ORGÁNICA EDITORES

Saulo Cortés | José Manuel Sánchez

🌐 www.organicaeditores.mx

Presencia y persistencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales de Jalisco, México

Presence and persistence of *Listeria* in four artisanal cheese plants in Jalisco, Mexico

Beatriz Teresa Rosas-Barbosa¹, Angélica Luis-Juan Morales¹, Ricardo Alaniz-de la O¹, Agustín Ramírez-Álvarez¹, Juan Paulo Soltero-Ramos^{1,2}, Rosalba de la Mora-Quiroz^{1,3}, Paul Martin⁴ y Christine Jacquet⁵

¹Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Salud Pública, Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, La Venta del Astillero, Zapopan 44110, Jalisco, México. Tel: (33) 3777-1151; Fax: (33) 6682-0574.

²Morelos 20, C.P. 48150, Cuautla, Jalisco, México.

³Boehringer Ingelheim Vetmedica, Calle 30 No. 2614, Zona Industrial, Guadalajara 44940, Jalisco, México.

⁴Laboratoire des *Listeria* - Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Dirección actual: Direction scientifique des laboratoires, Anses, 27-31 avenue du General Leclerc, 94701 - Maisons- Alfort.

⁵Laboratoire des *Listeria* - Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Dirección actual: 12 rue de la Convention, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France.

✉ beatrizr@cucba.udg.mx
brbrosas@gmail.com

Citar

Resumen

Con el propósito de determinar la presencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales (A, B, C y D) productoras de quesos blandos Adobera, Fresco, Panela y Requesón, se colectaron 392 muestras a partir de leche cruda, cuajo, cuajada, quesos, equipos, superficies, piso, escobas y cepillos empleados para la limpieza, durante un período de 21 meses comprendidos de febrero 1999 a octubre del 2000. El aislamiento e identificación de *Listeria* se basó en las metodologías descritas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (Food and Drug Administration, FDA) y US Department of Agriculture (USDA), respectivamente. Se encontró que la frecuencia de *Listeria* por quesería fue, en A: 55 %, B: 33 %, C: 26 % y D: 7 %. Las superficies, el piso y los enseres de limpieza tuvieron los mayores porcentajes de muestras positivas. Las especies aisladas fueron: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii*. Once (18 %) de las 59 muestras de queso procedentes de las queserías A y C, fueron positivas a *Listeria monocytogenes* que significó una fuente de infección para los consumidores. En la quesería A, se encontraron los serovares 1/2a, 1/2b, 1/2 inmóvil y 4 d. Los perfiles de macrorrestricción de DNA del serotipo 1/2b

mostraron 3 patrones estrechamente relacionados, uno de ellos se recuperó durante un período de 21 meses. En la planta C sólo se aisló el serovar 4b identificándose 4 patrones de DNA, uno de los cuales estuvo presente por un período de 15 meses. *L. innocua* fue la única especie encontrada en la quesería B. La baja frecuencia de *Listeria* en la quesería D se relacionó con el uso de agua hirviendo o suero calentado a 90 °C para limpiar pisos, equipos y superficies.

Palabras clave: Adobera, Panela, Requesón, contaminación.

Abstract

In order to determine the presence of *Listeria* in four artisanal dairies (A, B, C, D) that produce soft cheeses called Adobera, Fresco, Panela and Requesón, 392 samples were collected from raw milk, rennet curd, cheese equipment, surfaces, brooms, and brushes used for cleaning, over a 21-month period from February 1999 to October 2000. Isolation and identification of *Listeria* was conducted following the methodologies described by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and Department of Agriculture (USDA), respectively. Findings showed that the frequency of *Listeria* per dairy was: Plant A: 55 %; B: 33 %; C: 26 %; and D: 7 %. Surfaces, floor and cleaning uten-

sils had the highest percentages of positive samples. The species isolated were: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, and *L. ivanovii*. Eleven (18 %) of 59 cheese samples were positive for *Listeria*, and cheeses from Plants A and C represented sources of *L. monocytogenes* infection in consumers. *L. monocytogenes* was isolated at two plants. At one (A), *L. monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2 non-motile, as well as 4b were identified. DNA macro-restriction profile analysis showed three clusters for *L. monocytogenes* serovar 1/2b, of which one was recovered throughout the 21-month period.

At the other plant (C) only *L. monocytogenes* serovar 4b was identified. Four clusters were identified by DNA macro-restriction profile analysis, of which one was present throughout a 15-month period. *L. innocua* was the only species found at Plant B. The low frequency of *Listeria* at Plant D was likely related to the cleaning practice of using boiling water or whey heated to 90 °C to clean floors, equipment and surfaces.

Key words: *Adobera* cheese, *Panela* cheese, *Whey* cheese, contamination.

Introducción

Listeria es un género de bacterias gram-positivas, psicrotóficas no formadoras de esporas cuyo hábitat natural incluye la vegetación en descomposición, el suelo, agua y heces (Seeliger & Jones 1986). *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista causante de la listeriosis, enfermedad rara pero severa que con frecuencia es letal (Wing & Gregory 2002). En los Estados Unidos de Norteamérica, por ejemplo, *L. monocytogenes* causa el 19 % de las muertes asociadas al consumo de alimentos (Scallan *et al.* 2011), mientras que los costos anuales estimados de secuelas de listeriosis en recién nacidos ascienden a 16 millones de dólares y los de listeriosis aguda oscilan entre los 187 a 219 millones de dólares (Buzby *et al.* 1996). En México, la listeriosis no es una enfermedad de reporte obligatorio (Secretaría de Salud 2013), sin embargo, de 1960 a 2011, se reportaron 60 casos (Barriga *et al.* 1981; Solorzano-Santos *et al.* 1989; Bonfil *et al.* 1990; Escárcega *et al.* 1999; Montes *et al.* 1999; Barriga *et al.* 2009; Otero 2011). En catorce de ellos los aislamientos fueron serotipificados siendo el serotipo 4b el responsable de 13 casos (58 %) que estuvieron relacionados con el binomio madre-recién nacido (Barriga *et al.* 1981, Bonfil *et al.* 1990).

Introduction

Listeria is a gram-positive, non-spore forming, psychrotrophic bacterium whose natural habitat includes decayed vegetation, soil, water and feces (Seeliger & Jones 1986). *Listeria monocytogenes* is a major opportunistic pathogen that causes a severe and often lethal disease (Wing & Gregory 2002). In the United States, *L. monocytogenes* causes 19 % of deaths associated with food consumption (Scallan *et al.* 2011). The annual estimated cost of listeriosis sequelae in newborns is 16 million U.S. dollars, while the costs of acute illnesses caused by foodborne listeriosis range from 186 to 219 million dollars (Buzby *et al.* 1996). In Mexico, there is no mandatory reporting of listeriosis as a communicable disease (Secretaría de Salud 2013), but from 1960 to 2011, 60 cases were identified (Barriga *et al.* 1981; Solorzano-Santos *et al.* 1989; Bonfil *et al.* 1990; Escárcega *et al.* 1999; Montes *et al.* 1999; Barriga *et al.* 2009; Otero 2011). In 14 cases, the isolates were serotyped: serovar 4b was responsible for 12 cases, whereas 7 (58 %) involved *L. monocytogenes* serovar 4b, and were related to mothers, newborns and stillbirths (Barriga *et al.* 1981; Bonfil *et al.* 1990).

La investigación de brotes y casos esporádicos de listeriosis transmitida por alimentos muestra que la contaminación de los mismos en las empresas donde se elaboran es un elemento decisivo para la ocurrencia de la enfermedad (Craig *et al.* 1997, Linnan *et al.* 1988, McLauchlin *et al.* 1990). En los últimos 30 años, se ha observado una relación entre la aplicación de medidas para el control de *Listeria monocytogenes* en la industria de alimentos, con una reducción en la frecuencia de alimentos contaminados y de casos de listeriosis (Goulet *et al.* 2001).

Puesto que todas las especies de *Listeria* tienen el mismo hábitat, el aislamiento de cualquiera de ellas puede indicar la posible presencia de *Listeria monocytogenes* (Feresu & Jones 1988). No obstante, en fábricas de alimentos se han encontrado una sola especie de *Listeria*, la persistencia de ciertos serovares de *L. monocytogenes*, o la implantación de clonas en ciertas áreas de la fábrica (Gravani 1999, Jacquet *et al.* 1993, Tompkin 2002). La presencia de *Listeria* en lácteos que se producen a escala industrial se conoce con amplitud (Cox *et al.* 1989, Pritchard *et al.* 1994), pero hasta la fecha no se cuenta con información sobre la presencia de *Listeria* en la producción artesanal de quesos en México.

En el estado de Jalisco, que se localiza en la región occidental de México, los quesos blandos: Panela, Fresco y Adobera, se elaboran de manera artesanal con leche cruda. El queso Panela se moldea en recipientes confeccionados con plantas de la misma familia botánica del bambú, y que se conocen como “carrizo” (*Arundo donax* L.) y “otate” (*Chusquea acuminata* Döll). El queso Fresco se obtiene al moler la cuajada y adquirir su forma mediante el uso de moldes de metal. El proceso de elaboración del queso Adobera requiere que la cuajada se conserve a temperatura ambiente de 24 a 48 h, luego se muele y coloca en moldes rectangulares de madera. El Requesón se produce de manera artesanal a partir de suero hirviendo al que se le añade otro ya fermentado como agente acidificante para aglutinar y precipitar las partículas pequeñas de cuajada, con lo que se obtiene una masa blanda (figura 1).

En un estudio previo, se aisló *Listeria* a partir de quesos blandos producidos en una población

Studies of outbreaks and sporadic foodborne listeriosis have shown that contamination of foods in facilities has been a decisive element in the occurrence of the disease (Craig *et al.* 1997; Linnan *et al.* 1988; McLauchlin *et al.* 1990). In the past 30 years, a relation has been observed between the application of preventive measures for controlling *Listeria monocytogenes* in the food industry, reducing amounts of contaminated food, and the incidence of listeriosis (Goulet *et al.* 2001).

Because all *Listeria* species can share the same habitat, isolation of *Listeria* sp. may indicate the possible presence of *Listeria monocytogenes* in the same location (Feresu & Jones 1988). However, a single species of *Listeria*, the persistence of certain serovars of *L. monocytogenes*, or the implantation of clones in some areas has been found in food-processing facilities (Gravani 1999; Jacquet *et al.* 1993; Tompkin 2002). Although the occurrence of *Listeria* in dairy production has been widely reported, no information on its presence in artisanal cheese production in Mexico is currently available (Cox *et al.* 1989; Pritchard *et al.* 1994).

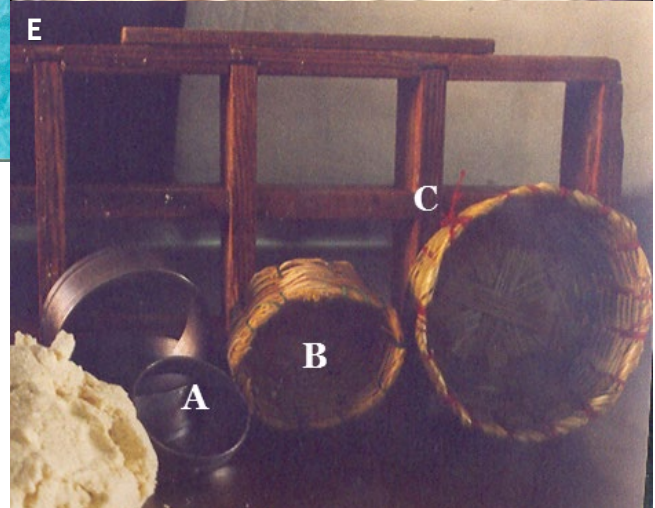
In the state of Jalisco in western Mexico, soft artisanal cheeses called *Panela*, *Fresco* and *Adobera* are elaborated from fresh raw milk. *Panela* is produced by placing curd in molds made from plants similar to bamboo known as *carrizo* (*Arundo donax* L.) or *otate* (*Chusquea acuminata* Döll). *Fresco* cheese is obtained by grinding the curd and then placing it in metal molds, while the process for elaborating *Adobera* requires that the curd sit for 24–48 hours at room temperature before being ground and placed in wooden molds. *Requesón*, finally, is obtained by boiling whey and then adding fermented whey as an acidifying agent to agglutinate and precipitate small particles of curd (figure 1).

Listeria was isolated from soft artisanal cheeses produced in a town in Jalisco (Luis Juan-Morales 1994), so the objective of the present study was to determine the occurrence, point-sources and possible persistence of *Listeria* in four artisanal cheese plants in that state.



Figura 1. Moldes y quesos blandos artesanales: **A** Fresco, **B** Panela, **C** Adobera, **D** Requesón y **E** moldes.

Figure 1. Molds and artisanal soft cheeses. **A** Fresco, **B** Panela, **C** Adobera, **D** Requeson and **E** molds.



de Jalisco, México (Luis-Juan Morales 1994) por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia, fuentes y persistencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales.

Material y métodos

Queserías: Se identificaron 58 queserías artesanales en un municipio de Zapotlanejo, Jalisco, de ellas, se seleccionaron cuatro bajo los siguientes criterios: 1) el queso que se produce en esas plantas se comercializa en Guadalajara, Jalisco; 2) se ubican en calles distintas, con una distancia mínima entre ellas de 400 m; 3) el procedimiento para la elaboración de los quesos es idéntico, así como el empleo de equipos similares; 4) se trabajan los siete días de la semana; 5) no existe relación entre propietarios, empleados o proveedores de leche (lecheros) de las queserías seleccionadas.

Cada quesería se localizó en diferente punto cardinal: “A” al norte, “B” al oeste, “C” al sur y “D” al este. Las queserías A y B procesaban menos de 300 litros de leche por día, las plantas C y D de 300 a 800 litros por día. La A almacenaba el queso en un refrigerador de 35 pies cúbicos, la B en uno de 25, la C en una pequeña cámara de refrigeración y la planta D en un cuarto refrigerado.

Se colectaron 392 muestras en un período de 21 meses (cuadros 2–6), iniciando en febrero y terminando en octubre del siguiente año. Cada quesería fue visitada de 10 a 15 veces en diferentes días de la semana, para tomar muestras y observar los procesos de elaboración, almacenamiento y limpieza. El intervalo mínimo entre una visita y otra fue de 3 semanas. A partir de los ingredientes, medio ambiente, equipo y etapas de elaboración de los quesos se identificaron 24–25 puntos que fueron muestreados en 4 ocasiones obteniéndose de 95 a 100 muestras por quesería, con las excepciones que se muestran en el cuadro 1.

Hubo situaciones que limitaron la recolección simultánea de muestras de todos los puntos, por ejemplo ausencia de queso en refrigeradores o que el punto presentara condiciones diferentes a

Material and methods

Cheese plants: Researchers identified 58 artisanal cheese plants in a cheese-producing town in Jalisco, from which 4 were selected to conduct this study under the following criteria: 1) cheese produced in the plants had to be sold in markets in Guadalajara; 2) the plants had to be located on different streets with a minimum separation of 400 m; 3) plants had to have identical cheese-processing procedures and similar equipment; 4) production had to be continuous during the week; and, 5) no relationships among owners, employees or milkmen at the selected plants were allowed. Each plant was located at one of the cardinal points: “A”, north, “B”, west, “C”, south, and “D”, east. Plants A and B processed less than 300 liters of milk per day, while C and D processed 300–800 liters/day. Plant A stored cheese in a 35-sq. ft. refrigerator; Plant B in a 25-sq. ft. refrigerator; Plant C in a small refrigeration chamber; and Plant D in a refrigerated room.

A total of 392 samples were collected over a period of 21 months (tables 2–6) that began in February and ended in October of the following year. Each plant was visited 10–15 times on different days to take samples and make observations on the production process, storage facilities and cleaning procedures. Each plant had 24–25 sampling sites that covered the ingredients used, the environment, equipment, and every stage of artisanal cheese elaboration. At each plant, 95–100 samples were collected. Each sampling site was sampled 4 times, except as shown in table 1. If a site was sampled 4 times on the first 4 visits (one sample per visit) it was not tested further. Other scenarios limited our possibilities to draw samples from specific sampling sites during our visits; for example, when there was no cheese in the refrigerators, or the sampling site had distinct conditions from those at the equivalent site at another plant, or from the first visit to that site. In such cases no sampling was performed. The period established to sample the same point was at least 3 weeks. Samples were refrigerated, transported to the laboratory, and processed within 24 h after collection.

Milk: 500 ml of raw milk from each can to be processed was pooled to obtain a 4–10-liter

Cuadro 1. Puntos muestreados en más o menos de 4 ocasiones.

Quesería	Punto	Número de veces muestreado	Situación
A	Chiquigüite	5	Muestreado una vez más para confirmar persistencia de contaminación en este equipo
	Cuajada para queso Adobera	3	Por bajo volumen de producción durante 12 meses, los propietarios no permitieron coleccionar otra muestra
	Saco de plástico para escurrir cuajada	0	Inexistente durante el período de muestreo
B	Utensilio para mezclar leche y cuajo	3	Descontinuaron su empleo durante 6 meses
	Cuajada para queso Adobera	3	Por bajo volumen de producción durante 7 meses los propietarios no permitieron coleccionar otra muestra
D	Tela para moldear queso adobera	3	En el segundo año no se pudo encontrar una tela similar a la que utilizaban, para reponer la que se recolectaba

Table 1. Sampled points more or less than 4 times.

Cheese plant	Point	Number of times sampled	Situation
A	Chiquigüite	5	Sampled again to confirm persistence of contamination in this equipment
	Curd for Adobera cheese	3	For low volume production for 12 months, the owners allowed not collect another sample
	Plastic sack for drain curd	0	Nonexistent during the sampling period
B	Utensil used to mix milk with rennet	3	Use was discontinued for 6 months
	Curd for Adobera cheese	3	Due to low production during 7 months, the owners did not permit collection of another sample
D	Cloth for molding Adobera cheese	3	In the second year, no cloth similar to the one they had been using could be found to replace the one collected

Cuadro 2. Frecuencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales.

Categoría	Quesería A Positivas* /Total (% Positivas)	Quesería B Positivas /Total (% Positivas)	Quesería C Positivas* /Total (% Positivas)	Quesería D Positivas /Total (% Positivas)
Ingredientes	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)
Cuajadas	3/7 (43)	0/7 (0)	0/8 (0)	1/8 (12)
Quesos	8/15 (53)	0/16 (0)	3/12 (25)	0/16 (0)
Equipo	24/41 (58)	17/43 (40)	11/44 (25)	1/43 (2)
Superficies en contacto con el alimento [†]	8/12 (66)	5/12 (42)	7/12 (58)	3/12 (25)
Pisos y cepillos	9/12 (75)	10/12 (83)	5/12 (42)	2/12 (17)
Total	52/95 (55)	32/98 (33)	26/100 (26)	7/99 (7)

* Muestras positivas a *Listeria*. † Ingredientes o quesos en diferentes etapas de elaboración y conservación.

Table 2. Frequency of *Listeria* in artisanal cheese plants.

Category	Plant A Positive*/Total (% Positive)	Plant B Positive*/Total (% Positive)	Plant C Positive*/Total (% Positive)	Plant D Positive*/Total (% Positive)
Ingredients	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)
Curds	3/7 (43)	0/7 (0)	0/8 (0)	1/8 (12)
Cheeses	8/15 (53)	0/16 (0)	3/12 (25)	0/16 (0)
Equipment	24/41 (58)	17/43 (40)	11/44 (25)	1/43 (2)
Food contact surfaces†	8/12 (66)	5/12 (42)	7/12 (58)	3/12 (25)
Floor and brushes	9/12 (75)	10/12 (83)	5/12 (42)	2/12 (17)
Total	52/95 (55)	32/98 (33)	26/100 (26)	7/99 (7)

* *Listeria* positive samples. † Ingredients or cheeses in different steps of elaboration and conservation.

las encontradas en la primera visita o con las otras queserías. Las muestras fueron transportadas en refrigeración y procesadas dentro de las 24 h posteriores a su recolección.

Leche: De cada cántara, se recolectaron quinientos mililitros de leche para obtener una muestra compuesta de 4 a 10 litros, a partir de la cual se tomaron 250 ml y la leche restante fue filtrada a través de una torunda de Moore estéril, consistente en una pieza de gasa de algodón de 120 cm de largo por 15 cm de ancho doblada 8 veces (Wells 1971). Se analizaron por separado la torunda de Moore y 25 ml de la muestra de 250 ml.

Cuajo: De la botella que se utilizó el día de la visita se trasvasaron 50 ml a un frasco estéril.

Cuajadas: Con guante estéril se tomaron porciones de diferentes recipientes hasta completar 250 g que se colocaron en bolsas de plástico nuevas, analizándose 25 g de cada tipo de cuajada.

Quesos: Se colectaron muestras compuestas (pool) de 800 g a partir de rebanadas tomadas de 4 a 8 piezas de los quesos Adobera, Panela y Fresco. El peso promedio de cada pieza de queso fue de 100 a 1400 g. Como el Requesón no es un queso moldeado, la muestra compuesta se hizo al tomar porciones de la masa de diferentes recipientes. El volumen de la muestra compuesta se estableció conforme al cuarto criterio del

composite sample. Samples of 250 ml were then obtained from each composite sample. The remaining milk was filtered through a Moore's swab, a piece of cotton gauze 120 cm × 15 cm folded eight times (Wells 1971). Twenty-five milliliters from the 250-ml composite sample and the Moore's swabs were analyzed separately.

Rennet: From bottle to be used the day of the visit to a sterile 50 ml vial were transferred.

Curdled: Using sterile glove portions of different containers were taken to complete 250 g which were placed in new plastic bags, analyzing 25 g of each type of curd.

Cheeses: Composite 800-g samples were collected from single slices of 4-8 pieces of Adobera, Panela and Fresco cheese. Because Requesón is a non-molded whey cheese, no slices were made to obtain a composite sample of this product. The weight range of each slice was 100-1400 g. The volume of the composite sample was determined according to the 14th criteria of the ICMF for *Listeria* sampling in dairy products (Grace 1992), which stipulates a 750-g volume for the composite sample. This number was rounded to 800 g in order to take similar portions from all cheeses (figure 1), and 25-g samples from each composite sample were analyzed.

Cuadro 3. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería A.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año			Positivas/ Total
		Feb	Abr	Jun	Ago	Sep	Dic	Feb	Sep	Oct	
Ingredientes	Leche cruda	o*	o	_†	o	o	_	_	_	◊‡	0/4
	Cuajo	_	_	o	_	o	o	_	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	_	o	L.m1/2b§	o	o	_	_	◊	◊	1/4
	Cuajada para queso Adobera	_	o	L.m1/2a	o	o	o	o	o	L.m1/2b, L.welshimeri‡§	2/3
Quesos	Adobera	o	o	L.m1/2b	_	o	o	L.m1/2b	L.m1/2b	◊	3/4
	Fresco	_	o	_	o	o	o	_	L.m1/2b	◊	1/4
	Panela	L.m1/2a	L.m1/2a	L.m1/2b	o	o	_	◊	◊	◊	3/4
	Requesón	o	_	_	o	o	o	L.m1/2b	o	o	1/3
Equipo	Utensilio para mezclar leche y cuajo	_	_	_	_	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Molino	L.m1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2b, L.welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Equipo para extracción del suero	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	o	L.m1/2b	◊	4/4
	Recipientes para cuajar	_	L.m1/2b	_	_	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Tela para filtrar leche	_	o	o	L.m1/2b, L.welshimeri	_	L.m1/2b	◊	◊	◊	2/4
	Tela para moldear queso Adobera	_	o	o	o	_	o	L.m1/2b	L.m4d	◊	2/4
	Moldes de otate para queso Panela	L.m1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	_	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
	Moldes de madera para queso Adobera	_	L.m1/2a	_	L.m1/2b	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Moldes de metal para queso Fresco	o	o	_	_	o	_	L.m1/2b	◊	◊	1/4
	Chiquigüite*	L.m1/2b	o	L.m1/2b	L.m1/2 inmóvil, L.innocua	o	L.m1/2b	L.m1/2b	◊	◊	5/5
Superficies en contacto con alimento	Manos	L.m1/2b	o	_	o	o	_	_	◊	◊	1/4
	Superficies área procesamiento	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2 inmóvil	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Refrigerador	L.m1/2b	_	L.m1/2b	L.m1/2b	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
Piso y cepillos	Piso del área de procesamiento	_	_	_	L.innocua	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	o	L.m1/2a	L.m1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	L.m1/2b	◊	◊	◊	4/4
	Escoba	L.m1/2a, L.innocua	L.m1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	◊	◊	◊	4/4
Total de Muestras Positivas		8	9	12	8	0	5	5	4	1	52/95

* o No muestreado. † _ Negativo. ‡ ◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. ¶ L.m. *Listeria monocytogenes*. § Catalasa negativa. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 3. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant A.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year			Positive/ Total
		Feb	Apr	Jun	Aug	Sep	Dec	Feb	Sep	Oct	
Ingredients	Raw milk	o*	o	—†	o	o	—	—	—	o‡	0/4
	Rennet	—	—	o	—	o	o	—	o	o	0/4
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	—	o	L.m1/2b§	o	o	—	—	o	o	1/4
	Curd for Adobera cheese	—	o	L.m 1/2a	o	o	o	o	o	L.m 1/2b, L. welshimeri¶	2/3
Cheeses	Adobera	o	o	L.m1/2b	—	o	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	3/4
	Fresco	—	o	—	o	o	o	—	L.m1/2b	o	1/4
	Panela	L.m 1/2a	L.m1/2a	L.m1/2b	o	o	—	o	o	o	3/4
	Requeson	o	—	—	o	o	o	L.m1/2b	o	o	1/3
Equipment	Utensil for mixing milk and rennet	—	—	—	—	o	o	o	o	o	0/4
	Mill	L.m 1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m 1/2b, L. welshimeri	o	o	o	o	o	4/4
	Equipment for whey extraction	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	o	L.m1/2b	o	4/4
	Curdling vats	—	L.m1/2b	—	—	o	o	o	o	o	1/4
	Cloth for Filter Milk	—	o	o	L.m 1/2b, L. welshimeri	—	L.m1/2b	o	o	o	2/4
	Cloth for Molding Adobera Cheese	—	o	o	o	—	o	L.m1/2b	L.m 4d	o	2/4
	Otate Molds for Panela Cheese	L.m 1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	—	o	o	o	o	o	3/4
	Wood Molds for Adobera Cheese	—	L.m1/2a	—	L.m1/2b	o	o	o	o	o	2/4
	Metal Molds for Fresco Cheese	o	o	—	—	o	—	L.m1/2b	o	o	1/4
	Otate Basket (Chiquigüite) #	L.m1/2b	o	L.m1/2b	L.m 1/2 inmóvil, L.innocua	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	5/5
Food contact surfaces	Hands	L.m1/2b	o	—	o	o	—	—	o	o	1/4
	Processing surfaces	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m 1/2 inmóvil	o	o	o	o	o	4/4
	Refrigerator	L.m1/2b	—	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	o	o	o	3/4
Floor and brushes	Processing area floors	—	—	—	L.innocua	o	o	o	o	o	1/4
	Brush for cleaning surfaces and equipment	o	L.m1/2a	L.m 1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	L.m1/2b	o	o	o	4/4
	Broom	L.m 1/2a, L.innocua	L.m 1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	o	o	o	4/4
Total Positive Samples		8	9	12	8	0	5	5	4	1	52/95

* o No sampled. † — Negative. ‡ o Point sampled 4 times, and then no sampled again. ¶ L.m. *Listeria monocytogenes*. § Catalase negative. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter approximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

Cuadro 4. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería B.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año					Positivas/ Total	
		Mar	May	Jun	Aug	Sep	Dic	Feb	Mar	Abr	May	Sep		
Ingredientes	Leche cruda	o*	†	–	–	o	–	‡	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajada para queso Adobera	o	–	–	o	o	o	–	o	o	o	o	o	0/3
Quesos	Adobera	o	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	o	–	–	–	o	o	o	–	◊	◊	◊	◊	0/4
	Panela	–	–	o	o	o	o	o	–	o	–	◊	◊	0/4
	Requesón	–	–	–	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipo	Saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Utensilio para mezclar leche y cuajo	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	–	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	2/3
	Molino	–	–	–	–	o	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Equipo para extracción del suero	o	o	–	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	◊	3/4
	Recipientes para cuajar	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Tela para filtrar leche	o	o	o	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Tela para moldear queso Adobera	o	–	o	–	o	o	o	o	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	1/4
	Moldes de otate para queso Panela	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	–	o	–	–	◊	◊	◊	◊	2/4
	Moldes de madera para queso Adobera	o	o	–	–	o	o	–	o	–	◊	◊	◊	0/4
	Moldes de metal para queso Fresco	o	o	–	–	o	o	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	1/4
Chiquigüite*	o	o	–	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	◊	3/4	
Superficies en contacto con alimento	Manos	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Superficies área procesamiento	–	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
	Refrigerador	<i>L. innocua</i>	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
Piso y Cepillos	Piso del área de procesamiento	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	o	<i>L. innocua</i>	–	–	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Escoba	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
Total de muestras positivas		5	6	5	7	0	0	4	1	0	3	1	32/98	

* o No muestreado. † _ Negativo. ‡ ◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 4. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant B.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year					Positive/ Total	
		Mar	May	Jun	Aug	Sep	Dec	Feb	Mar	Apr	May	Sep		
Ingredients	Raw milk	o [†]	— [†]	—	—	o	—	o [‡]	o	o	o	o	0/4	
	Rennet	—	—	—	—	o	o	o	o	o	o	o	0/4	
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	o	—	—	—	o	o	—	o	o	o	o	0/4	
	Curd for Adobera cheese	o	—	—	o	o	o	—	o	o	o	o	0/3	
Cheeses	Adobera	o	—	—	—	—	o	o	o	o	o	o	0/4	
	Fresco	o	—	—	—	o	o	o	—	o	o	o	0/4	
	Panela	—	—	o	o	o	o	o	—	o	—	o	0/4	
	Requeson	—	—	—	o	—	o	o	o	o	o	o	0/4	
Equipment	Polyethylene sack to drain curd	—	—	—	—	o	o	o	o	o	o	o	0/4	
	Utensil for mixing milk and rennet	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	—	<i>L. innocua</i>	2/3	
	Mill	—	—	—	—	o	o	o	o	o	o	o	0/4	
	Equipment for whey extraction	o	o	—	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	3/4	
	Curdling vats	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	o	4/4	
	Cloth for Filter Milk	o	o	o	—	—	—	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	1/4	
	Cloth for Molding Adobera Cheese	o	—	o	—	o	o	o	o	—	<i>L. innocua</i>	o	1/4	
	Otate Molds for Panela Cheese	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	—	o	—	—	o	o	o	2/4	
	Wood Molds for Adobera Cheese	o	o	—	—	o	o	—	o	—	o	o	0/4	
	Metal Molds for Fresco Cheese	o	o	—	—	o	o	—	<i>L. innocua</i>	o	o	o	1/4	
	Otate Basket (Chiquigüite)*	o	o	—	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	3/4	
	Food contact surfaces	Hands	—	—	—	—	o	o	o	o	o	o	o	0/4
		Processing surfaces	—	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	o	3/4
Refrigerator		<i>L. innocua</i>	—	—	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	o	2/4	
Floor and brushes	Processing area floors	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	o	4/4	
	Brush for cleaning surfaces and equipment	o	<i>L. innocua</i>	—	—	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	2/4	
	Broom	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	o	4/4	
Total Positive Samples		5	6	5	7	0	0	4	1	0	3	1	32/98	

* o No sampled. † Negative. ‡ o Point sampled 4 times, and then no sampled again. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter aproximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

Cuadro 5. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería C.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año					Positivas/ Total	
		May 3	May 24	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May	Sep	Oct		
Ingredientes	Leche cruda	– [†]	–	–	–	◊ [‡]	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajada para queso Adobera	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Quesos	Adobera	–	–	–	o [‡]	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	–	–	o	o	o	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Panela	–	L.m 4b [†]	o	o	o	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	o	o	o	L.m 4b, L. welshimeri	◊	◊	3/4
	Requesón	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipo	Saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada	o	o	o	o	o	o	–	–	–	o	L.m no serotipificada	◊	1/4
	Utensilio para mezclar leche y cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Molino	–	L.m 4b	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Equipo para extracción del suero	–	–	–	o	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Recipientes para cuajar	L. seeligeri	–	–	L.m serotipo no designado	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Tela para filtrar leche	o	o	o	o	–	L.m 4b, L. ivanovii	o	–	o	L.m 4b	◊	◊	2/4
	Tela para moldear queso Adobera	o	o	o	o	–	L.m 4b, L. innocua	o	–	o	–	◊	◊	1/4
	Moldes de otate para queso Panela	–	L.m 4b	–	L.m 4b, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Moldes de madera para queso Adobera	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Moldes de metal para queso Fresco	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Chiquigüite #	o	–	–	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	o	o	L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	2/4	
Superficies en contacto con alimento	Manos	–	L.m 4b	o	L.m 4b	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Superficies área procesamiento	–	–	–	L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Refrigerador	L.m 4b, L. innocua	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
Piso y Cepillos	Pisos de áreas de procesamiento y de refrigeración	–	–	–	L.m 4b	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	–	o	–	L. welshimeri	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	1/4

Cuadro 5 (continuación). Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería C.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año					Positivas/ Total	
		May 3	May 24	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May	Sep	Oct		
	Escoba	<i>L. seeligeri</i>	–	<i>L.m 4b, L. welshimeri</i>	<i>L. m 4b, L. innocua, L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
Total de muestras positivas		3	5	2	9	0	3	1	0	0	2	1	26/100	

†_ Negativo. ‡◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. * o No muestreado. ¶ *L.m. Listeria monocytogenes*. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 5. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant C.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year					Positive/ Total	
		May 3	May 24	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May	Sep	Oct		
Ingredients	Raw milk	– [†]	–	–	–	◊ [‡]	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Rennet	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Curd for Adobera cheese	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cheeses	Adobera	–	–	–	◊ [*]	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	–	–	◊	◊	◊	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Panela	–	<i>L.m 4b</i> [¶]	◊	◊	◊	<i>L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	<i>L.m 4b, L. welshimeri</i>	◊	◊	3/4
	Requeson	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipment	Polyethylene sack to drain curd	◊	◊	◊	◊	◊	◊	–	–	–	◊	<i>L.m not serotyped</i>	◊	1/4
	Utensil for mixing milk and rennet	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Mill	–	<i>L.m 4b</i>	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Equipment for whey extraction	–	–	–	◊	◊	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Curdling vats	<i>L. seeligeri</i>	–	–	<i>L.m serovar undesignate</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Cloth for Filter Milk	◊	◊	◊	◊	–	<i>L.m 4b, L. ivanovii</i>	◊	–	◊	<i>L.m 4b</i>	◊	◊	2/4
	Cloth for Molding Adobera Cheese	◊	◊	◊	◊	–	<i>L.m 4b, L. innocua</i>	◊	–	◊	–	◊	◊	1/4
	Otate Molds for Panela Cheese	–	<i>L.m 4b</i>	–	<i>L.m 4b, L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Wood Molds for Adobera Cheese	◊	–	–	–	◊	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Metal Molds for Fresco Cheese	◊	–	–	–	◊	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Otate Basket (Chiquigüite)*	◊	–	–	<i>L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri</i>	◊	◊	<i>L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	◊	◊	2/4	

Table 5 (continuation). Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant C.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year					Positive/ Total
		May 3	May 24	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May	Sep	Oct	
Food contact surfaces	Hands	–	L.m 4b	o	L.m 4b	o	o	–	◊	◊	◊	◊	2/4
	Processing surfaces	–	–	–	L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Refrigerator	L.m 4b, L. innocua	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L.m 4b, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
Floor and brushes	Processing area floors	–	–	–	L.m 4b	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Brush for cleaning surfaces and equipment	–	o	–	L. welshimeri	o	o	–	◊	◊	◊	◊	1/4
	Broom	L. seeligeri	–	L.m 4b, L. welshimeri	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
Total Positive Samples		3	5	2	9	0	3	1	0	0	2	1	26/100

* o No sampled. †_ Negative. ‡ ◊ Point sampled 4 times, and then no sampled again. ¶ L.m. *Listeria monocytogenes*. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter approximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

Cuadro 6. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería D.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año			Positivas/ Total		
		Abr	May	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May		Sep	
Ingredientes	Leche cruda	–†	–	–	–	◊‡	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	–	–	–	L. innocua	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cuajada para queso Adobera	o*	–	–	o	o	o	–	–	◊	◊	◊	0/4
Quesos	Adobera	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	o	–	–	–	o	o	o	o	o	–	–	0/4
	Panela	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Requesón	o	–	–	o	o	–	–	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipo	Saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada	o	o	o	o	o	–	–	–	–	–	o	0/4
	Utensilio para mezclar leche y cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Molino	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Equipo para extracción del suero	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Recipientes para cuajar	–	–	–	L. innocua	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Tela para filtrar leche	–	o	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Tela para moldear queso Adobera	–	o	o	o	o	–	–	o	o	o	o	0/3
	Moldes de otatell para queso Panela	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Moldes de madera para queso Adobera	o	o	–	o	o	o	–	–	–	–	◊	0/4

Cuadro 6 (continuación). Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería D.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año			Positivas/ Total	
		Abr	May	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May		Sep
Superficies en contacto con alimento	Moldes de metal para queso Fresco	o	o	-	-	o	o	o	-	-	◊	0/4
	Chiquiüite*	o	o	-	-	o	o	-	o	-	◊	0/4
	Manos	-	-	o	-	o	o	o	o	o	<i>L. innocua</i>	1/4
	Superficies área procesamiento	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Piso y Cepillos	Refrigerador	-	-	<i>L. innocua</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Pisos de áreas de procesamiento y de refrigeración	-	-	<i>L. innocua</i>	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	o	-	-	-	o	o	-	◊	◊	◊	0/4
	Escoba	-	-	-	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
Total de muestras positivas		0	0	2	4	0	0	0	0	0	1	7/99

†_ Negativo. ◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. * o No muestreado. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 6. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant D.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year			Positive/ Total	
		Apr	May	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May		Sep
Ingredients	Raw milk	- [†]	-	-	-	◊ [†]	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Rennet	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	-	-	-	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Curd for Adobera cheese	o [*]	-	-	o	o	o	-	-	◊	◊	0/4
Cheeses	Adobera	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	o	-	-	-	o	o	o	o	o	-	0/4
	Panela	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Requesón	o	-	-	o	o	-	-	◊	◊	◊	0/4
Equipment	Polyethylene sack to drain curd	o	o	o	o	o	-	-	-	-	o	0/4
	Utensil for mixing milk and rennet	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Mill	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Equipment for whey extraction	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Curdling vats	-	-	-	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cloth for Filter Milk	-	o	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cloth for Molding Adobera Cheese	-	o	o	o	o	-	-	o	o	o	0/3
	Otate Molds for Panela Cheese	-	-	-	-	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4

Table 6 (continuation). Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant D.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year			Positive/ Total	
		Apr	May	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May		Sep
Food contact surfaces	Wood Molds for Adobera Cheese	o	o	–	o	o	o	–	–	–	◊	0/4
	Metal Molds for Fresco Cheese	o	o	–	–	o	o	o	–	–	◊	0/4
	Otate Basket (Chiquigüite)*	o	o	–	–	o	o	–	o	–	◊	0/4
	Hands	–	–	o	–	o	o	o	o	o	<i>L. innocua</i>	1/4
	Processing surfaces	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Refrigerator	–	–	<i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Floor and brushes	Processing area floors	–	–	<i>L. innocua</i>	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Brush for cleaning surfaces and equipment	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	0/4
	Broom	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
Total Positive Samples		0	0	2	4	0	0	0	0	0	1	7/99

†_ Negative. ‡◊ Point sampled 4 times, and then no sampled again. * o No sampled. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter aproximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

ICMF para el muestreo de *Listeria* en productos lácteos (Grace 1992), que establece un volumen de 750 g, el cual fue redondeado a 800 g para tomar porciones similares de todos los quesos (figura 1). Se analizaron 25 g de cada muestra compuesta.

Equipos y superficies en contacto con alimento: Se usaron gasas estériles para frotar los equipos (1–5 gasas por equipo) y superficies (1000 cm², una gasa por cada 200 cm², 5 gasas por superficie). Cuando las superficies o el equipo se encontraban secos, se humedeció la gasa con agua peptonada (0.1 % peptona de caseína). Se muestrearon las telas para filtrar leche y moldear queso Adobera cortando porciones representativas de acuerdo a su tamaño (13–329 cm²). En general, las telas se humedecían antes de su uso, por ello, se colectaron, dos telas secas y dos telas húmedas en cada quesería, excepto en la quesería D donde las telas para filtrar leche no fueron humedecidas. Para muestrear las manos a cada trabajador se le dio una gasa quién la frotó como si fuera una toalla para secarse las manos. Las muestras del equipo y otras superficies en contacto con alimentos se tomaron por la mañana, antes de iniciar la

Equipment and food-contact surfaces: Sterile cotton gauzes were firmly rubbed over equipment (1–5 per piece) and surfaces (1000 cm², one gauze for each 200 cm², 5 gauzes per surface). When surfaces or equipment were dry, the gauze was moistened with water peptone (0.1% casein peptone). Cloths for filtering milk and molding *Adobera* were sampled by cutting representative portions according to size (13–329 cm²). Cloths are usually moistened before use, which is why two dry cloths and two moistened cloths were sampled at each plant, except D, where the cloths for filtering milk were never moistened. Workers' hands were sampled using cotton gauze as a towel to dry them (1 gauze per worker). Equipment and other food-contact surfaces were sampled in the morning before cheese production began, and workers' hands were also sampled during production (figures 2 and 3).

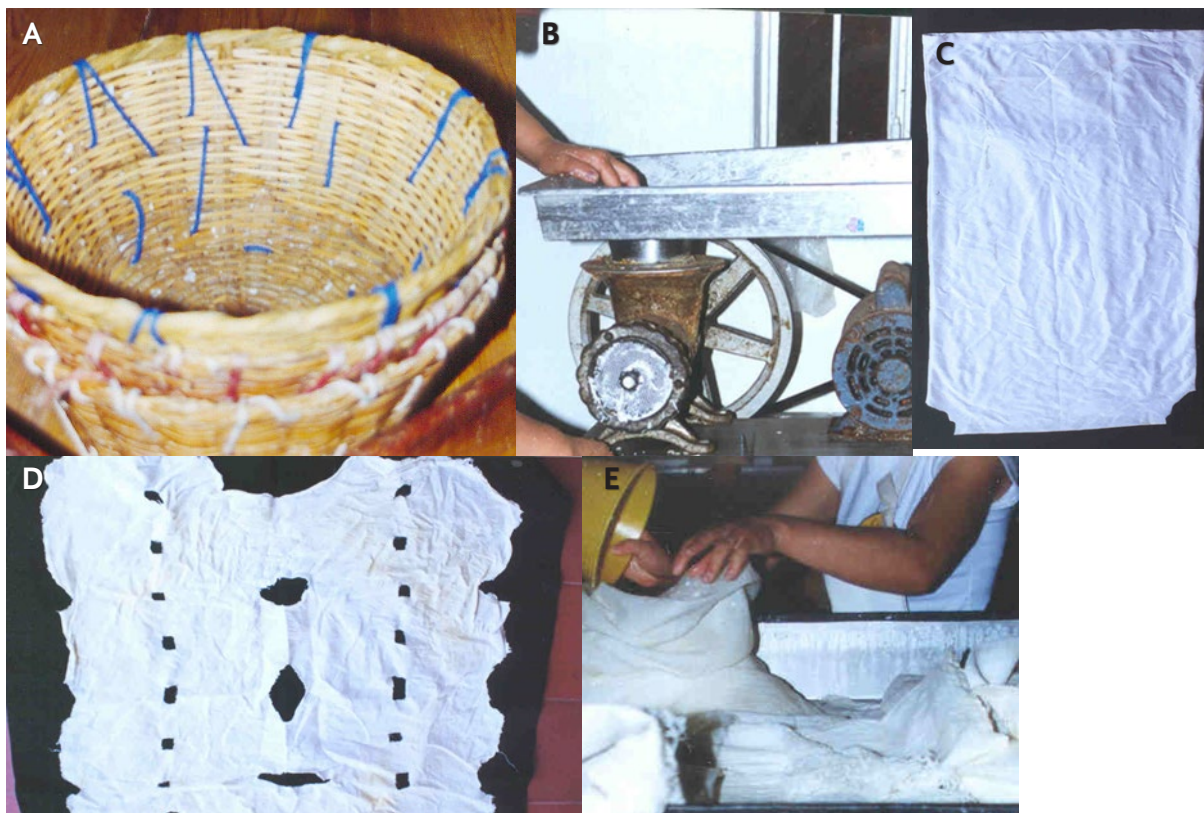


Figura 2. Equipo y superficies en queserías artesanales. **A** chiquigüites; **B** molino; **C** tela para filtrar leche, presenta los cortes hechos para el análisis; **D** tela para moldear queso Adobera, presenta los cortes hechos para el análisis; **E** saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada.

Figure 2. Equipment in artisanal cheese plants. **A** otate baskets (chiquigüites); **B** mill; **C** cloth for filter milk, showing cuts done for analysis; **D** cloth for molding Adobera cheese, showing cuts done for analysis; **E** polyethylene sack to drain curd.



Figura 3. Superficies en queserías artesanales. **A** mesa de madera, **B** manos y mesa de metal, y **C** anaqueles de madera en refrigeradores.

Figure 3. Surfaces in artisanal cheese plants. **A** wood table, **B** hands and metal table, and **C** wood shelves in cooling chamber.

elaboración del queso, en tanto que las manos de los trabajadores se muestrearon durante la producción (figuras 2 y 3).

Pisos y equipo de limpieza: Las muestras del piso las conformaron cinco gasas (una por cada 200 cm²), que se usaron para muestrear 1000 cm², 500 cm² de área próximas a drenajes dentro de la quesería y 500 cm² de los pisos de las área de procesamiento y refrigeración. Para cada escoba se utilizó una gasa para frotar las fibras de plástico con que se barre. También se usó una gasa para frotar las fibras de los cepillos que se utilizan para limpiar superficies y equipos. Los cepillos de las queserías A, B y D fueron de las raíces de un pasto llamado “Zacatón” (*Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.), que se conocen como “escobetas”. Los cepillos de la quesería C fueron de plástico (figura 4).

Floors and cleaning equipment: Composite samples from floors were taken using 5 sterile cotton gauzes (1 gauze for each 200 cm²), which were used to sample 1000 cm² of floor space; 500 cm² from areas near drains inside the plants, and another 500 cm² from floors in the processing and refrigeration areas.

For each broom, a gauze was used to rub the plastic bristles. For two brushes, one gauze was used to rub the cleaning side. The brushes at Plants A, B, and D were made of vegetable fiber obtained from a grass known as *zacatón* (*Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.), but the brushes at Plant C were made of a plastic material (figure 4).



Figura 4. Piso y enseres de limpieza. **A** piso y escoba, y **B** escobetas hechas con raíces de raíces de *Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.

Figure 4. Floor and cleaning equipment. **A** floor and broom, and **B** brush made with roots of *Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.



Detección de inhibidores: A partir de la muestra con 250 ml de leche, se realizó la prueba BSDA (*Bacillus stearothermophilus* Disk Assay) para la detección de inhibidores microbianos en leche (Maturin 1995).

Aislamiento e identificación de *Listeria*: Las muestras fueron inoculadas en 225 ml de Caldo Enriquecimiento *Listeria* (CEL) (Donnelly 1999). Después de 24 a 48 h de incubación a 30 °C, se inocularon 10 µl en los medios de cultivo selectivos Agar cloruro de litio moxalactam (LPM, por sus siglas en inglés) y medio de Oxford modificado (MOX). El LPM y el MOX fueron preparados conforme a lo descrito por Lee McClain (Donnelly *op. cit.*), excepto que la concentración de cloruro de litio del MOX (Donnelly *op. cit.*) fue reducida de 15 a 10 g/l por observarse, en estudios anteriores, un efecto inhibitorio para algunos aislamientos de *Listeria* a la concentración 15 g/l (Luis Juan Morales, com. pers.). LPM Y MOX se incubaron por 48 h a 30 °C y 37 °C, respectivamente (figura 5).

Detection of inhibitory substances: *Bacillus stearothermophilus* Disk Assays (Maturin 1995) were performed to detect inhibitory substances in milk.

Isolation of *Listeria* and biochemical identification: Samples were inoculated in 225 ml of *Listeria* enrichment broth (Donnelly 1999). At the sampling sites where gauzes were used, up to 6 were employed. The gauzes used at each sampling site were placed in the same jar with 225 ml of enrichment broth. After 24 and 48 h of incubation at 30 °C, 10 µl from each enrichment broth were plated onto two selective media: lithium chloride-phenylethanol-moxalactam agar (LPM), and modified Oxford agar (MOX). LPM was prepared as described by Lee and McClain (Donnelly *op. cit.*). MOX was prepared as described by McClain and Lee with the exception of lithium chloride (Donnelly *op. cit.*). Because the 15 g/l concentration of lithium chloride was inhibitory for some *Listeria* isolates (Luis-Juan Morales, pers. comm.), it was decreased to 10 g/l. LPM and MOX were incubated for 48 h at 30 °C and 37 °C, respectively (figure 5).

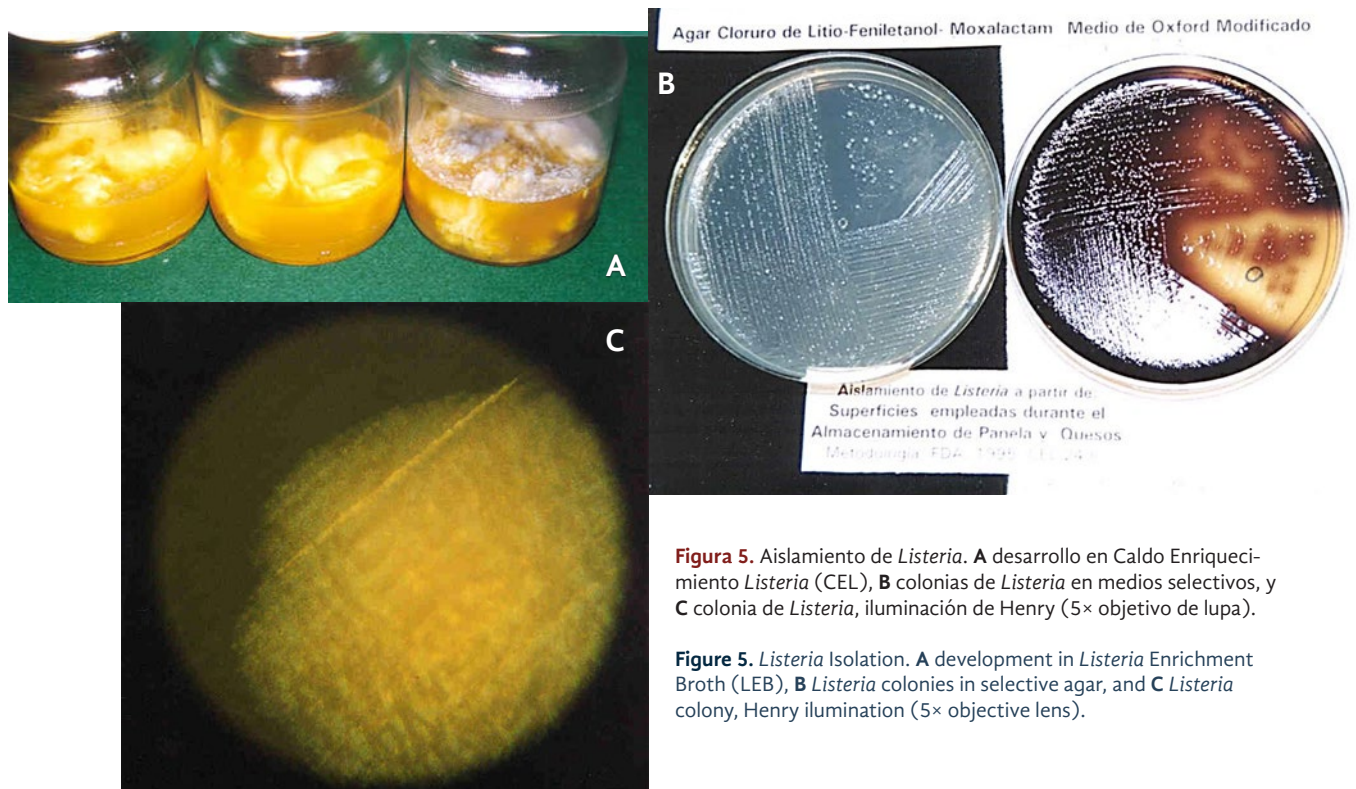


Figura 5. Aislamiento de *Listeria*. **A** desarrollo en Caldo Enriquecimiento *Listeria* (CEL), **B** colonias de *Listeria* en medios selectivos, y **C** colonia de *Listeria*, iluminación de Henry (5× objetivo de lupa).

Figure 5. *Listeria* Isolation. **A** development in *Listeria* Enrichment Broth (LEB), **B** *Listeria* colonies in selective agar, and **C** *Listeria* colony, Henry illumination (5× objective lens).

Las cajas de Petri que contenían Agar cloruro de litio moxalactam (LPM), se iluminaron conforme a la técnica de Henry (Hitchins 1995), que consiste en luz transmitida de manera oblicua para iluminar la caja en un ángulo de 45°, de esta forma, las colonias de *Listeria* presentan una tonalidad azul o azul-gris. Mediante este procedimiento se eligieron de 1 a 6 colonias por caja. Del Agar de Oxford Modificado (MOX) se seleccionaron 1–6 colonias negras. Todas las colonias fueron sembradas en Agar Soya Tripticasa con 0.6 % de extracto de levadura para verificar que fueran cultivos puros. Las especies de *Listeria* se identificaron de acuerdo con el esquema descrito por Hitchins (1995) mediante las pruebas de catalasa, Gram, movilidad, hemólisis, CAMP, metilo rojo, Voges Proskauer, esculin hidrólisis y glucosa, maltosa, manitol, ramnosa y xilosa (figuras 5 y 6).

Using obliquely transmitted light sufficient to illuminate the plate well at a 45° angle (Henry illumination) (Hitchins 1995), 1–6 colonies colored blue-gray to blue were selected from each LPM plate. Also, 1–6 black colonies from MOX were chosen. All selected colonies were streaked for purification on Tryptic Soy Agar with 0.6 % yeast extract. *Listeria* species were identified following the scheme described by Hitchins (1995), using the following tests: catalase, Gram, motility, hemolysis, CAMP, methyl red, Voges Proskauer, esculin hydrolysis and glucose, maltose, mannitol, rhamnase, and xylose fermentation (figures 5 and 6).

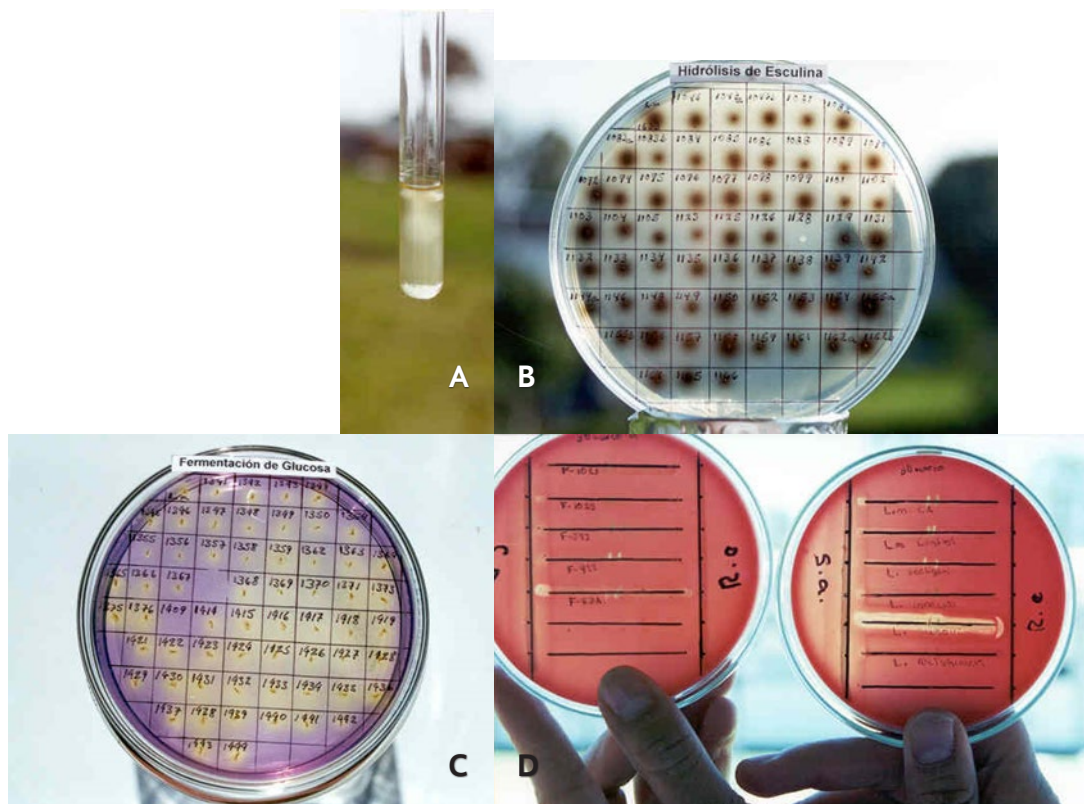


Figura 6. Algunas de las pruebas empleadas para la identificación de *Listeria*. **A** movilidad en forma de sombrilla; **B** hidrólisis de esculina, colonias negras; **C** fermentación de carbohidratos, colonias amarillas; y **D** pruebas de hemólisis (puntos claros al centro de líneas negras) y CAMP (puntas de flecha en líneas laterales), a la izquierda aislamientos de queserías y a la derecha cepas de *Listeria* empleadas como control.

Figure 6. Some of the tests used to *Listeria* identification. **A** motility test giving a typical umbrella-like growth pattern; **B** hydrolysis of esculin, black colonies; **C** carbohydrate fermentation, yellow colonies; **D** Hemolysis (central clear points in black lines) and CAMP test (arrowheads near to sidelines), on the left, isolates from artisanal cheese plants, on the right, *Listeria* strains used as control.

Serotipificación y huella genética de *Listeria monocytogenes*: De cada muestra positiva a *L. monocytogenes*, se eligió un aislamiento para serotipificación por el método de Seeliger & Höhne (1979) correspondiendo a 51 aislamientos de la quesería A y 20 de la quesería C. Se hizo caracterización de DNA a 19 aislamientos de los 2 serotipos más frecuentes: trece *L. monocytogenes* 1/2b de la quesería A obtenidos en los meses 1, 7, 20 y 21, así como seis *L. monocytogenes* 4b de la quesería C, obtenidos en los meses 1, 2, 4, 8 y 17. Para esta subtipificación de *L. monocytogenes* mediante macrorrestricción y electroforesis de campos pulsátiles (PFGE por sus siglas en inglés: Pulsed Field Gel Electrophoresis) se empleó el método descrito por Graves & Swaminathan en 2001. Los fragmentos de DNA fueron obtenidos con las endonucleasas de restricción *ApaI* y *AscI*. El análisis para el patrón de bandas se realizó con el sistema de documentación Kodak® 1D 3.5.4. El tamaño de los fragmentos de restricción del DNA fue comparado con la cepa de referencia *L. monocytogenes* CLIP 77873. Los diferentes patrones fueron definidos por cambios en al menos una banda, esto es: ausencia de banda, banda extra o migración a una posición diferente (Yde & Gennicot 2004) (figura 7).

Las similitudes entre los patrones de restricción se establecieron con el programa NTSYS

***Listeria monocytogenes* serotyping and genetic fingerprinting:** From each positive sample for *Listeria monocytogenes* one isolate was serotyped according to the Seeliger & Höhne method (1979). In an effort to limit bias due to the type of isolation media or incubation time, isolates were selected from both LPM and MOX media. Nineteen isolates of the two most frequent serotypes isolated during the study were selected for DNA characterization; 13 *L. monocytogenes* isolates were selected from Plant A obtained in months 1, 7, 20, 21, while from Plant C, 6 *L. monocytogenes* isolates were obtained in months 1, 2, 4, 8, and 17. The Graves and Swaminathan protocol for subtyping *L. monocytogenes* by macro-restriction and PFGE was used (Graves and Swaminathan 2001). DNA restriction fragments were obtained using the *ApaI* and *AscI* restriction endonucleases. Analysis of banding patterns was performed with the Kodak® 1D 3.5.4 documentation system. DNA restriction fragments were sized against the CLIP 77873 *L. monocytogenes* reference strain. Different profiles were defined by changes in at least one band; *i.e.*, a missing band, an extra band, or migration to a different position (Yde & Gennicot 2004) (figure 7).

Similarities between macro-restriction patterns were established by the NTSYS program

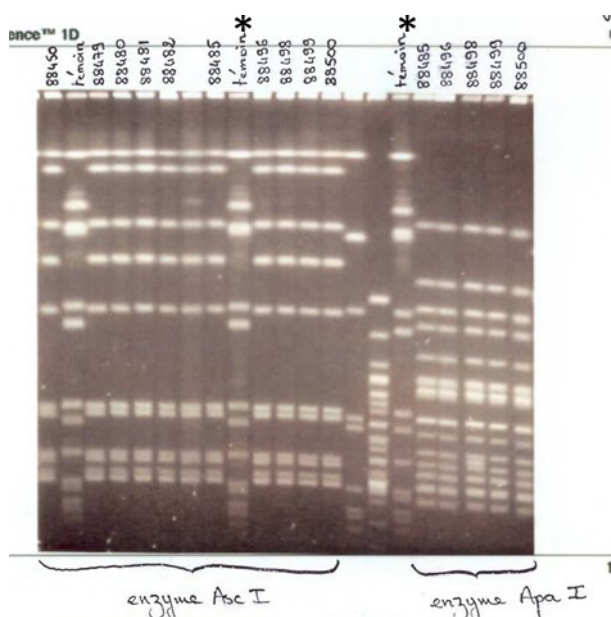


Figura 7. Patrones de DNA de aislamientos de *Listeria monocytogenes* obtenidos con las enzimas *AscI* y *ApaI* por medio de electroforesis de campos pulsátiles. * Cepa de referencia *L. monocytogenes* CLIP 77873.

Figure 7. Some DNA patterns of *Listeria monocytogenes* isolates obtained with enzyme *AscI* and *ApaI* by electrophoresis of pulsed fields. * *L. monocytogenes* reference strain CLIP 77873.

(Rohlf 2009) usando el método de agrupamiento UPGMA (siglas en inglés de unweighted pair-group method using arithmetic averages, método de agrupamiento de pares no ponderado utilizando medias aritméticas) y basado en el índice de Dice (Priest & Austin 1993).

Análisis estadístico: Las pruebas exacta de Fisher o Chi cuadrada fueron usadas para el análisis estadístico en el programa Epi Info™ (Dean *et al.* 2000). El valor de significancia fue al nivel de 5 % de dos colas.

Resultados

Las muestras de leche fueron negativas a *Listeria* (cuadro 2) y residuos de antimicrobianos; solo una muestra de leche fue positiva a inhibidores no específicos (inhibidores termolábiles propios de la leche). Todas las muestras de cuajo fueron negativas a *Listeria* (cuadro 2).

En al menos una ocasión, 23 de los 25 puntos de muestreo fueron positivos. Los sitios con mayores frecuencias de *Listeria* fueron: escobas, refrigeradores, canastos, recipientes para cuajar y superficies para procesamiento (cuadros 3–6).

Si bien, las frecuencias en cada quesería fueron diferentes, las muestras de recipientes para cuajar, refrigeradores, escobas y pisos fueron positivas al menos una vez en las cuatro queserías (cuadros 3–6).

En la quesería A, 52 (55 %) de las 95 muestras fueron positivas, aislándose *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri*. Se aisló *L. monocytogenes* en 51 muestras (98 % de las muestras positivas) entre las que se incluyen las ocho correspondientes a quesos y las 4 de escobas. *L. welshimeri* catalasa positiva se aisló del molino y en las telas para colar la leche, se encontró *L. welshimeri* catalasa negativa. Los serovares de *L. monocytogenes* identificados fueron: 4d (1 muestra), 1/2 inmóvil (dos muestras), 1/2a (8 muestras) y 1/2b (40 muestras) (cuadro 3).

En la subtipificación mediante PFGE, de un aislamiento de *L. monocytogenes* 1/2 inmóvil y doce del serovar 1/2b, con la enzima AscI se

(Rohlf 2009) using the pair-group method with arithmetical-average (UPGMA) clustering based on the Dice correlation coefficient (Priest & Austin 1993).

Statistical analysis: Chi square or Fisher's exact tests were used for statistical analysis. The significance value for all tests was set at the 5 % 2-sided level. Statistical analyses were performed using Epi Info™ software (Dean *et al.* 2000).

Results

Listeria was not isolated from milk or rennet (table 2). Milk samples were negative for antimicrobial residues and only one was positive for non-specific milk inhibitors (thermolabile milk inhibitors). *Listeria* was isolated at least once from 23 of the 25 sampling sites. Those with the highest frequencies were brooms, refrigerators, baskets, curdling vats, and processing surfaces (tables 3–6). Samples from vats, refrigerators, brooms and floors were positive at least once in all 4 artisanal cheese plants (tables 3–6), though *Listeria* frequencies differed at each plant.

At Plant A, 52 of 95 (55 %) samples were positive for *Listeria* (table 2), and 21 of 24 sampling sites tested positive at least once. Also, eight (53 %) of 15 samples of cheese were positive for *Listeria* (table 3). *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. welshimeri* were identified. *L. monocytogenes* was isolated from 51 samples (98 % of positive *Listeria* samples) made up entirely of samples from brooms, never floors. *L. welshimeri* was isolated from the mill and milk-filtering cloths; the former was catalase-positive but the latter was negative. *L. monocytogenes* serovars 4d (1 sample), 1/2 non-motile (two samples), 1/2a (8 samples, 15 %), and 1/2b (40 samples, 77 %) were identified (table 3). PFGE sub-typing of one isolate of *L. monocytogenes* 1/2 non-motile and 12 isolates of *L. monocytogenes* serovar 1/2b with enzyme AscI generated a profile with 11 major fragments ranging in size from 58.8–690.5 kb, while the enzyme ApaI generated 3 profiles with 14–15 fragments ranging in size from 42.1–419.5 kb. Upon combining the profiles of both enzymes, 3 closely-related lineages emerged (figure 8). The first was observed in

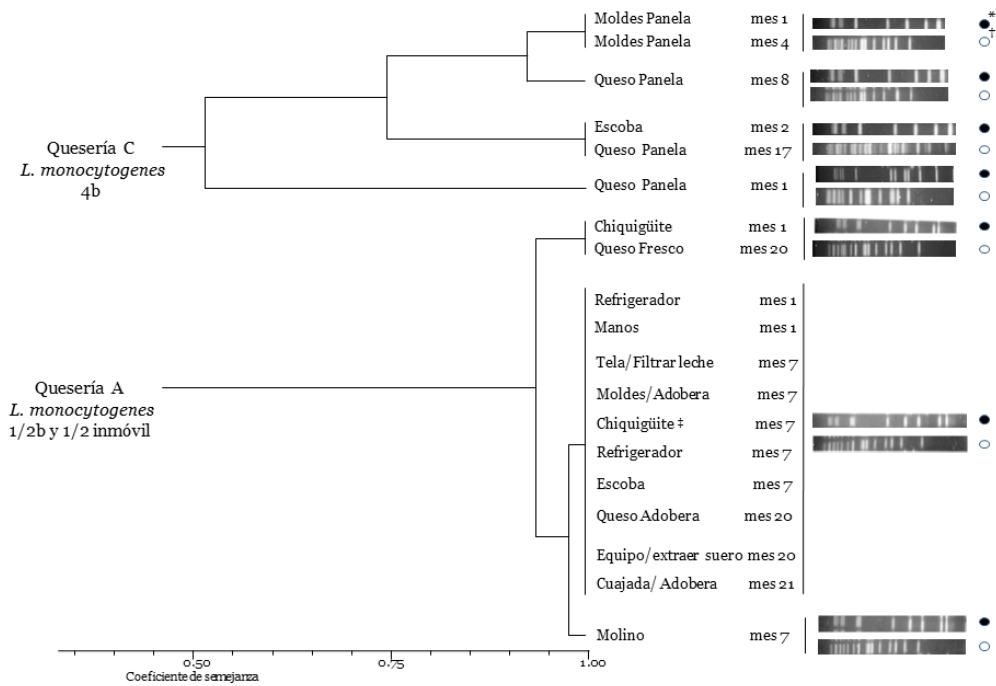
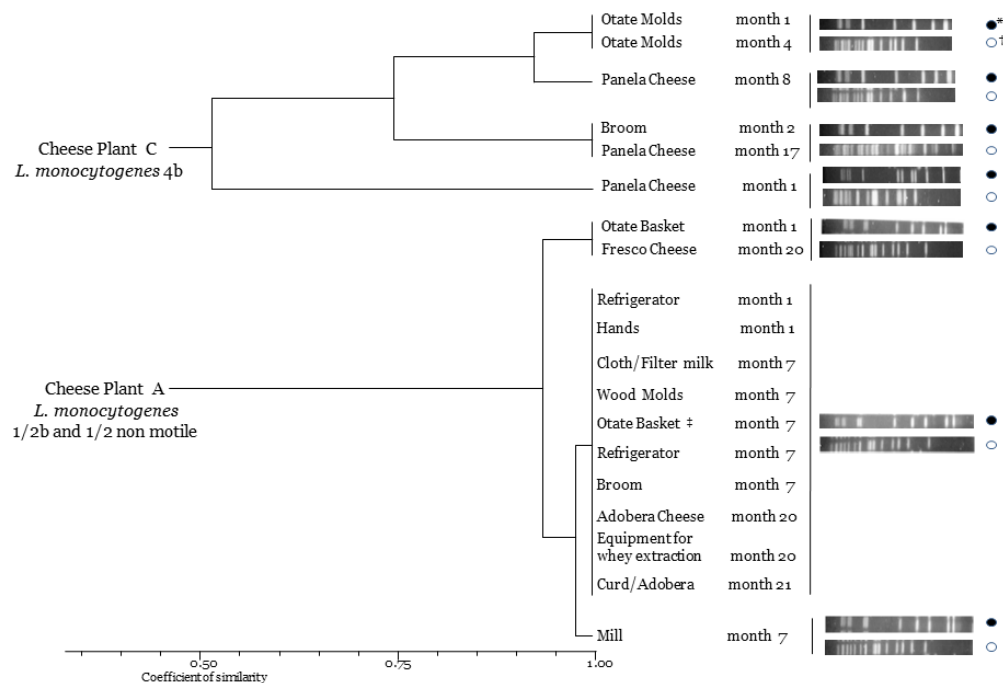


Figura 8. Dendrograma y patrones de macrorestricción de aislamientos de *Listeria monocytogenes*, empleando las enzimas *● *Ascl* y †○ *Apal*. ‡ *L. monocytogenes* 1/2 inmóvil. Análisis de semejanza basado en el coeficiente de correlación de Dice y agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Figure 8. Dendrogram and macrorestriction patterns (UPGMA clustering based on Dice correlation coefficient) of *Listeria monocytogenes*, from two artisanal cheese plants. *● *Ascl* and †○ *Apal* PFGE profiles. ‡ *L. monocytogenes* 1/2 non motile.



observó un patrón compuesto de 11 fragmentos cuyo tamaño fue de 58.8 a 690.5 kilo bases (kb), en tanto que con la enzima *ApaI* se generaron 3 patrones con 14–15 fragmentos con tamaños de 42.1 a 419.5 kb. Al combinar los patrones de ambas enzimas, se identificaron 3 linajes estrechamente relacionados. El primer linaje fue observado en los meses 1 y 20 en moldes y queso fresco, respectivamente. El segundo linaje incluyó al serovar 1/2 inmóvil y fue identificado en los meses 1, 7, 20 y 21 a partir de: superficies en contacto con los quesos, equipo, cuajada y queso adobera. El tercer linaje solo fue encontrado en el molino en el mes 7 (figura 8).

En la quesería B, de las 98 muestras, el 31 % fueron positivas a *Listeria innocua*, que fue la única especie presente durante 18 meses y fue aislada del equipo, superficies en contacto con los quesos, piso, cepillos y escobas, pero no de ingredientes, cuajadas o quesos (cuadro 4).

En la quesería C, el 26 % de las 100 muestras fueron positivas. Las especies identificadas correspondieron a *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii* (cuadro 5). Durante 15 meses, se aisló *L. welshimeri* de diferentes sitios, fue más frecuente su aislamiento en esta quesería (27 % de los aislamientos) que en las otras (OR 8.71, I.C. 2.32–35.40. $P = 0.0002$). De los 22 aislamientos de *L. monocytogenes*, 20 (91 %) fueron serovar 4b (cuadro 5). Los seis aislamientos de *L. monocytogenes* 4b tipificados por PFGE mostraron 4 patrones con la enzima *ApaI* y 2 con la enzima *AscI*. El número de bandas generadas por *AscI* fue de 10 a 11, con un peso molecular de 50.32 a 690.5 kb. Con la enzima *ApaI* se observaron de 15 a 20 bandas con pesos moleculares de 26.71 a 669.7 kb. La combinación de los patrones observados con ambas enzimas generó 4 pulsotipos, uno solo fue encontrado en los moldes para queso panela y los otros 3 se aislaron de queso panela, y la escoba. El pulsotipo de la escoba coincidió con el encontrado en queso panela 15 meses después (figura 8).

En la quesería D, siete de 99 muestras (7 %) fueron positivas para *Listeria*. Los aislamientos de *Listeria* fueron obtenidos en 3 de las 11 visitas, a partir de 6 de 25 puntos de muestreo. *L. in-*

months 1 and 20 in molds and *Fresco* cheese, respectively; whereas the second lineage grouped *L. monocytogenes* 1/2 non-motile and 1/2b, which were present in months 1, 7, 20 and 21 from surfaces in contact with cheese, equipment, curd, and *Adobera*. The third lineage was found only in the mill in month 7 (figure 8).

In Plant B, 98 samples were collected, of which 31 % were positive for *Listeria innocua*; the only species isolated from 13 of 25 sampling sites during an 18-month period (table 4). These bacteria were isolated from equipment, food-contact surfaces, floors, brushes and brooms, but not from ingredients, curds or cheeses (tables 2, 4).

At Plant C, 26 % of 100 samples corresponding to 13 of 25 sampling sites (table 1) were positive for *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* and *L. ivanovii* (table 5). During a 15-month period, *L. welshimeri* (27 % of isolates) was isolated from different sampling sites at this plant more frequently than at others (OR 8.71, I.C. 2.32–35.40. $P = 0.0002$). Of the 22 *L. monocytogenes* isolates, 20 (91 %) were serovar 4b (table 5). Six isolates of *L. monocytogenes* 4b displayed 4 pulsotypes with the enzyme *ApaI*, and 2 pulsotypes with the enzyme *AscI*. The number of bands produced with *AscI* was 10 or 11, and with *ApaI* from 15-to-24, with molecular sizes that ranged from 50.32–690.5 kb and 26.71–669.7 in length, respectively. The combination of two enzymes generated 4 pulsotypes. Three were found in *Panela*, and one was the same as the isolate from the broom found 15 months earlier. The other pulsotype was found in the *otate* molds (figure 8).

In Plant D, 7 of 99 samples (7 %) were positive for *Listeria*. *Listeria* isolates were recovered on 3 of 11 visits, but from only 6 of 25 sampling sites (table 4). It is important to note that *L. monocytogenes* was not identified. *L. innocua* was isolated in all 7 samples, and *L. welshimeri* was isolated from one refrigerator sample (table 5). All molds, baskets and plastic sack samples were negative for *Listeria* (table 6).

While working dairies in morning and evening shifts, only the practices during the morn-

nocua fue aislada en las siete muestras positivas y *L. welshimeri* solo fue aislada del refrigerador. Todas las muestras de moldes, canastos y sacos de plástico fueron negativas a *Listeria* (cuadro 6).

Si bien las queserías trabajaron en turnos matutino y vespertino, solo se registraron las prácticas realizadas durante el turno matutino. Comparada con las queserías A, B y C, en la D se observó un mayor número de prácticas de limpieza, destacando la aplicación de tratamientos térmicos superiores a 70 °C a una parte del equipo y el vaciado de agua o suero caliente al drenaje (cuadro 7 y figura 9).

ing shift were recorded. Compared to dairies A, B and C to D a larger number of cleaning practices observed, emphasizing the application of higher heat treatments at 70 °C to a piece of equipment and emptying hot water or whey drainage (table 7 and figure 9).

Cuadro 7. Prácticas de limpieza observadas durante el turno matutino en queserías artesanales.

Práctica	Quesería			
	A	B	C	D
Inmersión de moldes para queso Panela en agua caliente > 70 °C/27 minutos cada tercer día.	-	-	-	+
Aplicación de suero caliente (90 °C) a chiquigüites y mantas antes de depositar en ellos requesón.	-	-	-	+
Cepillado de cámara de refrigeración, empleando agua y jabón, cada tercer día.	-	-	-	+
Lavado diario de telas con agua y jabón.	-	+	-	+
Inmersión de costales y moldes en agua o suero caliente.	-	-	-	+
Lavado de costales con agua y jabón.	-	+	-	+
Enjuague con agua de las superficies para elaboración del queso al inicio y fin de la jornada matutina.	+	+	+	-
Cepillado y enjuague con agua (ocasionalmente también con jabón) de superficies para elaboración de queso al inicio y fin de la jornada matutina.	-	-	-	+
Vaciado al drenaje, de agua o suero caliente al menos una vez al día.	-	-	-	+

- Ausente , + presente.

Table 7. Cleaning procedures observed on morning session in artisanal cheese plants.

Procedure	Cheese Plant			
	A	B	C	D
Immersion otate molds in hot water > 70 °C/27 minutes every 3th day.	-	-	-	+
Apply hot whey (90 °C) to chiquigüites and cloths before put Requeson on them.	-	-	-	+
Brush cooling chamber using water and soap every 3th day.	-	-	-	+
Daily cloth washing with water and soap.	-	+	-	+
Immersion sacks and molds in water or whey hot.	-	-	-	+
Wash sacks with soapy water.	-	+	-	+
Rinse with water surfaces for cheese making at the beginning and end of the morning session.	+	+	+	-
Brushing and rinsing with water (sometimes also with soap) surfaces for cheese making at the beginning and end of the morning session.	-	-	-	+
Emptying the drainage, hot water or whey at least one time per day.	-	-	-	+

- Absent, + present.

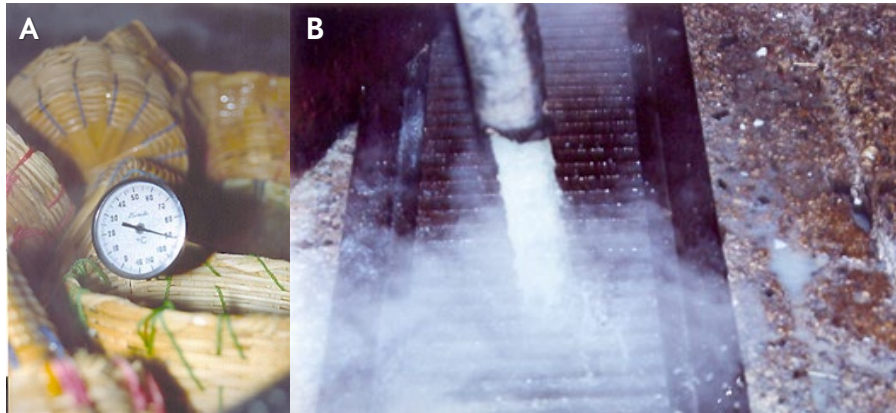


Figura 9. Tratamientos térmicos en queserías artesanales. **A** inmersión de moldes en agua caliente > 70 °C, y **B** vaciado al drenaje de agua caliente.

Figure 9. Thermic treatments in artisanal cheese plants. **A** immersion of molds in hot water > 70 °C, and **B** emptying the drainage, hot water.

Discusión

En la frecuencia de *Listeria* reportada en plantas de productos lácteos puede influir: el tipo de muestras colectadas, periodo de duración del muestreo, número de queserías muestreadas y el tipo o escala de producción como son el industrial o anexa a los establos (Cox *et al.* 1989, Pritchard *et al.* 1994). La frecuencia de *Listeria* en queserías, quesos y medio ambiente de áreas de procesamiento oscila entre el 6 % al 18 % (Jacquet *et al.* 1993, Kabuki *et al.* 2004, Pritchard *op. cit.*), los porcentajes de 3 de las 4 queserías fueron mayores a los mencionados, esto puede deberse a ciertas características de la producción artesanal, tales como que el personal y el equipo son empleados para múltiples actividades, permitiendo múltiples contaminaciones cruzadas durante el proceso de elaboración del queso.

A partir de varios estudios, Ryser (1999) reporta que los rangos de incidencia de *Listeria* en leche cruda son los siguientes: *L. innocua* 3.4–10 %, *L. monocytogenes* 3–3.8 %, *L. welshimeri* 0.7–0.9 % y otras especies 0.3–1.2 %. (Ryser 1999). Aún cuando se emplearon dos procedimientos (FDA y torunda de Moore), *Listeria* no fue aislada de las muestras de leche. Quizás la ausencia de la bacteria en la leche fue real. También es posible que el bajo número de muestras, solo 16, o los bajos niveles de *Listeria* en las muestras, influyeron en estos resultados. Sin embargo, encontramos altas frecuencias en otros puntos de muestreo analizando el mismo número de muestras (cuadros 2–6), lo que sugiere que la leche

Discussion

Listeria frequencies reported in dairy plants may be influenced by: 1) type of samples collected; 2) sampling period duration; 3) number of plants sampled; and, 4) production scale (Cox *et al.* 1989; Pritchard *et al.* 1994). *Listeria* frequencies in cheese plants, cheeses and food processing environments range from 6–18% (Jacquet *et al.* 1993; Kabuki *et al.* 2004; Pritchard *op. cit.*). The frequency of *Listeria* at 3 of the 4 plants studied was higher than these figures. This could be related to certain characteristics of artisanal production; for example, the fact that staff and equipment are used for multiple activities and so may generate multiple opportunities for cross-contamination during production.

Ryser (1999) reported ranges of *Listeria* incidence in raw milk from several studies as follows: *L. innocua*, 3–10 %; *L. monocytogenes*, 3–4 %; *L. welshimeri*, 0.7–0.9 %; and other species, 0.3–1 %. Although we used two sampling procedures (FDA and Moore's swab), *Listeria* was not isolated from milk samples, so it is possible that the absence of contamination in raw milk was real. But it may also be that the low number of samples (only 16), or low levels of *Listeria* in samples could explain these results. However, we found high frequencies at other sampling sites after analyzing the same number of samples (tables 2–6); suggesting that raw milk may not have been a frequent source of contamination at these artisanal cheese plants.

cruda no fue una fuente frecuente de contaminación en las queserías artesanales.

En las cuatro queserías, los lecheros tenían acceso a las áreas de procesamiento para descargar la leche en los recipientes para cuajar. Después de vaciar la leche, las cántaras eran enjuagadas usando agua y equipo empleado en la extracción del suero. Estas prácticas podrían introducir *Listeria* de la leche y los establos al medio ambiente del área de procesamiento. La quesería B recibió leche de un solo proveedor, las queserías A y C de dos proveedores y la quesería D de 10, sin embargo, la quesería D tuvo las frecuencias más bajas de muestras positivas y un mayor número de prácticas de limpieza (cuadros 2, 6 y 7) esto sugiere que el medio ambiente y las prácticas de limpieza influyen en la frecuencia y especies de *Listeria* que podrían aislarse o implantarse en las queserías artesanales. Esta situación es similar a la reportada en una planta elaboradora de queso Minas Frescal, en la cual no se aisló *Listeria* de la leche cruda y el área de ordeño, pero si se aisló de varios puntos de la planta (Renaldi *et al.* 2008).

Listeria no se aisló del cuajo, esto concuerda con que el producto contiene 1.9 % de propionato de sodio y 0.1 % de benzoato de sodio, compuestos que pueden inhibir o inactivar a *L. monocytogenes* (Lou and Yousef 1999). De acuerdo con estudios previos, la presencia de *Listeria* en equipo de queserías varía del 1.7 % al 30.7 % (Cox *et al.* 1989, de Cesare *et al.* 2007, Kabuki *et al.* 2004).

En esta investigación, el rango de frecuencias fue de 2 % en la quesería D a 58 % en la quesería A (cuadro 2), esto muestra que el nivel de contaminación del equipo estuvo relacionado con cada quesería y destaca el papel que tiene el equipo en la contaminación de los quesos con *Listeria* durante su elaboración artesanal.

Los hallazgos de baja frecuencia de *Listeria* y no aislamiento de *L. monocytogenes* observados en la quesería D, pueden explicarse considerando que esta quesería usaban agua hirviendo y suero calentado a 90 °C para limpiar pisos, equipo, moldes y chiquigüites, procedimiento que puede eliminar a la bacteria puesto que tempera-

At all four plants, the milkmen had regular access to processing areas, where they emptied milk into curdling vats. After emptying, the milk cans were rinsed with water in equipment used for whey extraction. These practices could introduce *Listeria* from milk and barns into the food-processing environment. Plant B received milk from only one supplier, Plants A and C from two, and Plant D from ten. However, Plant D had the lowest numbers of both *Listeria* isolates and positive and a large number of cleansing practices (tables 2, 6 and 7), which suggests that plant environment and cleaning practices influenced the kind of *Listeria* that could be isolated and/or implanted in these artisanal plants. This situation is similar to that reported for the Minas Frescal cheese dairy plant, where *Listeria* was not found in raw milk or the milking area, though several sampling sites in the plant did test positive for *Listeria* (Renaldi *et al.* 2008).

Listeria was not isolated from rennet, which contains 1.9 % sodium propionate and 0.1 % sodium benzoate. This was to be expected because these salts can inhibit and/or inactivate *L. monocytogenes* (Lou & Yousef 1999). According to previous studies, the frequency of the presence of *Listeria* in cheese plant equipment varies from 1.7-to-30.7 % (Cox *et al.* 1989; de Cesare *et al.* 2007; Kabuki *et al.* 2004).

Prevalences ranging from 2 % (Plant D) to 58 % (Plant A) (table 2) show that the level of equipment contamination is relative to each plant. Also, this highlights the role of equipment in *Listeria* contamination of cheese during artisanal production.

The lowest prevalence of *Listeria* with no isolation of *L. monocytogenes* was observed in Plant D. These findings could be explained by the fact that this particular plant uses boiling water and whey heated to 90 °C to clean floors, equipment, molds and baskets. In fact, it has been shown that temperatures above 50 °C are lethal to *L. monocytogenes* (Lou & Yousef 1999).

High incidences of *Listeria* have been reported from drains and floors in food-processing facilities, suggesting that these areas may be reservoirs for *Listeria* (Gravani 1999). In our work,

turas mayores a 50 °C son letales para *L. monocytogenes* (Lou and Yousef 1999).

Existen reportes de una alta incidencia de *Listeria* en drenajes y pisos de áreas de procesamiento de alimentos, lo cual sugiere que estas áreas pueden ser reservorios de *Listeria* (Gravani 1999). En nuestro trabajo, *Listeria* se aisló del piso de todas las queserías y la escoba fue el punto con mayor frecuencia de *Listeria*. En la quesería C, el patrón de PFGE de la escoba, fue el mismo aislado del queso Panela 15 meses después (figura 8). Además hubo coincidencia de las especies de *Listeria* en la escoba y el refrigerador (cuadro 5). En la quesería D, en la misma fecha (agosto), *L. innocua* fue aislada de los recipientes para cuajar, la cuajada, el refrigerador y la escoba. Las queserías A y C usaban la misma escoba para barrer el área de procesamiento y el piso del área de refrigeración. Con base a estos datos, consideramos que la escoba colecta y disemina *Listeria* presente en el piso, siendo un vehículo importante de contaminación cruzada en las queserías artesanales.

Gravani (1999), al observar que *Listeria innocua* fue más frecuente en pisos, agua estancada, residuos y equipo, sugiere que *L. innocua* es trasladada de los drenajes a los pisos y residuos y luego diseminada por los empleados al equipo en contacto con el producto. Esta situación pudo ocurrir en las queserías artesanales, donde hubo coladeras de drenaje abiertas y *L. innocua* fue aislada de la escoba y pisos.

Solo se muestreó el interior de los recipientes para cuajar, pero, al fin de cada día, cuando almacenaban los recipientes, la parte externa de un recipiente era introducida en el interior del siguiente. Esta práctica podría introducir *Listeria* del piso al interior de los recipientes. Otra situación observada fue, cuando los trabajadores transferían leche o cuajada de un recipiente a otro, tocaban el fondo externo del recipiente, maniobra que puede introducir *Listeria* del piso a la leche o cuajada y contaminar el interior de los recipientes.

El hallazgo de pulsotipos idénticos o estrechamente relacionados en quesos, refrigeradores, moldes y chiquiüites (figura 8), sugiere

Listeria was isolated from the floors in all four plants, while the brooms were the sampling sites that had the highest incidence of *Listeria*. The *Listeria* PFGE profile from Plant C found in brooms was the same as the one seen in *Panela* cheese (figure 8). And this *Listeria* species was also found on brooms and in refrigerators (table 5). On the same date in Plant D (August) *L. innocua* was isolated from curdling vats, curd, the refrigerator and brooms. Plants A and C used the same broom to sweep processing areas and the floor of the refrigeration room. This leads us to consider that brooms, which collect and disseminate *Listeria* present on the floor, are an important vehicle of cross-contamination in artisanal cheese plants.

Gravani (1999) observed that *L. innocua* was more frequent on floors and in stagnant water, residues and equipment, which suggests that *L. innocua* moved from drains to floors and residues, and was then disseminated by workers to processing equipment in contact with product. This situation could occur in the artisanal plants studied because *L. innocua* was isolated from brooms and floors where open drain grills were observed. When compared to Plants B, C and D, the high level of contamination at Plant A could be explained by the conjunction of deficiencies in cleaning procedures with the location of cheese-processing areas close to open drains.

We only sampled the interior of vats but learned that at the end of each day vats were stacked such that the outside of one is introduced inside another, a practice that could introduce *Listeria* from the floor into the vats. Another situation observed during processing involved operators transferring curd from vat-to-vat. After touching the outside bottom of the curdling vats, workers could introduce *Listeria* from the floor to milk and curd, thus contaminating the interior of the vats.

Molds and baskets for *Panela* are used in processing areas (to drain curd and extract whey) and refrigerators (drying/molding *Panela*, refrigerating *Requesón*). The same –or a closely-related– pulsotype was found in cheeses, refrigerators, molds and baskets (figure 8), suggesting cross-contamination between equipment, chee-

contaminación cruzada entre equipo, quesos y anaqueles de refrigeración aspecto que coincide con la utilización de moldes para queso Panela y chiquigüites tanto en áreas de proceso (drenaje de la cuajada, extracción de suero) o en refrigeración (secado-moldeado de queso Panela, y refrigeración del Requesón). Es posible que el chiquigüite y los moldes se contaminen cuando entran en contacto con pisos, superficies o cuajadas. El chiquigüite puede contaminar las cuajadas de los quesos Panela y Fresco cuando es usado para drenar la cuajada, a su vez, las cuajadas contaminan otros equipos y superficies del área de proceso. Los moldes y chiquigüites transportan *Listeria* cuando son introducidos al los refrigeradores.

Durante la producción de quesos madurados (Brie, Camembert, Brick, Limburger), el cuarto de maduración y los anaqueles son sitios donde *Listeria monocytogenes* puede crecer y contaminar el producto (Gravani 1999). La frecuencia de *Listeria* sp. en refrigeradores fue del 67 % y este punto de muestreo fue positivo de 2 a 4 veces en cada quesería (cuadros 3–6), lo que sugiere que la refrigeración podría representar una de las etapas con mayor riesgo para la contaminación de los quesos elaborados artesanalmente. Moreno Enriquez *et al.* (2007) también reporta contaminación en refrigeradores y superficies del área de proceso de un queso similar al Panela en una quesería de Sonora, México. El suero es una fuente de crioprotectores (carnitina y betaina) usados por *L. monocytogenes* para desarrollar a temperaturas de refrigeración (Angelidis *et al.* 2002, Annous *et al.* 1997, Ko *et al.* 1994). El suero liberado por los quesos Panela, Fresco y Adobera durante la refrigeración, genera una fuente continua de nutrientes y crioprotectores para *Listeria* que haya sido introducida a refrigeradores, esto explica cómo las superficies de las áreas de refrigeración se convierten en un reservorio de *Listeria*. Puede considerarse que el piso y los refrigeradores son reservorios que actúan en conjunción con las contaminaciones cruzadas explicando así la presencia y persistencia de *Listeria* en las queserías artesanales.

Existen variaciones en la frecuencia de *Listeria* en las manos de los trabajadores según el tipo de trabajo (Kerr *et al.* 1993), por ejemplo, *Liste-*

es and shelves. Baskets and molds are likely to be contaminated when in contact with floors, surfaces or curd. Baskets can contaminate the curd of *Panela* and *Fresco* cheese when used for draining, and then the curd can contaminate other equipment and processing surfaces. Molds and baskets can also transport *Listeria* into the refrigerators.

During production of surface-ripened cheeses (Brie, Camembert, Brick, Limburger), the ripening rooms and shelves are sites where *L. monocytogenes* can grow and contaminate products (Gravani 1999). The prevalence of *Listeria* sp. in refrigerators was 67 %, and this sampling site tested positive on 2–4 occasions in each plant (tables 3–6), indicating that refrigeration could represent one of the greatest hazards for contamination in artisanal cheese production. Moreno-Enriquez *et al.* (2007) reported contamination on processing surfaces, in coolers, and in a soft cheese similar to *Panela* in a plant in Sonora, Mexico. Whey is a source of cryoprotectants (carnitine and betaine) that are used by *L. monocytogenes* to grow at refrigerated temperatures (Angelidis *et al.* 2002; Annous *et al.* 1997; Ko *et al.* 1994). The whey that oozes through *Panela*, *Fresco* and *Adobera* cheeses during refrigeration produces a continual source of nutrients and cryoprotectants for any *Listeria* that may find its way into refrigerators, and this could explain how refrigerator surfaces become *Listeria* reservoirs. Floors and refrigerators are reservoirs that together with cross-contaminations explain the presence and persistence of *Listeria* in artisanal cheese plants.

Variations in the frequency of *Listeria* found on workers' hands according to the specific activities performed have been reported (Kerr *et al.* 1993). In two *Minas Frescal* cheese plants, *Listeria* was not isolated from gloves or hands (Silva *et al.* 2003), but in two poultry-processing plants frequency was clearly influenced by work area: from 0 % in the eviscerating room to 40 % in the cutting room (Chiarini *et al.* 2009). In the artisanal cheese plants studied, the molds for *Fresco*, *Adobera* and *Panela* were made manually, and the concordance between the *Listeria* species and pulsotypes found on workers' hands and at other sampling sites at the plant (tables

ria no fue aislada de guantes o manos en dos queserías que elaboraban queso Minas Frescal (Silva *et al.* 2003) pero en dos procesadoras de carne de pollo, las frecuencias variaron entre las diferentes áreas: 0 % en evisceración a 40 % en corte o despiece (Chiarini *et al.* 2009). En las queserías artesanales, la etapa de moldear los quesos se realizó de forma manual, la concordancia de especies de *Listeria* y pulsotipos aislados de las manos y otros puntos de muestreo en la misma quesería (cuadros 3, 5, 6 y figura 8), sugieren que la contaminación de las manos, refleja la contaminación de la quesería, así como la participación de los trabajadores en la diseminación de *Listeria* en la planta.

La presencia de ciertas especies de *Listeria* pudo ser influida por el tipo de sustratos presentes en las queserías y por la utilización de carbohidratos presentes en la leche o el suero. La fermentación de lactosa por *L. monocytogenes* es variable, del 11 al 89 % de las cepas son positivas a lactosa (Lou & Yousef 1999), en tanto que todas las cepas de *L. innocua* fermentan la lactosa (Seeliger & Jones 1986) lo que podría explicar su aislamiento en las cuatro queserías, donde siempre hubo presencia de leche y suero en pisos y superficies. *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, y *L. welshimeri* fermentan xilosa, la cual puede ser obtenida cuando el polímero xilano de la madera es desdoblado por las xilanasas de microorganismos del suelo, el cuál es un hábitat de *Listeria* (Cox *et al.* 1989). Suponemos que la presencia y persistencia de *L. welshimeri* en las queserías A, C y D (cuadros 3, 5 y 6) estuvo asociada a la presencia de madera vieja como soporte del molino en la quesería A y estantes en las áreas de refrigeración de las queserías C y D. Si bien, *L. ivanovii* ha sido aislada de quesos (Guerra-María & Bernardo 1999), se observó un bajo nivel de frecuencia (4 % de todas las muestras positivas en la quesería C; 0.87 % del total de muestras positivas), lo cuál contrasta con los hallazgos en una fábrica de queso Manchego donde *L. ivanovii* fue el aislamiento predominante mostrando persistencia por un período de 6 meses (Vázquez-Villanueva *et al.* 2010). El aislamiento de una sola especie de *Listeria* e incluso el predominio de una sola especie en sitios particulares de plantas industriales de productos lácteos ha sido reportado por Gravani (1999) y Slade (1992), el aislamiento de

3, 5, 6, figure 8) suggests that contamination of hands reflects contamination in the plant, and that workers participate in disseminating *Listeria*.

The presence of *Listeria* species could also be influenced by the kind of substrates present in the plants and the use of carbohydrates in milk or whey. Lactose fermentation by *L. monocytogenes* is variable, as 11–89 % of strains are positive for lactose (Lou & Yousef 1999). The fact that all *L. innocua* ferment lactose (Seeliger & Jones 1986) may explain the presence of these isolates in all four plants, since milk and whey were always present on floors and surfaces. *L. ivanovii*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* ferment xylose, which can be obtained when the wood xylan polymer is broken down by xylanases of microorganisms that are common in soil (Cox *et al.* 1989). We supposed that the presence and persistence of *L. welshimeri* in Plants A, C and D (tables 3, 5, 6) were associated with the presence of old wood in processing and refrigeration areas. In Plant A, a mill was mounted on a board, while Plants C and D have wooden shelves. Although *L. ivanovii* had been isolated previously from cheeses (Guerra-María & Bernardo 1999), our work shows a low-level occurrence of *L. ivanovii* in artisanal cheese plants (4 % of all positive samples from Plant C; 0.87 % of all positive samples) that contrasts with findings from a manchego cheese plant where *L. ivanovii* was the predominant isolate and persisted during a 6-month period (Vázquez-Villanueva *et al.* 2010). Isolation of single *Listeria* species in industrial dairy plants has been reported, and one single *Listeria* species may predominate at certain sites of plants (Gravani 1999; Slade 1992). Isolates of *L. innocua* in Plant B show that this phenomenon also occurs in artisanal production.

The phenomena of the presence and persistence of some species and serovars of *Listeria* associated with dairy plants have been related to persistent niches and the adaptation of *L. monocytogenes* to them (Ho *et al.* 2007; Keto-Timonen *et al.* 2007; Lomonaco *et al.* 2009). Replacing equipment and modifying installations and production lines are measures that can eliminate persistent strains (Keto-Timonen *et al.* 2007; Silva *et al.* 2003). The isolation of an

L. innocua como única especie en la quesería B, muestra que este fenómeno también ocurre en la producción artesanal.

La presencia y persistencia de algunas especies y serovares de *Listeria* asociados a fábricas de productos lácteos se relaciona con la persistencia de nichos y adaptación de *L. monocytogenes* a esos nichos (Ho *et al.* 2007 Keto-Timonen *et al.* 2007, Lomonaco 2009). Las medidas que pueden eliminar cepas persistentes son: reemplazar equipo, realizar modificaciones en instalaciones y líneas de producción (Keto-Timonen *et al.* 2007, Silva *et al.* 2003). El aislamiento de una cepa de *L. monocytogenes* en diferentes fechas en la quesería A (figura 8) y el aislamiento de *L. innocua* en la quesería B en fechas consecutivas (cuadro 4), soportan la posibilidad de cepas persistentes en queserías artesanales. En la quesería A, los chiquigüites fueron muestreados en una fecha adicional para explorar si había diferencia con lo encontrado un año antes, en el primer muestreo, fue sorprendente encontrar la misma especie y serotipo (cuadro 3). Aunque *Listeria monocytogenes* serotipo 1/2b inmóvil mostró el mismo pulsotipo observado para aislamientos de *L. monocytogenes* 1/2b (figura 8), no podemos asegurar que se trate de la misma cepa porque los patrones de PFGE no son serotipo específicos, por lo que un mismo patrón puede ser mostrado por varios serotipos y linajes (Gianfranceschi *et al.* 2007). Encontrar pulsotipos idénticos después de 15 o 20 meses en las queserías A y C (figura 8) así como el aislamiento intermitente de *L. innocua* en la quesería D, soportan la posibilidad de reintroducción a partir de una fuente de contaminación no identificada. También es posible que las queserías tengan ciertas condiciones que favorezcan el aislamiento de ciertas especies, serotipos o pulsotipos esto no pudo ser analizado en el presente trabajo.

En las muestras positivas de quesos, se aisló *Listeria monocytogenes* serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Esto es de importancia en salud pública, porque los serotipos mencionados son asociados frecuentemente a listeriosis transmitida por alimentos (Slutsker & Schuchat 1999), por lo cual los quesos artesanales de las queserías A y C podrían ser una fuente de casos de listeriosis.

L. monocytogenes strain from the cheese at Plant A on different dates (figure 8) and the isolation of *L. innocua* from cheese at Plant B on consecutive dates (table 4) support the possibility of persistence. In plant A, baskets were sampled one more order to determine if there were any differences between the isolates one year after the equipment was first sampled. Surprisingly, the same species and serotype were found (table 3). Although *L. monocytogenes* serotype 1/2b non-motile displayed the same pulsotype observed in the *L. monocytogenes* 1/2b isolates (figure 8), we cannot be sure it was from the same strain because PFGE profiles are not serotype-specific; thus, the same profile could be shared by different serotypes and lineages (Gianfranceschi *et al.* 2007). The facts that identical pulsotypes sampled 15-to-20 months apart were found in Plants A and C (figure 8) together with the intermittent isolation of *L. innocua* in Plant D support the possibility of reintroduction from a yet unidentified source of contamination. It is also possible that these plants present certain features that foster isolation of certain species, serotypes, or pulsotypes.

L. monocytogenes serovars 1/2a, 1/2b and 4b were found in positive cheese samples. This constitutes a public health concern because they are the ones most often associated with foodborne listeriosis (Slutsker & Schuchat 1999). Thus, the contaminated artisanal cheeses from Plants A and C could be sources of listeriosis cases.

Listeria was present in all these artisanal cheese plants, though isolation frequencies, species and serovars varied. The observations and results of our sampling study suggest that cheese contamination in artisanal plants could be explained by the high frequency of contamination in refrigerators and floors, fostered by the presence of open drains in processing areas. We assume that *Listeria* contamination during artisanal cheese production is a dynamic system in which cycles of contamination and elimination result from the interaction between the plant environment, specific characteristics of *Listeria* strains, sanitary practices, and inadequate personnel practices during processing. Using hot water and whey is one measure that could re-

Se aisló *Listeria* de queserías artesanales, su frecuencia, especies y serotipos variaron entre las queserías. De acuerdo con los resultados y las observaciones realizadas durante los muestreos, la contaminación del queso en plantas artesanales, podría explicarse por altas frecuencias de contaminación en refrigeradores y pisos, la cuál es favorecida por la presencia de drenajes abiertos en el área de procesamiento. La contaminación con *Listeria* durante la elaboración artesanal de queso es un sistema dinámico donde los ciclos de contaminación y eliminación son consecuencia de una interacción entre el medio ambiente de la quesería, características particulares de las cepas de *Listeria*, prácticas de limpieza, y prácticas erróneas del personal. El empleo de agua hirviendo y suero a 90 °C, en la limpieza de pisos, equipos y superficies es una práctica que podría reducir la frecuencia de contaminación con *Listeria* en queserías artesanales.

Agradecimientos

A los propietarios y trabajadores de las queserías por permitir los muestreos y responder todas nuestras preguntas. A Patricia Castro Félix y Anne Santerre Lucas por facilitarnos el sistema de documentación y sus consejos para el análisis de bandas. A Ofelia Vargas Ponce, por facilitarnos y orientarnos en el manejo del programa NTSYS. A Ewen C.D. Todd por alentarnos a escribir este artículo. A Servando Carvajal por sus observaciones para mejorar el mecanuscrito. El primer autor agradece al Fondo para la Modernización de la Educación Superior (FOMES) la beca empleada en la compra de las muestras de quesos. ❖

duce the frequency of *Listeria* contamination in artisanal cheese plants.

Acknowledgements

We are grateful to the owners and staff of the artisanal cheese plants for facilitating sampling and answering all our questions. We also thank Ewen C.D. Todd for encouraging us to write this article; Patricia Castro Felix and Anne Santerre Lucas for lending us their documentation system for banding analysis and for the advice and orientation given; Ofelia Vargas Ponce for lending us her NTSYS program and for her wise counsel; and Servando Carvajal for his comments that helped improve the typescript. The lead author thanks the *Fondo para la Modernización de la Educación Superior* (FOMES) for the Fellowship that made it possible to purchase the cheese samples.



Referencias | References

- ANGELIDIS, A.S., L.T. SMITH & G.M. SMITH. 2002.** Elevated carnitine accumulation by *Listeria monocytogenes* impaired in glycine betaine transport is insufficient to restore wild-type cryotolerance in milk whey. *International Journal of Food Microbiology* **75**: 1–9.
- ANNOUS, B.A., L.A. BECKER, D.O. BAYLES, D.P. LABEDA & B.J. WILKINSON. 1997.** Critical role of anteiso- C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3887–3894.
- BARRIGA ANGULO, G., E. ROMO RODRÍGUEZ, M. RAMÍREZ RODRÍGUEZ, E. CARREÓN VALDEZ & M.A. LÓPEZ VELARDE. 1981.** Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* (Informe de cinco casos). *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **19**: 519–525.
- BARRIGA ANGULO, G., C. ARRUMIR ESCORZA, N.F. MERCADO GONZÁLEZ, R. RAMÍREZ ORTIZ & E. LÓPEZ ORDUÑA. 2009.** Características clínicas y epidemiológicas de 3,183 casos de meningitis confirmados bacteriológicamente (1980/2007). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* **29**: 99–106.
- BONFIL, A.A., A.L. SÁNCHEZ, A.L. PINEDA & G.D. VILLANUEVA. 1990.** Listeriosis neonatal. Reporte de tres casos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **47**: 437–438.
- BONILLA SUÁREZ, J. & L. JASSO GUTIÉRREZ. 1983.** Septicemia por *Listeria monocytogenes* en el neonato (informe de un caso). *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **21**: 180–182.
- BUZBY, J.C., T. ROBERTS, C.T.J. LIN & J.M. MACDONALD. 2014.** Bacterial Foodborne Disease: Medical Costs and Productivity Losses, COI estimates of listeriosis. Agricultural Economics Report No. AER741. [Internet]. Aug 1996, last update 03 Jun 2012 [citado 22 May 2014]. Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/publications/aer-agricultural-economic-report/aer741.aspx>
- CASTREJÓN ALBA, M. & T. MATEO BALMELLI. 1997.** Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* en niños inmunocomprometidos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **54**: 76–80.
- CHIARINI, E., K. TYLER, J.M. FARBBER, F. PAGOTTO & M.T. DESTRO. 2009.** *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. *Poultry Science* **88**: 791–797.
- COX, L.J., J.L. CORDIER, C. CORDELLANA, P. KONKEL, C. PEDRAZZINI, R. BEUMER & A. SIEBENGA. 1989.** *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology* **6**: 49–61.
- CRAIG, D., B.C. AUSTIN, J. SOBEL, P.S. HAYES, W.F. BIBB, L.M. GRAVES, B. SWAMINATHAN, M.E. PROCTOR & P.M. GRIFFIN. 1997.** An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine* **336**: 100–105.
- DE CESARE, A., G. MANFREDA, M. MACRÌ & C. CANTONI. 2007.** Application of automated ribotyping to support the evaluation of *Listeria monocytogenes* sources in a taleggio cheese producing plant. *Journal of Food Protection* **70**: 1116–21.
- DEAN, A.G., T.G. ARNER, S. SANGAM, G.G. SUNKI, R. FRIEDMAN, M. LANTINGA, J.C. ZUBIETA, K.M. SULLIVAN & D.C. SMITH. 2000.** Epi Info™ 2000 a database and statistics program for public health professionals for use on Windows 95, 98, NT and 2000 computers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
- DONNELLY, C.W. 1999.** *Conventional methods to detect and isolate Listeria monocytogenes*. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria, listeriosis and food safety*. pp. 225–260. New York: Marcel Dekker Inc.
- ESCÁRCEGA, H., R. PEÑALOZA, O. MONTES, R. PEÑA, H. GODOY, M. NEGRIN, R. RODRÍGUEZ & P. ANAYA. 1999.** Listeriosis materno-fetal: reporte de tres casos. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. **6**: 290–296.
- FERESU, S.B. & D. JONES. 1988.** Taxonomic studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical lactobacilli. *Journal of General Microbiology* **134**: 1165–1183.
- GIANFRANCESCO, M.V., A. GATTUSO, M.C. D’OTTAVIO, S. FOKAS & P. AURELI. 2007.** Results of a 12-month long enhanced surveillance of listeriosis in Italy. *Eurosurveillance* **12**(11): E7–8.
- GOULET, V., H. DE VALK, O. PIERRE, F. STAINER, J. ROCOURT, V. VAILLANT, C. JACQUET & J.C. DESENCLOS. 2001.** Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987–1997. *Emerging*

- Infectious Diseases* 7: 983–989.
- GRACE, B., G.A. HOUGHTBY, H. RUDNICK & K. WHALEY. 1992.** Sampling dairy and related products. En: Marshall R.T. (Comps.), Standard methods for the examination of dairy products. pp. 59–83. Washington D.C: American Public Health Association.
- GRAVES, L.M. & B. SWAMINATHAN. 2001.** PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 65: 55–62.
- GRAVANI, R. 1999.** Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 657–709. New York: Marcel Dekker Inc.
- GUERRA-MARÍA, M.M. & M.A. BERNARDO F. 1999.** Natural occurrence of *Listeria spp.* in traditional cheeses from Alentejo (Portugal). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 94: 142–148.
- HITCHINS, A.D. 1995.** *Listeria monocytogenes*. En Food and Drug Administration (Comp.), Bacteriological Analytical Manual 8th edition. pp. 10.01–10.13. Arlington VA: AOAC International
- HO, A.J., R. LAPPI & M. WIEDMANN. 2007.** Longitudinal Monitoring of *Listeria monocytogenes* Contamination. *Journal of Dairy Science* 90: 2517–2524.
- JACQUET, C., J. ROCOURT & A. REYNAUD. 1993.** Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated. *International Journal of Food Microbiology* 20: 13–22.
- KABUKI, D.Y., A.Y. KUAYE, M. WIEDMANN & K.J. BOOR. 2004.** Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science* 87: 2803–2812.
- KETO-TIMONEN, R., R. TOLVANEN, J. LUNDÉN & H. KORKEALA. 2007.** An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection* 70: 1866–73.
- KERR, K.G., D. BIRKENHEAD, K. SEALE, J. MAJOR & P.M. HAWKEY. 1993.** Prevalence of *Listeria spp.* on the hands of food workers. *Journal of Food Protection* 56: 525–527.
- KO, R., L.T. SMITH & G.M. SMITH. 1994.** Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and criotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 176: 426–431.
- LINNAN, M.J., L. MASCOLA, X.D. LOU, V. GOULET, S. MAY, C. SALMINEN, D.W. HIRD, M.L. YONEKURA, P. HAYES, R. WEAVER, A. AUDURIER, B.D. PIKAYTIS, S.L. FANNIN, A. KLEKS & C.V. BROOME. 1988.** Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319: 823–828.
- LOMONACO, S., L. DECASTELLI, D. NUCERA, S. GALLINA, D. MANILA BIANCHI & T. CIVERA. 2009.** *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. *International Journal of Food Microbiology* 128: 516–20.
- LOU, Y. & A.E. YOUSEF. 1999.** Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 131–224. New York: Marcel Dekker Inc.
- LUIS-JUAN MORALES, A. 1994.** *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y su importancia en la salud pública. Tesis de maestría. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara.
- MATURIN, L.J. 1995.** *Inhibitory substances in milk*. En Food and Drug Administration (Comp.), Bacteriological Analytical Manual 8th edition. pp. 20.01–20.06. Arlington VA: AOAC International.
- MCLAUCHLIN, J., M.H. GREENWOOD & P.N. PINI. 1990.** The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *International Journal of Food Microbiology* 10: 255–262.
- MONTES O., M. G., G. RODRÍGUEZ, P. CASAUBÓN, C.L. ALDRETE, H.L. MOLINAR, R. ANGELES, R. HERNÁNDEZ & R. PEÑA. 1999.** Listeriosis neonatal: reporte de un caso. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. 6: 240–244.
- MORENO-ENRIQUEZ, R. I., A. GARCIA-GALAZ, E. ACEDO-FELIX, I.H. GONZALEZ-RÍOS, J.E. CALL, J.B. LUCHANSKY & M.E. DIAZ-CINCO. 2007.** Prevalence, types, and geographical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail Queso Fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora, Mexico. *Journal of Food Protection* 70: 2596–2601.

- OTERO MENDOZA, F.J., V. MONROY COLÍN, A. CARRANCO, J.A. DUEÑAS, F. MACKINNEY NOVELLO, G.E. ESTUDILLO JIMÉNEZ & N. GONZÁLEZ SALDAÑA. 2011.** Meningitis bacteriana por *Listeria monocytogenes* presentación de un caso y revisión de literatura. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría XXIV(95)*: 118–120.
- PRITCHARD, T.J., C.M. BELIVEAU, K.J. FLANDERS & C.W. DONNELLY. 1994.** Increased incidence of *Listeria* species in dairy processing plants having adjacent farm facilities. *Journal of Food Protection* **57**: 770–775.
- PRIEST, F. & B. AUSTIN. 1993.** *Modern Bacterial Taxonomy*. England: Chapman and Hall.
- RENALDI, J., F. BRITO, E. SANTOS, E. ARCURI, C.C. LANGE, M.A. BRITO, G.N. SOUZA, M.M. CERQUEIRA, J.M. BELTRAN, J.E. CALL, Y. LIU, A.C. PORTO-FETT & J.B. LUCHANSKY. 2008.** Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4954–4951.
- ROHLF, F.J. 2009.** *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems. Version 2.2E*. (United States of North America: Exeter Publishing Ltd).
- RYSER, E.T. 1999.** *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in unfermented dairy products*. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 299–358. New York: Marcel Dekker Inc.
- SCALLAN, E., R.M. HOEKSTRA, F.J. ANGULO, R.V. TAUXE, M.A. WIDDOWSON, S.L. ROY, J.L. JONES & P.M. GRIFFIN. 2011.** Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 7–15.
- SECRETARÍA DE SALUD. 2013.** Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica. Diario Oficial de la Federación. México D.F. 19 de febrero de 2013.
- SEELIGER, H.P.R. & K. HÖHNE. 1979.** *Serotyping of Listeria monocytogenes and related species*. En T. Bergan and J.R. Norris (Comps.), *Methods in Microbiology*. pp. 33–48. New York: Academic Press.
- SEELIGER, H.P.R. & D. JONES. 1986.** *Genus Listeria Pirie, 1940, 383AL*. En P.H.A. Sneath, H.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (Comps.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. pp. 1235–1245. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- SILVA, I.M., R.C. ALMEIDA, M.A. ALVES & P.F. ALMEIDA. 2003.** Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology* **81**: 241–248.
- SLADE, P.J. 1992.** Monitoring *Listeria* in the food production environment: I detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Research International* **25**: 45–56.
- SLUTSKER, L. & A. SCHUCHAT. 1999.** Listeriosis in humans. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 75–96. New York: Marcel Dekker Inc.
- SOLORZANO-SANTOS, F., J.L. ARREDONDO-GARCÍA, E. UDAETA-MORA, F.J. ORTIZ-IBARRA, G. ECHANIZ-AVILES & M. BELTRAN-ZUÑIGA. 1989.** Infección sistémica neonatal por *Listeria monocytogenes*. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **46**: 709–714.
- TOMPKIN, R.B. 2002.** Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection* **65**: 709–725.
- VÁZQUEZ-VILLANUEVA, J., B. ORGAZ, S. ORTIZ, V.LÓPEZ, J.V.MARTÍNEZ-SUÁREZ & C. SANJOSE. 2010.** Predominance and persistence of a single clone of *Listeria ivanovii* in a Manchego cheese factory over 6 months. *Zoonoses and Public Health* **57**: 402–10.
- WELLS, J.G., G.K. MORRIS & P.S. BRACHMAN. 1971.** New method of isolating *Salmonellae* from milk. *Applied Microbiology* **21**: 235–239.
- WING, E.J. & S.H. GREGORY. 2002.** *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *The Journal of Infectious Diseases* **185**: S18–S24.
- YDE, M. & A. GENNICOT. 2004.** Use of PFGE to characterize clonal relationships among Belgian clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Medical Microbiology* **53**: 399–402.

Efecto de algas marinas en el desarrollo de *Gerbera jamesonii* (Asteraceae)

The effect of seaweed on the development of *Gerbera jamesonii* (Asteraceae)

María Luisa García Sahagún, Alicia de Luna Vega, César Zúñiga Campa, Osvaldo Alejandro Bañuelos Gutiérrez y Mariana Silva Echeverría

Departamento de Producción

Agrícola, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, La Venta del Astillero, 45110, Zapopan, Jalisco, México.

✉ mlgsahagun@gmail.com

Citar

Resumen

Con el propósito de evaluar el efecto de algas marinas en el desarrollo de gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus), se llevó a cabo un experimento que se estableció bajo invernadero, en las instalaciones del Departamento de Producción Agrícola del CUCBA durante 2013. Se utilizaron 60 plantas de gerbera de la variedad «Pink elegance» a las que se aplicaron algas marinas al sustrato siguiendo las recomendaciones de los productos comerciales *Alga 600*, *Seaweed* y *Osmocalm*; además de los testigos. Los tratamientos se aplicaron en el trasplante y cada 15 días durante siete ocasiones. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 15 repeticiones; se elaboró un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico NCSS. Las variables evaluadas fueron: número de hojas, número de tallos florales, longitud de tallo (cm) y diámetro de capítulo (cm). Se observó el efecto promedio de los tratamientos sobre la variable número de hojas, superando al testigo. En el caso del número de tallos, *Alga 600* produjo mayor cantidad que el resto de tratamientos (2). La longitud de los tallos en las plantas con los tratamientos superó al testigo (18.42 cm); *Osmocalm* presentó el mayor valor numérico con 30.91 cm de longitud. El valor promedio del diámetro de los capítulos fue menor en el tes-

tigo (4.96 cm), observándose diámetros de hasta 7.71 cm en el caso de *Osmocalm*. Cabe aclarar que en la segunda cosecha se obtuvieron diámetros de capítulos hasta de 11.5 cm por efecto de *Alga 600*, y 11.7 cm por *Seaweed*.

Palabras clave: *Alga 600*, *Seaweed*, *Osmocalm*, CUCBA, Universidad de Guadalajara

Abstract

To evaluate the effect of seaweed on the development of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus), an experiment under greenhouse conditions was conducted at the Department of Agricultural Production, University Center for Biological and Agricultural Sciences (CUCBA), in 2013. Sixty gerbera plants of the «Pink elegance» variety were used and seaweed was applied to the substrate as recommended by the commercial products *Alga 600*, *Seaweed* and *Osmocalm*, setting aside controls. Treatments were applied by transplantation every 15 days a total of 7 times, following a completely randomized distributed design with 15 replicates. Analysis of variance and a Tukey mean comparison test ($p \leq 0.05$) were applied using the NCSS statistical package. The variables evaluated were: number of leaves, number of flower stems, stem length (cm), and diameter of the capitulum (in cm). The average effect of the different

treatments on the variable number of leaves surpassed controls. Regarding the number of stems, *Alga 600* produced a higher amount than the other treatments (2). The length of stems in the treated plants exceeded controls (18.42 cm). *Osmocalm* produced the highest average length at 30.91 cm. The average value for the diameter of the capitula was lower in controls

(4.96 cm), as diameters up to 7.71 cm were observed with *Osmocalm*. Significantly, the second crop produced capitula diameters of up to 11.5 cm with *Alga 600*, and 11.7 cm with *Seaweed*.

Key words: *Alga 600*, *Seaweed*, *Osmocalm*, CUCBA, Universidad de Guadalajara.

Introducción

La gerbera (*Gerbera jamesonii*) es apreciada en todo el mundo como planta de jardín y como flor de corte. Los países exportadores de gerbera más importantes son Holanda, Colombia, Costa Rica, Israel y República Dominicana. Reportes del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP 2011) señalan que en el período 2003–2011, el valor de las exportaciones mexicanas de flores creció a un ritmo de 6 % anualmente; para el último año, el comercio exterior de flores significó 26 millones 93 mil dólares, monto superior 5 % al registrado en 2010. Rosa, gladiola, gerbera, ave del paraíso, clavel, statice (*Limonium*) y margarita son los productos de exportación por excelencia a Estados Unidos de Norteamérica y Canadá. Según estimaciones de SIAP (2011), fueron 25 mil 500 productores quienes encabezaron estas actividades y generaron alrededor de 188 mil empleos permanentes, 50 mil eventuales y un millón de indirectos. Siete de cada diez productores residen en el Estado de México, Distrito Federal, Jalisco, Morelos y Puebla. Villa Guerrero en el Estado de México, produce cerca de una tercera parte de la producción nacional de flores. Si se considera el valor porcentual sobre el valor de la producción de flores generada en el Estado de México durante 2011, el 7 % corresponde a gerbera.

Con el fin de mejorar el rendimiento de las plantas se han utilizado bioestimulantes entre los que se incluyen las algas marinas; sin embargo, poco se ha investigado sobre su efecto en la calidad de las flores. Cuando las algas marinas se incorporan al suelo se mejoran sus propieda-

Introduction

Gerbera (*Gerbera jamesonii*) is prized worldwide as a garden plant and a flower for bouquets. The major gerbera-exporting countries are The Netherlands, Colombia, Costa Rica, the Dominican Republic and Israel. Reports from Mexico's Agricultural and Fisheries Information Service (SIAP 2011) show that in the 2003–2011 period the value of Mexican flower exports grew at an annual rate of 6 %, while in the last year foreign trade in flowers reached 26 million dollars, surpassing the figure for 2010 by 5 %. Roses, gladiolas, gerberas, bird of paradise, carnations, armeria (*Limonium*) and daisies are the most important flower products exported to the U.S. and Canada. SIAP estimates (2011) indicate that the approximately 25 500 active producers generated around 188 000 permanent jobs, 50 000 temporary jobs and almost one million indirect jobs. Seven out of ten producers reside in the State of Mexico, the Federal District, Jalisco, Morelos and Puebla. Villa Guerrero in the State of Mexico produces about a third of national flower production. In terms of the percentage value of flower production in the State of Mexico in 2011, gerbera accounted for approximately 7 %.

To improve plant yields, biostimulants including seaweeds are used, but little research has been done on their effect on flower quality. Adding *Seaweed* to soil improves its physical, chemical and biological properties, increases yields, and enhances the quality of fruit crops by providing all the required macro- and micronutrients plus natural substances that act as growth-regulators (Biotropic 2011). Compounds identified in sea-

des físicas, químicas y biológicas, incrementan las cosechas y favorecen la calidad de los frutos porque suministran a los cultivos todos los macro y micro nutrientes; además, aportan sustancias naturales que actúan como reguladores de crecimiento (Biotropic 2011). Dentro de los compuestos ya identificados en las algas se tienen agentes quelatantes como ácidos algínicos, fúlvicos y manitol así como vitaminas y cerca de 5000 enzimas (Crouch & van Staden 1992). En ese contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de algas marinas en el desarrollo de gerbera (*Gerbera jamesonii*).

Materiales y métodos

El experimento se estableció bajo invernadero, ubicado en las instalaciones del Departamento de Producción Agrícola del CUCBA durante 2013 (figura 1). Se utilizaron 60 plantas de gerbera de la variedad «Pink elegant» a las que se aplicaron algas marinas en el sustrato siguiendo las recomendaciones de los productos comerciales Alga 600 (2 g/l con *Laminaria*, *Ascophyllum* y *Sargassum*), Seaweed (1 ml/l con *Laminaria*, *Ascophyllum*) y Osmocalm (1 ml/l con *Macrocystis pyrifera*), además de testigos en los que no se realizó ninguna aplicación. Los tratamientos se administraron en el trasplante y cada 15 días durante 7 ocasiones. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 15 repeticiones y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico NCSS (Hintze 2001). Las variables evaluadas fueron: número de hojas, número de tallos florales, longitud de tallo (cm) (figura 2) y diámetro de capítulo (cm) (figura 3).

weed include chelating agents such as alginic acids, fulvic acids, vitamins, mannitol and around 5 000 enzymes (Crouch & van Staden 1992). In light of this, the aim of this study was to assess the effect of seaweed on the development of gerbera (*Gerbera jamesonii*).

Materials and methods

The experiment was conducted under greenhouse conditions at the Department of Agricultural Production, University Center for Biological and Agricultural Sciences (CUCBA), in 2013 (figure 1). Sixty gerbera plants of the variety «Pink elegance» were used and seaweeds were applied to the substrate as recommended by the commercial products *Alga 600* (2 g/l with *Laminaria*, *Ascophyllum* and *Sargassum*), *Seaweed* (1 ml/l with *Laminaria*, *Ascophyllum*), and *Osmocalm* (1 ml/l with *Macrocystis pyrifera*). Controls with no treatment were maintained. Treatments were applied by transplantation every 15 days to a total of seven times. Treatments were distributed in a completely randomized design with 15 replicates. Analysis of variance and a Tukey mean comparison test ($p \leq 0.05$) were used with the NCSS statistical package (Hintze 2001). The variables evaluated were: number of leaves, number of flower stems, stem length (cm) (figure 2), and diameter of the capitulum (cm) (figure 3).

Figura 1. Experimento de gerbera bajo invernadero.
Figure 1. Gerbera experiment under greenhouse conditions.





Figura 2. Longitud de tallos.
Figure 2. Length of stems.



Figura 3. Diámetro de capítulos.
Figure 3. Diameter of the capitulum.

Resultados

En el cuadro 1 se presentan los resultados del análisis de varianza para las variables de desarrollo de gerbera, por efecto de la aplicación de algas marinas. En ese cuadro se pueden observar diferencias significativas $p \leq 0.01$ para el efecto de los tratamientos en las variables número de hojas y tallos, longitud de tallo y diámetro de capítulo. Para el efecto de las cosechas se observaron diferencias altamente significativas para el número de hojas y tallos y solo significativas para el diámetro de capítulos. En la interacción tratamientos por cosecha, hubo diferencias altamente significativas para el número de hojas y solo significativas para el diámetro de capítulos.

En el cuadro 2 se observa el efecto promedio de los tratamientos sobre las variables número de hojas, observándose que la aplicación de algas marinas superó en todos los casos al testigo. En el caso del número de tallos el tratamiento con *Alga 600* produjo mayor cantidad de tallos que el resto de tratamientos. La longitud de los tallos en los tratamientos con algas marinas, superó al

Results

The results of the analysis of variance for the variables of gerbera development due to the application of seaweed are presented in table 1, which shows significant differences ($p \leq 0.01$) for the effect of treatments on the variables number of leaves, number of stems, stem length, and diameter of the capitulum. Regarding crops, we observed a highly significant effect on number of leaves and number of stems with a significant effect for diameter differences in the capitula. The interaction of treatments per crop showed highly significant differences for number of leaves and a significant effect for diameter of the capitula.

Table 2 shows the average effect of treatments on the variable number of leaves, where applying seaweed exceeded controls in all cases. For number of stems, *Alga 600* produced a larger number than the other treatments. The length of stems treated with *Seaweed* exceeded controls (18.42 cm). *Osmocalm* had the highest average length at 30.91 cm. The diameter of the capitula was lower in controls (4.96 cm) than in plants

Cuadro 1. Resultados del análisis de varianza para las variables de desarrollo de gerbera por efecto de la aplicación de algas marinas.

VARIABLES	Valor de tratamientos (T)	Valor de cosecha (C)	Valor de interacción T×C
Número de hojas	0.036798 *	0.000000**	0.003200 **
Número de tallos	0.142 *	0.000000 **	0.302773
Longitud de tallos	0.000708 *	0.305976	0.452492
Diámetro de capítulos	0.009680 *	0.000002 *	0.031889 *

* Diferencias significativas $p \leq 0.05$. ** Diferencias altamente significativas $p \leq 0.01$.

Table 1. Results of analysis of variance for variables in gerbera development due to the effect of applying seaweed.

VARIABLES	Treatment values	Crop value	Interaction value T×C
Number of leaves	0.036798 *	0.000000**	0.003200 **
Number of stems	0.142 *	0.000000 **	0.302773
Stem lengths	0.000708 *	0.305976	0.452492
Diameter of capitula	0.009680 *	0.000002 *	0.031889 *

* Significant differences $p \leq 0.05$. ** Highly significant differences $p \leq 0.01$.

Cuadro 2. Efecto de algas marinas en las variables de desarrollo de gerbera.

Tratamiento	Número de hojas	Número de tallos	Longitud de tallos	Diámetro de capítulo
<i>Alga 600</i>	12.89 a	2.25 a	29.32 a	7.67 a
<i>Seaweed</i>	16.30 a	1.76 b	29.37 a	6.82 a
<i>Osmocalm</i>	15.41 a	1.75 b	30.91 a	7.71 a
Testigo	11.23 b	1.42 b	18.42 b	4.96 b

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

Table 2. Effect of seaweed on the development variables of gerbera.

Treatment	Number of leaves	Number of stems	Stem lengths	Diameter of capitula
<i>Alga 600</i>	12.89 a	2.25 a	29.32 a	7.67 a
<i>Seaweed</i>	16.30 a	1.76 b	29.37 a	6.82 a
<i>Osmocalm</i>	15.41 a	1.75 b	30.91 a	7.71 a
Witness	11.23 b	1.42 b	18.42 b	4.96 b

Means with the same letter are statistically equal (Tukey $p \leq 0.05$).

Figura 4. Capítulos cosechados por tratamiento. De izquierda a derecha *Seaweed* (SW), *Alga 600* (A600), testigo (T) y *Osmocalm* (PN).

Figure 4. Capitula harvested according to treatment. From left to right, *Seaweed* (SW), *Alga 600* (A600), witness (T) and *Osmocalm* (PN).



Cuadro 3. Efecto de las cosechas en el diámetro del capítulo de gerbera por aplicación de algas marinas.

Tratamiento	Cosechas						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Alga 600</i>	7.8 a	11.5 a	5.8 a	5.3 a	8.5 a	8.8 b	8.8 a
<i>Seaweed</i>	7.9 a	11.7 a	4.6 b	3.4 b	7.9 a	6.5 c	4.6 b
<i>Osmocalm</i>	7.8 a	8.5 b	6.9 a	4.7 b	5.8 b	10.2 a	11.0 a
Testigo	5.3 b	8.3 b	6.3 a	1.7 c	4.3 c	4.4 c	4.0 b

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales Tukey ($p \leq 0.05$).

Table 3. Effect of application of seaweed on the head diameter of harvested gerbera.

Treatment	Crops						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Alga 600</i>	7.8 a	11.5 a	5.8 a	5.3 a	8.5 a	8.8 b	8.8 a
<i>Seaweed</i>	7.9 a	11.7 a	4.6 b	3.4 b	7.9 a	6.5 c	4.6 b
<i>Osmocalm</i>	7.8 a	8.5 b	6.9 a	4.7 b	5.8 b	10.2 a	11.0 a
Witness	5.3 b	8.3 b	6.3 a	1.7 c	4.3 c	4.4 c	4.0 b

Means with the same letter are statistically equal (Tukey $p \leq 0.05$).

testigo (18.42 cm); *Osmocalm* presentó el mayor valor numérico con 30.91 cm de longitud. El diámetro de los capítulos fue menor en el testigo (4.96 cm) que en las plantas a las que se aplicaron algas marinas, observándose diámetros de hasta 7.71 cm en el caso de *Osmocalm* (figura 4).

En el cuadro 3 se observa el efecto de la aplicación de algas marinas sobre el diámetro de los capítulos de gerbera, a través de siete cosechas. El tratamiento con *Alga 600* presentó valores más altos en las cosechas 1, 2, 3, 4, 5 y 7 al igual que *Seaweed* en las cosechas 1, 2 y 5 y de manera similar *Osmocalm* en las cosechas 1, 2, 6 y 7. Cabe aclarar que en la segunda cosecha se obtuvieron diámetros de capítulos hasta de 11.5 cm y 11.7 cm por efecto de *Alga 600* y *Seaweed* respectivamente.

Discusión

Los resultados positivos obtenidos por el efecto de aplicación de las algas marinas en las variables de gerbera: número de hojas y tallos, longitud de tallo y diámetro de capítulo, coinciden con lo reportado por (Abetz & Young 1983) quienes señalaron que la aplicación de *Ascophyllum nodosum* incrementó el diámetro en coliflor. Senn (1987) hizo notar que la incorporación de algas

treated with *Seaweed*. The largest diameters, up to 7.71 cm, were achieved with *Osmocalm* (figure 4).

Table 3 shows the effect of applying seaweed on the diameter of the capitula of gerbera in a total of 7 crops. Treatment with *Alga 600* produced higher values in crops 1, 2, 3, 4, 5 and 7, as did *Seaweed* for crops 1, 2 and 5, and *Osmocalm* in crops 1, 2, 6 and 7. It should be noted that crop 2 produced capitula diameters of up to 11.5 cm and 11.7 cm due to the effect of *Seaweed* and *Alga 600*, respectively.

Discussion

Positive results from the effect of applying seaweeds to gerbera were obtained for the following variables: number of leaves, number of stems, stem length, and diameter of the capitulum. These findings concur with those reported by Abetz & Young (1983), who noted that applying *Ascophyllum nodosum* increased the diameter of cauliflower heads. Senn (1987) observed that adding algae increases product yield and quality by supplying plants with all required macro- and micronutrients plus 27 natural substances with effects similar to those of growth-regulators. Among the compounds already identified in algae we find chelating agents such as alginic acid,

al suelo incrementa las cosechas y favorece la calidad porque se administra a los cultivos no sólo todos los macro y micronutrientes que requiere la planta, sino también 27 sustancias naturales cuyos efectos son similares a los reguladores de crecimiento. Dentro de los compuestos ya identificados en las algas se tienen agentes quelatantes como ácidos algínicos, fúlvicos y manitol así como vitaminas, cerca de 5 mil enzimas y algunos compuestos biocidas que controlan algunas plagas y enfermedades de las plantas (Crouch & van Staden 1992).

Canales (1999) también reporta que en un experimento con tomate que se llevó a cabo en La Florida, EUA, que se estableció en camas cubiertas con plástico negro, el extracto de algas *Algaenzims*[®] se aplicó al suelo en la cama y dos veces foliar, la producción se incrementó hasta un 20 %.

Conclusión

A causa de los resultados obtenidos en la investigación, es posible considerar la aplicación de algas marinas en otros cultivos y determinar su influencia en la producción de cosechas. ❖

fulvic acid and mannitol, as well as vitamins, almost 5 000 enzymes, and some biocidal compounds that control some pests and plant diseases (Crouch & Van Staden 1992).

Canales (1999) reported that in an experiment with tomato conducted in Florida, USA, using beds covered with black plastic, the algae extract *Algaenzims*[®] was applied to the soil in the bed. Under those experimental conditions, foliage doubled and production increased by 20 %.

Conclusion

The results of this research clearly suggest that it may be worthwhile to consider applying seaweed to other plants to determine its effect on crop production. ❖

Referencias | References

SIAP (SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA). 2011. *El valor de la producción de las ornamentales en México.* Disponible desde Internet <http://www.siap.gob.mx/produccion-ornamental-mexico/> (Consultado el 5 de noviembre de 2013, 12:10).

ABETZ, P., & C.L. YOUNG. 1983. The effect of seaweed extract sprays derived from *Ascophyllum nodosum* on lettuce and cauliflower crops. *Botánica Marina* 26(10): 487–492. ISSN (Online) 1437–4323.

CANALES B., L. 1999. Enzimas-algas. Posibilidad de su uso para estimular la producción agrícola y mejorar los suelos. *Terra Latinoamericana* 17(3): 271–276. ISSN (print) 0187–5779.

CRONCH, L. & J. VAN STADEN. 1992. *Evidence of the presence of growth regulators in commercial seaweed products.* Department of Botany, University of Natal, Republic of South Africa. Ed. Kluwer Academic Publishing. The Netherlands.

HINTZE, J. 2001. *Number Cruncher Statistical Systems.* Kaysville, Utah.

SENN, T.L. 1987. *Seaweed and plant growth.* Ed. Alpha Publishing Group, Houston, Texas, USA. (*Crecimiento de alga y planta*, Traducido al Español por Benito Canales López).

Ampliación de la distribución del ocelote

(*Leopardus pardalis*, Felidae) a la subcuenca de San Marcos, Jalisco, México

Expansion of the distribution of the ocelot

(*Leopardus pardalis*, Felidae) into the San Marcos sub-basin, Jalisco, Mexico

Oscar Báez Montes¹ y Yadira Fabiola Estrada Sillas²

¹Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato, Aldana # 12. Col. Pueblito de Rocha, Guanajuato, 36040. Guanajuato. Tel. (473) 735-2600.

²Asesora independiente.

✉ biologo.oscar.baez@gmail.com

Citar

Resumen

Se reporta una camada de ocelotes (*Leopardus pardalis*) en un camino vecinal desprovisto de vegetación en el municipio de Amacueca, Jalisco, México. La camada constaba de cinco cachorros, siendo mayor a la reportada en vida silvestre y sin protección alguna en la madriguera, lo cual se puede considerar como un evento atípico. Este registro proporciona nueva información sobre el tamaño máximo de camada y su ubicación en vida silvestre.

Palabras clave: Camada, madriguera, Laguna de Sayula, ocelote.

Abstract

An ocelot litter (*Leopardus pardalis*) found at a local road devoid of vegetation in Amacueca, Jalisco, Mexico is reported. The litter was composed of five kittens. A larger litter size than what has been reported in wildlife. The kittens were discovered in their shelter unattended and without guard protection which is an uncommon finding. This observation provides new evidence regarding the maximum amount of kittens in an ocelot litter, as well as its location in wildlife.

Key words: Den, litter, Laguna de Sayula, ocelot.

El ocelote (*Leopardus pardalis* Linnaeus) es un felino manchado de tamaño mediano similar a un lince (*Lynx rufus* Schreber), pero con la cola larga, anillada, que rara vez toca el piso. En Jalisco comparte territorio con el margay o tigrillo (*Leopardus wiedii* Schinz) semejante en forma, sin embargo el ocelote es un poco mayor (70–100 cm vs. 53–79 del tigrillo; Murray y Gardner 1997), de cola más corta (27–45 cm vs. 33–51 cm, Murray y Gardner, *op. cit.*) y con líneas paralelas en la nuca y transversales cerca de los hombros (Davis 1974). Las crías recién nacidas tienen manchas en todo su cuerpo, pero

The ocelot (*Leopardus pardalis* Linnaeus) is a medium-size spotted feline similar to the lynx (*Lynx rufus* Schreber), but with a long, ringed tail that rarely touches the ground. In the state of Jalisco, Mexico, it shares territory with the margay (or tigrillo, *Leopardus wiedii* Schinz), which is similar in form, though the ocelot is somewhat larger (70–100 vs. 53–79 cm; Murray and Gardner 1997), with a shorter tail (27–45 vs. 33–51 cm, Murray and Gardner, *op. cit.*), parallel lines in the occipital area and transversal markings near the shoulders (Davis 1974). Newborn ocelots have spots all over their bodies with gray

su pelaje es gris con la porción inferior de sus extremidades en tonalidades de oscuras a negras (Murray y Gardner *op. cit.*). *Leopardus pardalis* tiene una distribución exclusivamente neotropical. En México habita en zonas en los denominados por Rzedowski (1978), Bosque Tropical Perennifolio y Bosque Tropical Caducifolio (Tewes y Schmidly 1987, Sánchez *et al.* 2002, Ahumada-Carrillo *et al.* 2013, Valdez-Jiménez *et al.* 2013), más allá de este gradiente de vegetación, se le ha registrado en bosques de pino-encino y diversos tipos de matorrales (Aranda 2000, Chávez-León 2005, Iglesias *et al.* 2008, Bárcenas y Medellín 2010, Ahumada-Carrillo *et al.* 2013). Se localiza en ambas vertientes desde los estados de Sonora hasta Chiapas y de Nuevo León y Tamaulipas hasta Quintana Roo (CONABIO 2010). Para Jalisco, su distribución conocida potencial se localiza en la provincia fisiográfica Costa del Pacífico, seguida de las provincias Eje Neovolcánico y Depresión del Balsas (Ceballos-González *et al.* 2006). Los municipios con registros de ocelote son La Huerta, Autlán de Navarro, Cuautitlán de García Barragán y Bolaños (GBIF 2013, UNIBIO 2013, Ahumada-Carrillo *et al.* 2013; figura 1). Además, Ramírez-Martínez *et al.* (2011) reportan su presencia en la Sierra de Quila, sin precisar el municipio.

Durante un recorrido vespertino (18:30 horas) en febrero del 2005, se registró una camada de cachorros de *Leopardus pardalis*, en el municipio de Amacueca, Jalisco, en un camino vecinal de terracería (20°0'36"N y 103°35'21") a una elevación de 1386 m, a la orilla de un camino aledaño desprovisto de vegetación, a tan solo 500 m de la cabecera municipal, asociados a un lindero de piedra cercano a un cultivo de pitayas (*Stenocereus queretaroensis* (F.A.C. Weber) Buxb.). Se realizó el hallazgo de uno de los cachorros de la camada sobre el camino, previo al paso de un vehículo, por lo en una primera instancia se pensó, que se trataba de un gato doméstico. Se localizó la camada que constaba de cinco cachorros, que en vida silvestre es mayor a la reportada, según Tewes y Schmidly (*op. cit.*), uno a dos o hasta cuatro, siendo lo usual dos (Bragin 2003). A causa de que todavía no abrían los ojos, se pudo deducir que tenían por lo menos dos semanas de nacidos (Tewes y Schmidly *op. cit.*, Murray y Gardner *op. cit.*). Las crías se encontraban en el

fur and dark-to-black coloring on the bottom of their extremities (Murray and Gardner *op. cit.*). *Leopardus pardalis* is distributed exclusively in neo-tropical climates. In Mexico, it inhabits zones identified by Rzedowski (1978) as Coniferous Tropical Forest and Deciduous Tropical Forest (Tewes and Schmidly 1987; Sánchez *et al.* 2002; Ahumada-Carrillo *et al.* 2013; Valdez-Jiménez *et al.* 2013). Beyond this vegetation gradient its presence has been registered in mixed pine-oak forests and diverse types of scrubland (*matorrales*) (Aranda 2000; Chávez-León 2005; Iglesias *et al.* 2008; Bárcenas and Medellín 2010; Ahumada-Carrillo *et al.* 2013) on both of Mexico's main mountain ranges, from the state of Sonora to Chiapas in the west, and from Nuevo Leon and Tamaulipas to Quintana Roo in the east (CONABIO 2010). In Jalisco, its known potential distribution is limited to the physiographic province called Costa del Pacífico, followed by provinces in the Neo-volcanic Axis and the Balsas Depression (Ceballos-González *et al.* 2006). The municipalities with recorded ocelot sightings are La Huerta, Autlán de Navarro, Cuautitlán de García Barragán, and Bolaños (GBIF 2013; UNIBIO 2013; Ahumada-Carrillo *et al.* 2013; figure 1). Also, Ramírez-Martínez *et al.* (2011) report its presence in the Sierra de Quila, but do not mention a municipality.

During an evening survey (18:30 h) in February 2005, a litter of *Leopardus pardalis* cubs was found in the municipality of Amacueca on the shoulder of a dirt access road (20°0'36"N, 103°35'21") with no vegetation at an elevation of 1 386 m.a.s.l. (4 540 ft.), barely 500 m (1 640 ft.) from the municipal administrative center, in association with a stone fence near a field of pitayas (*Stenocereus queretaroensis* (F.A.C. Weber) Buxb.). One of the cubs was seen on the roadway by a passing motorist, and was originally thought to be a domestic cat. The litter was found later and consisted in five cubs; the largest litter reported to date in the wild. According to Tewes and Schmidly (*op. cit.*), litters normally consist of just one or two cubs, with two being the usual number (Bragin 2003). Because the newborns had not yet opened their eyes, it was deduced that they were born at least two weeks earlier (Tewes and Schmidly *op. cit.*; Murray and Gardner *op. cit.*). The cubs were found on

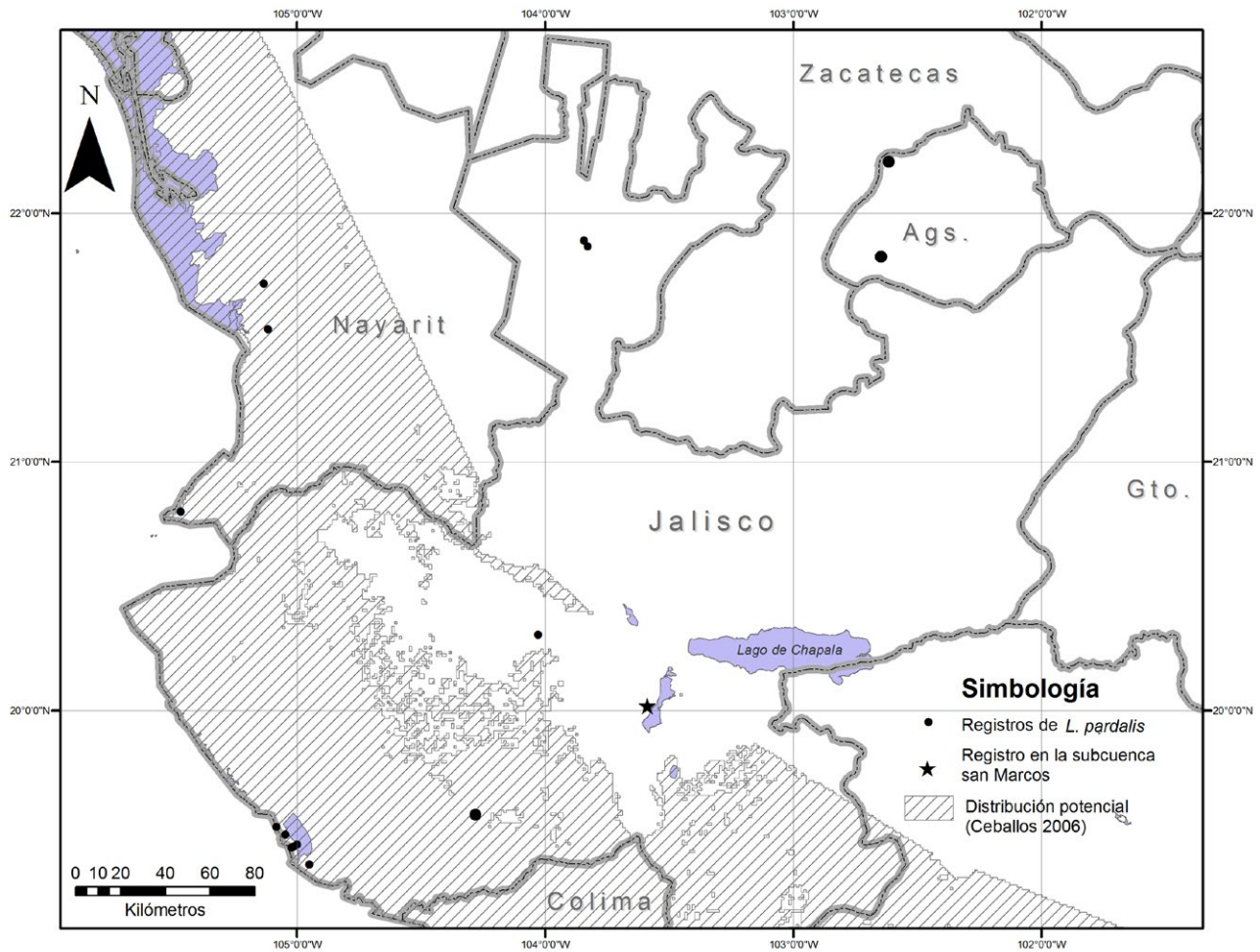


Figura 1. Registros y distribución potencial de *Leopardus pardalis* en Jalisco. Fuente: Ceballos 2006, CONABIO 2010, GBIF 2013, UNIBIO2013.

Figura 1. Recordings and potential distribution of *Leopardus pardalis* in Jalisco.

suelo, desprovistos de cualquier protección (hojas o rocas), de forma atípica a lo que se menciona en la literatura, en donde se señala que suelen tener su madriguera en alguna cueva de rocas, orificios de árboles o en áreas arbustivas densas (Tewes y Schmidly *op. cit.*, Murray y Gardner *op. cit.*).

La cría que se encontró sobre el camino, tenía una respiración débil y pausada, por lo que posterior a la determinación de un felino silvestre, fue llevada a rehabilitación al Centro de Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS Guadalajara), pero, por desgracia, pereció en el trayecto. La corroboración en la identificación la realizó el Dr. Sergio Guerrero Vázquez del Centro de Estudios en Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de

open ground with no shelter or protection (eg. leaves or rocks). According to the literature, this is atypical for ocelots, whose cubs are normally born in burrows, caves in rocks, orifices in trees, or densely-bushed areas (Tewes and Schmidly *op. cit.*; Murray and Gardner *op. cit.*).

The cub found on the road had weak, intermittent respiration, so when it was identified as a wild feline it was taken to the Center for Wildlife Research and Conservation (*Centro de Conservación e Investigación de la Vida Silvestre*, CIVS, Guadalajara) for rehabilitation. Unfortunately, it died in transit. Identification was corroborated by Dr. Sergio Guerrero Vázquez at the Center for Zoological Studies (*Centro de Estudios en Zoología*) at the University Center of Biological and Agricultural Sciences (University of Guada-

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

COLECCION DE: VERTEBRADOS
SECCION: Mamíferos

FAMILIA Felidae CATN° 339
 N.C. Leopardus pardalis
 CUENCA _____ N° EJ. _____
 ESTADO Jalisco MUNICIPIO Amarueca
 LOC. 13q 647550 2213193
 FECHA 01/feb/2005 COL.N° _____
 COL. Oscar Baez y Fabiola Estrada
 DET. _____



Figura 2. Ejemplar de ocelote *Leopardus pardalis* depositado en la colección de vertebrados del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Figure 2. Specimen of the ocelot (*Leopardus pardalis*) deposited in the vertebrate collection of the University Center for Biological and Agricultural Sciences, University of Guadalajara.

la Universidad de Guadalajara. El espécimen se depositó en la colección zoológica bajo el número CZUG-339 (figura 2). Las crías restantes no fueron manipuladas y se dejaron intactas en el lugar en donde fueron localizadas. En una visita en el mes de marzo posterior al encuentro, no se encontraron evidencias de las otras crías.

La relevancia de este registro, además de proporcionar nueva información acerca del tamaño máximo de camada y ubicación de las crías en vida silvestre, es porque corresponde a una ampliación en el área de distribución de la especie en Jalisco, en 70 km al este (86 km NE) del registro más cercano en el municipio de Cuatitlán de García Barragán (FCB 2773, UNIBIO 2013), aunque si se considera el centroide de la poligonal del Área Natural Protegida Sierra de Quila (Ra-

lajara). The specimen was donated to the Center's zoological collection (#CZUG-339, figure 2). The other newborns were not handled, but left intact where they were discovered. A subsequent visit in March revealed no evidence of those cubs.

In addition to the new information it provided on maximum litter size and the location of these wild ocelot cubs, the importance of this discovery resides in the fact that it demonstrates an expansion of the distribution area of this species in Jalisco. The discovery occurred 70 km (43.5 mi.) east and 86 km (53.5 mi.) NE of the closest recorded sighting in the municipality of Cuatitlán de García Barragán (FCB 2773; UNIBIO 2013); the area considered the centroid of the polygonal of the *Sierra de Quila* Natural Protected Area (Ramírez-Martínez *et al.* 2011). The distance

mírez-Martínez *et al.* 2011), la distancia entre estos registros corresponde a 57 km al sur-sudeste.

Asimismo, el ocelote (*Leopardus pardalis*) es uno de los ocho carnívoros que se encuentran en peligro de extinción en México (NOM-059-SEMARNAT-2010); por otro lado, se encuentra enlistada en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. En este Apéndice se incluyen las especies sobre las que se cierne el mayor grado de peligro, catalogándose en peligro de extinción (CITES 2013).

Este registro le otorga mayor relevancia al área, considerando las designaciones nacionales (Carrera y De la Fuente 2003) e internacionales (Ramsar 2003) que en la subcuenca de San Marcos tiene la laguna de Sayula y su entorno, sobre todo para la conservación no solo del vaso lacustre sino de las serranías aledañas que forman parte de su dinámica natural. El hallazgo aquí referido sugiere la necesidad de continuar con los inventarios biológicos y de acciones para la conservación de sus ecosistemas, de las especies prioritarias y en alguna categoría de riesgo, y de sus posibles corredores biológicos. En la mayoría de los registros para Jalisco, la presencia de *Leopardus pardalis* se encuentra vinculada con la presencia de un área natural protegida federal: Chamela-Cuitxmala, Sierra de Manantlán, Sierra de Quila y Cuenca alimentadora del Distrito Nacional de Riego 043; sin embargo, en la subcuenca de San Marcos no se cuenta con un instrumento para su protección, por lo cual, se espera que ésta evidencia de poblaciones reproductivas de *L. pardalis* pueda aportar elementos para una declaratoria futura.

Agradecimientos

A Marcela Güitrón López, Oscar Sánchez Herrera y Sergio Guerrero Vázquez por sus comentarios y observaciones al manuscrito, así como a dos revisores anónimos. Al director del laboratorio Laguna de Sayula, Guillermo Barba, por su apoyo durante las actividades de campo y al Ayuntamiento de Amacueca por sus facilidades y apoyo para el establecimiento de la estación

between the two sightings is 57 km (35.5 mi.) south-southeast.

It is important to mention that the ocelot (*Leopardus pardalis*) is one of eight carnivores in Mexico that are in danger of extinction (NOM-059-SEMARNAT-2010), and that it is included in the list of Appendix I of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, which catalogues the species deemed to be in the greatest danger of extinction (CITES 2013).

This discovery also increases the importance of the area, considering the national (Carrera and De la Fuente 2003) and international (Ramsar 2003) designations regarding the Sayula Lagoon and its surrounding area in the San Marcos sub-basin, especially for the conservation of the lakeside environment and neighboring sierras that form part of its natural dynamics. The finding discussed herein suggests the need to continue conducting biological inventories and actions designed to conserve ecosystems and possible biological corridors for high-priority species that are currently under some degree of risk. Indeed, most of the recordings of *Leopardus pardalis* in Jalisco are linked to the presence of a federal Natural Protected Area, such as Chamela-Cuitxmala, Sierra de Manantlán, Sierra de Quila, and the feeding basin for National Irrigation District #043. However, the San Marcos sub-basin does not have the instrumentation required to provide such protection, so it is hoped that this evidence of the presence of reproductive populations of *L. pardalis* will provide elements for a future declaration.

Acknowledgments

The authors wish to thank Marcela Güitrón López, Oscar Sánchez Herrera, Sergio Guerrero Vázquez, and the two anonymous reviewers, for their comments and observations on the manuscript; the Director of the *Laboratorio Laguna de Sayula*, Guillermo Barba, for support offered during field activities; and the municipal government (*Ayuntamiento*) of Amacueca for its facilities and support in establishing a biological sta-

biológica. Servando Carvajal revisó y mejoró el estilo del texto en español.

tion. Servando Carvajal reviewed and improved the original spanish text.

Referencias | References

- ARANDA, M. 2000.** *Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Instituto de Ecología A.C. 212 pp.
- AHUMADA-CARRILLO, I.T., J.C. ARENAS-MONROY Y M.A. ÍÑIGUEZ. 2013.** Presence of the ocelot (*Leopardus pardalis*) in northern Jalisco, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84**: 718–721.
- BÁRCENAS, H., Y R. MEDELLÍN. 2010.** Ocelot (*Leopardus pardalis*) in Aguascalientes, Mexico. *The Southwestern Naturalist* **55**(3):447–449.
- BRAGIN N. 2003.** *AZA North American regional studbook for ocelot (Leopardus pardalis).* Denver, Colorado: The Denver Zoo. 132 pp.
- CARRERA, E. Y DE LA FUENTE G. 2003.** *Inventario y clasificación de Humedales en México, Parte I.* Ducks Unlimited de México A.C. 239 pp.
- CEBALLOS-GONZÁLEZ, G.J., S. BLANCO, C. GONZÁLEZ Y E. MARTÍNEZ. 2006.** *Leopardus pardalis (ocelote) Distribución potencial, escala 1:1000000.* Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- CHÁVEZ-LEÓN, G. 2005.** A recent record of *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) from Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Mastozoología* **9**: 123–127.
- CITES. CONVENCION SOBRE EL COMERCIO INTERNACIONAL DE ESPECIES AMENAZADAS DE FAUNA Y FLORA SILVESTRES. 2013.** En <http://www.cites.org/esp/index.php>, última consulta 15 de enero de 2013.
- CONABIO. COMISION NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD. 2010.** 'Leopardus pardalis (ocelote). Distribución conocida', Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Datos obtenidos del Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB), registros comprendidos entre los años de 1878 y 2001 (registros no continuos). México.
- DAVIS, W.B. 1974.** The mamals of Texas. *Texas Parks and Wildlife Bulletin* **41**:1–252.
- GBIF. GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. 2013.** Accessed through GBIF data portal, CNMA/Colección de Mamíferos de la Estación de Biología Chamela, <http://data.gbif.org/datasets/resource/8396>; Colección Nacional de mamíferos, <http://data.gbif.org/datasets/resource/776>.
- IGLESIAS, J., V. SÁNCHEZ-CORDERO, G. MAGAÑA-COTA, M. ARANDA, R. HERNÁNDEZ Y F.J. BOTELLO. 2008.** Noteworthy records of margay, *Leopardus wiedii* and ocelot, *Leopardus pardalis* in the state of Guanajuato, México. *Mammalia* **72**: 347–349.
- MURRAY, J.L. Y G.L. GARDNER. 1997.** *Leopardus pardalis.* *Mammalian species* **548**: 1–10.
- RAMSAR. 2003.** *Sitios Ramsar en México.* En http://ramsar.conanp.gob.mx/docs/sitios/FIR_RAMSAR/Jalisco/Laguna_de_Sayula/Laguna%20de%20Sayula.pdf, última consulta: enero del 2013.
- RAMÍREZ-MARTÍNEZ, M.M., L.I. ÍÑIGUEZ-DÁVALOS, P. IBARRA-LÓPEZ, MA. DE L. SÁNCHEZ-AGUILAR Y R. BECERRA SALGADO. 2011.** Aproximación al inventario de biodiversidad de mamíferos medianos en el área de protección de flora y fauna Sierra de Quila. En R. Villavicencio-García, A.L. Santiago-Pérez, V.C. Rosas-Espinoza y L. Hernández López (comps.). *Memorias I Foro de conocimiento, uso y gestión del área natural protegida Sierra de Quila.* Pp. 44–48.
- SÁNCHEZ, O., J. RAMÍREZ-PULIDO, U. AGUILERA-REYES Y O. MONROY-VILCHIS. 2002.** Felid record from the state of Mexico, Mexico. *Mammalia* **66**(2): 289–294.
- SEMARNAT. SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. 2010.** *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.* Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.
- TEWES, M.E., Y D.J. SCHMIDLY. 1987.** The neotropical felids: jaguar, ocelot, margay, and jaguarundi. En M. Novak, J.A. Baker, M.E. Obbard, y B. Malloch (Eds.), *Wild furbearer management and conservation in North America.* Pp. 695–

712. Ministry of Natural Resources, Ontario, Canada.
- UNIBIO. UNIDAD DE INFORMÁTICA PARA LA BIODIVERSIDAD. (2013).** En <http://unibio.unam.mx/minero/>, última consulta 2 de marzo de 2013.
- VALDEZ-JIMÉNEZ, D., C.M. GARCÍA-BALDERAS Y G.E. QUINTERO-DÍAZ. 2013.** Presencia del ocelote (*Leopardus pardalis*) en la “Sierra del Laurel”, Municipio de Calvillo, Aguascalientes, México. *Acta zoológica mexicana* **29**(3): 688–692.

JORGE ROBERTO GONZÁLEZ-TAMAYO

(13 de noviembre de 1940 – 20 de enero de 2014)

Citar

Roberto González Tamayo nació, «por azares del destino», como él mismo decía, en la ciudad de México, el 13 de noviembre de 1940, pero cuando cumplió su primer año de edad, sus padres mudaron de residencia a la población de La Barca, en Jalisco y después a Guadalajara, donde llevó a cabo todos sus estudios elementales. Amancio Rodríguez, maestro de preparatoria de Roberto González Tamayo poseía una colección particular de orquídeas silvestres. Cuando ellas florecían, las llevaba al salón de clase para el disfrute de sus discípulos, fue allí donde le nació el interés por estos organismos tan fascinantes. Pero fue el Dr. Salvador Rosillo de Velasco, el responsable de darle las bases para el trabajo taxonómico. En aquel tiempo todo el conocimiento orquideológico giraba en torno a 50 especies mexicanas y, para esa época, era una tarea bastante compleja.

En la actualidad, el número de especies se acerca a las 500, sólo en Jalisco.

Más tarde, tuvo la oportunidad de conocer a otros connotados investigadores, quienes desempeñaron un papel importante en la botánica de Jalisco, me refiero al caso particular de la profesora Luz María Villarreal de Puga (figura 1),

Roberto González-Tamayo was born “by a twist of fate”, he said, in Mexico City on November 13 1940, but around his first birthday his parents moved to the town of La Barca, Jalisco, and then to Guadalajara, where he received his education. Amancio Rodríguez, one of his high school teachers, had a private collection of wild orchids, and when they blossomed he would take them to the classroom, to the delight of his students. Thus was born González-Tamayo’s interest in these fascinating organisms. But it was Dr. Salvador Rosillo de Velasco who provided him with the bases for his taxonomic work. At that time, knowledge of orchids focused on 50 Mexican species and classifying them was a rather daunting task.

Today, the number of species found in the state of Jalisco, Mexico, alone is around 500!

Later, González-Tamayo had the opportunity to meet other renowned researchers who would play important roles in the study of plants in Jalisco. First among them was Professor Luz María Villarreal de Puga (figure 1), who introduced him to Dr. Jerzy Rzedowski who, in turn, presented him to Dr. Rogers McVaugh. These figures, in addition to sharing their enthusiasm, gave Roberto their support and the moral and

Figura 1. Durante la ceremonia de condecoración con la Medalla «Luz María Villarreal de Puga a la Excelencia en Biología», a Roberto González Tamayo (21 de septiembre de 1995). De izquierda a derecha: Fernando Alfaro Bustamante (24 de mayo de 1953 – 2 de agosto de 2001), Luz María Villarreal de Puga (8 de marzo de 1913 – 11 de noviembre de 2013), Roberto González Tamayo (13 de noviembre de 1940 – 20 de enero de 2014), Servando Carvajal (22 de octubre de 1955).

Figure 1. During the award ceremony the «Luz María Puga Villarreal of Excellence in Biology» Medal to Roberto González Tamayo (September 21, 1995). From left to right: Fernando Alfaro Bustamante (May 24, 1953 – August 2, 2001), Luz María Villarreal of Puga (March 8, 1913 – November 11, 2013), Roberto González Tamayo (November 13, 1940 - January 20, 2014), Servando Carvajal (October 22, 1955).



quien lo introdujo con el Dr. Jerzy Rzedowski y éste, a su vez, con el Dr. Rogers McVaugh; todos ellos, además del entusiasmo, le dieron a Roberto González Tamayo, todo su apoyo y la motivación moral y académica para que continuara adelante con sus trabajos. Gracias a eso, fue capaz de dejar a un lado su brillante carrera de Ingeniero Químico que había concluido en 1964, y la orquideología mexicana ganó uno de sus máximos exponentes.

Dada la frecuencia con la que iba a coleccionar a Mascota y San Sebastián del Oeste, lugares poco conocidos desde el punto de vista botánico y por ende, todavía ricos en especies desconocidas para la ciencia, en una ocasión se encontró con el por aquel entonces señor Cura de Mascota, quien le preguntó que qué hacía por aquellos lugares tan remotos. Al conocer su interés por las orquídeas y sus propósitos, le comentó que en realidad era en Cuale donde se podrían encontrar las más raras y llamativas.

Por esa razón y después de haberlo comprobado, en 1969, trasladó su residencia de Guadalajara a la Sierra de Cuale, ubicada en Talpa de Allende, Jalisco. En esos lugares vivió él por espacio de trece años, y allí tuvo la oportunidad de estudiar, en su ambiente natural a la mayoría de sus queridas plantas. Por aquellos tiempos, para poder llegar a la población sólo era posible por dos caminos de herradura: desde Puerto Vallarta y desde Talpa. Por lo que enfermarse o accidentarse eran de los riesgos que uno debería considerar, pues tendría que ser llevado en andas a cualquiera de esos lugares, a veces con consecuencias funestas. La mortandad infantil, a causa de la ignorancia de las madres y la nulidad de servicio médicos, eran asuntos cotidianos.

Estas situaciones tocaron las fibras más sensibles del maestro y dedicó mucho de su tiempo en labores sociales que contribuyeron a mejorar la calidad de vida de los habitantes de esos lugares mediante la ampliación y cuidado de los huertos frutales, la cría y mantenimiento de cerdos y aplicó mucho de su esfuerzo para que se abrieran las vías de comunicación, entre otras. De esos lugares, de donde quizá conservó sus mejores recuerdos adquirió, además del conocimiento botánico, una comprensión muy profunda de la

académica motivación que necesitó para continuar con su trabajo. Gracias largamente a su interés, decidió dejar a un lado una brillante carrera en Ingeniería Química en 1964, y así la orquideología mexicana ganó uno de sus máximos exponentes.

González-Tamayo often collected orchids in Mascota and San Sebastián del Oeste, places little-known in botany, but ones that produced a rich variety of species, many unknown to science at the time. On one occasion he met the priest who attended the parish of Mascota and asked him about those remote places. When the priest learned of his interest in orchids and his objectives, he told him that the best place to find rare and striking species was the Sierra de Cuale.

His curiosity piqued, and having verified the priest's affirmation, he moved from Guadalajara to Sierra de Cuale, in Talpa de Allende, Jalisco, in 1969, where he lived for 13 years, enjoying the opportunity to study most of his beloved plants in the wild. At that time, the only access to the village was via two bridle paths, one from Puerto Vallarta, the other from Talpa. This constituted not a little risk, as anyone who took sick or had an accident had to be carried on a litter to one of those towns, sometimes with dire consequences. Unfortunately, infant mortality due to the lack of medical services and mothers' inexperience was a common occurrence.

Those hardships touched Roberto's heartstrings and he devoted much of his time to social work and efforts to raise the quality of life of local inhabitants. He helped them tend their gardens and orchards, assisted in farming and pig-raising, and labored long and hard to improve existing roads and open new ones, among many other tasks. It was perhaps there that he acquired his fondest memories, plus much of his botanical knowledge, while also achieving a deep understanding of ways to feel and think about country folk that would imprint, and be reflected in, comments he made later in life.

By 1960, González-Tamayo had won wide acclaim for his career as a collector of botanical specimens. His collection consisted of more than 4,000 items and he contributed to enriching the collections of various institutions, including

forma de sentir y de pensar de la gente del campo, huella que le quedó tan grabada, que siempre se reflejó en sus comentarios.

Desde 1960 al maestro González Tamayo se le reconoció su trayectoria como colector de muestras botánicas; el número de ejemplares superó con facilidad los cuatro mil y contribuyeron al enriquecimiento de los acervos de diversas instituciones: el del Instituto Politécnico Nacional (ENCB), el del Herbario Nacional (MEXU), el del Instituto de Ecología del Bajío (IEB), el de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO), el de la Universidad de Michigan (MICH) y el de la Universidad de Wisconsin (WIS); pero, entre todos ellos destaca el del Herbario del Instituto de Botánica de nuestra Universidad, que ese mismo año fundó la hoy doctora Luz María Villarreal de Puga y en la que tuvo bastante participación el maestro Tamayo. El estudio de algunos de los ejemplares colectados por él, condujo al descubrimiento de numerosas especies nuevas para la ciencia, de las que no fueron pocas las que honraron su nombre, otras sirvieron para ampliar el límite de distribución geográfica y, otras más, en un número significativo aún permanecen a la espera de algún especialista que se interese por ellas, lo más seguro es que con más y más novedades.

Su contribución a la formación de recursos humanos, que en ocasiones pasó inadvertida para casi todas las personas que trabajaron a su lado, es incuestionable. Muchos de los hoy investigadores del Instituto de Botánica, somos egresados de esta *Alma Mater* e iniciamos nuestra carrera como profesionales de la botánica, con mucho entusiasmo y deseos, más que conocimientos y experiencia.

Para todos nosotros, e incluso para los que se incorporaron de otras instituciones, el maestro González Tamayo, siempre tuvo el tiempo disponible para atender nuestras dudas, para satisfacer nuestras preguntas, para revisar con sumo cuidado los «mamotretos» —como a él le gusta llamar a nuestros manuscritos.

Su experiencia se transfirió a nosotros en forma natural, vertida con frases agudas e ingeniosas, o salpicada con palabras que, por su forma

the Instituto Politécnico Nacional (ENCB), the National Herbarium (MEXU), the Instituto de Ecología del Bajío (IEB), the Mexican Orchid Association (AMO), and the Universities of Michigan (MICH) and Wisconsin (WIS); but of all these, the one that stands out is the Herbarium of the Botany Institute at our University, founded that year by Dr. Villarreal de Puga with the extensive participation of Professor González-Tamayo. The study of some specimens that he had collected led to the discovery of many species that were new to science, several of which now bear his name. Others served to expand the geographical limits of orchid distribution, while a significant number await the attention of an interested specialist. It is very likely that more novelties will emerge.

González-Tamayo's contribution to the training of human resources, often unnoticed by many who worked at his side, is unquestioned. Many current researchers at the Botany Institute are graduates of the University of Guadalajara who began their professional careers in botany perhaps with more enthusiasm and desire than actual knowledge and experience.

For all of us, including those who arrived from other institutions, Professor González Tamayo always made time to answer our questions, clarify our doubts, and carefully review our 'tomes' —as he used to call our writings.

His always transmitted his experience naturally, expressed with grand acuity and witty phrases; peppered with coarse words, though these lost whatever offensive connotations they may have had because of the way he pronounced and employed them. At some point, each one of us turned to him for advice, and he never let us down, always providing —through his own peculiar way of presenting his points of view— opinions that greatly helped us channel our own. Although I told him directly on many occasions, once again I wish to express here my deep gratitude for his teachings and contributions that remain indelibly imprinted in my mind to this day.

The innate ability and discipline that Professor González Tamayo possessed —or acquired during his lifetime— made him a natural leader.

de decirlas y de emplearlas perdieron ya toda su connotación ofensiva, si alguna vez la tuvieron. En algún momento, todos tuvimos que recurrir a él en busca de su consejo y nunca nos sentimos defraudados, pues nos aportó, con esa forma tan característica que tiene de presentar sus puntos de vista, las opiniones suficientes para poder encauzar las propias. Aunque en muchas ocasiones se lo dije verbalmente, quiero dejar constancia aquí de mi más profundo reconocimiento por sus enseñanzas y aportaciones que como una impronta indeleble permanecen en mi mente.

La habilidad innata que poseía el maestro González Tamayo, así como la disciplina que adquirió a lo largo de toda su vida, lo convirtieron en un líder por naturaleza. Fue fundador del *Boletín del Instituto de Botánica*, ahora conocido como *ibugana*. El esfuerzo que aplicó a las funciones de editor permitieron que dicha publicación fuera conocida y reconocida no sólo en el ámbito nacional, sino también a escala internacional; en su período se publicaron diez volúmenes que comprendieron treinta números y 137 artículos. En ese mismo tiempo, fue editor de la *Colección Flora de Jalisco*. En el marco de ese proyecto se generaron dieciséis volúmenes, trece de los cuales fueron editados por él. En 2005, me cedió su lugar como editor de ambas publicaciones y, no obstante el empeño con que las he conducido, descubrí que eran empresas colosales que han requerido toda mi dedicación y entusiasmo y su situación actual es sana.

La importancia de su trabajo sobre las orquídeas mexicanas no admite duda alguna. Él dedicó toda su vida al estudio de estos enigmáticos y bellísimos vegetales. Y estaba firmemente convencido de su obra, a la que él consideraba, con esa modestia que lo caracterizaba «como una investigación que, llegado el día, alguien tendría que hacer, y me tocó a mí, pero bien pudo haber sido otro...». Es cierto que hay otros que hoy día estudian orquídeas, y que el número de pesquisas que es posible desarrollar en ellas es infinito, pero exceptuando a los botánicos orquideólogos del siglo pasado, dudo que haya alguno que en estos momentos desarrolle sus estudios con esa minuciosidad y tenacidad que raya casi en lo patológico.

He was a founder of the *Bulletin of the Institute of Botany*, entitled *ibugana*, and his dedication to the functions of the editor made this publication known and recognized not only in Mexico but around the world. Under his editorship, 10 volumes comprising 30 issues with 137 published articles appeared. Around the same time, he edited the collection, *Flora de Jalisco*, a project that produced 16 volumes, 13 of which he edited. In 2005, he ceded his place as editor of both publications to me and, despite my best efforts, I find they are colossal undertakings that require total dedication and enthusiasm in order to maintain their current healthy status.

There can be no doubt as to the importance of his work on Mexican orchids, for he devoted his life to studying these beautiful and enigmatic plants. His work absorbed him completely, though he regarded it with characteristic modesty, “as research that someone would have to do some day, and it fell to me to do it, though it could well have been some other...” Certainly many others now do study orchids, and the number of projects that could be proposed is infinite, but with the possible exception of a few botanical orchidologists of the last century, I doubt there are any that currently develop studies with the almost pathological thoroughness and tenacity that characterized his work.

González Tamayo’s contributions to plant science are recorded in 65 scientific papers and 16 notes published in Mexico and abroad; writings that are immediately recognizable by his peculiar style. To give but one example: “This species is dedicated to that [...] keen fossil collector capable of finding the vertebra of a microbe, if they had them, and if they were fossilized”.

He described no fewer than 50 new species, most of which he dedicated to Mexican researchers, as well as 65 new combinations and 8 new genera, including *Hagsatera*, *Netzahuatcoyotlia*, *Luzmaria* and *Gracielanthus*. The importance of the discovery and publication of the genus *Hagsatera* in 1974 lay in the fact that since 1825 no Mexican botanist had proposed a new genus in the family Orchidaceae, so it took almost 150 years for that to happen!

Su contribución particular a la ciencia de las plantas se registra en 65 artículos y 16 notas científicas que publicó no sólo en México, sino también en el extranjero; a ellos es posible reconocerlos por ese estilo tan peculiar que tenía para escribir, sólo por citar un caso: ‘esta especie se dedica a [...] colector de fósiles entusiasta quien sería capaz de encontrar una vertebra de microbio, si estos las tuvieran y se fosilizaran’.

Describió no menos de 50 especies nuevas, casi todas dedicadas a investigadores mexicanos, así como 65 combinaciones nuevas y ocho géneros nuevos, entre los que cabe mencionar a *Hagsatera*, *Luzmaria*, *Netzahuatcoyotlia* y *Gracielanthus*. La importancia de la descripción y publicación del género *Hagsatera* en 1974, radicó en que desde 1825 ningún botánico mexicano había propuesto un género nuevo dentro de familia Orchidaceae, esto es, ¡tuvieron que pasar casi 150 años para que ocurriera!

Por otro lado, su afición al dibujo científico lo llevó a confeccionar no menos de 600 ilustraciones sobre orquídeas de México, lo que le permitió ganar reconocimiento en varios países de Europa, Estados Unidos, Canadá y México, como uno de los mejores artistas botánicos. Más de cien de esos dibujos, dada la calidad científica de lo que representan y el preciosismo puestos en su ejecución, fueron utilizados para ilustrar el volumen 16 correspondiente a la familia de las orquídeas de la «Flora Novogaliciana» de Rogers McVaugh y que fue dado a la luz en 1985.

Conviene aclarar que Rogers McVaugh requirió, en muchas ocasiones, de la opinión del maestro González Tamayo para poder llevar a término el libro. Pero aun así, hoy día, a 29 años de su publicación, el libro de las orquídeas de la Flora Novogaliciana, requiere una revisión exhaustiva. Y esto fue evidente para el propio McVaugh quien le solicitó a Roberto que llevara a cabo las adiciones y correcciones pertinentes para una nueva edición de «las Orquídeas» que, según cálculos del propio Tamayo, podría ser el doble en cuanto al número de especies que se tratarían en esta revisión.

Roberto González se preocupó por establecer vínculos con otras instituciones educativas y con

In addition, his passion for scientific drawing led him to produce no fewer than 600 illustrations of Mexican orchids; an opus that has earned him recognition in several countries in Europe and in the U.S., Canada and Mexico, as one of the most outstanding botanical artists of all time. Because of the scientific quality they represent and their refined elaboration, over 100 of these drawings were used as illustrations for volume 16 of Rogers McVaugh’s work on the orchid family entitled *Flora Novogaliciana*, edited in 1985.

It is important to note that McVaugh himself often turned to González-Tamayo for his opinions as he completed his book. But today, almost 30 years after its publication, *Flora Novogaliciana* requires a thorough re-edition. McVaugh himself was well aware of this and asked Roberto to make the required additions and corrections for a new edition. According to González Tamayo’s estimates, the number of species documented in the new edition could well double.

González-Tamayo also had interest in establishing links with other educational institutions and the private sector. For example, he undertook joint studies with the Botany Institute and the Botanical Garden of Havana, Cuba, and worked on projects with the *Ciba-Geigy* and *Kodak* companies. He also served as an adviser to the Sierra de Alica Foundation in Nayarit, Mexico. One of his greatest achievements was organizing the celebration of the 30th anniversary of the Herbarium at the Botany Institute in 1990.

No one can doubt that the solitude of the Sierra de Cuale helped mold González-Tamayo’s character, for he detested the noise and bustle of urban civilization and fled from them and anything else that entailed meetings or ceremonies.

But that was his nature, his personality, his idiosyncrasy. I believe that if we could understand the language of the orchids that he studied and cherished, they would no doubt express their respect for him, for he was the man who brought a little order to the chaos in which they had existed at the hands of the many dabblers who had taken interest in them.

la iniciativa privada. Inició los trabajos conjuntos entre el Instituto de Botánica y el Jardín Botánico de la Habana, Cuba. Elaboró proyectos con las compañías Ciba-Geigy y Kodak. Fue asesor de la Fundación Sierra de Álica, Nayarit. Uno de sus logros más importantes fue su gestión para celebrar el trigésimo aniversario del Herbario del Instituto de Botánica en 1990.

Para nosotros no hay ninguna duda que la soledad de la Sierra de Cuale, le moldearon un carácter que lo hizo detestar y huir del ruido y la civilización urbana y todo aquello que implicara reuniones y ceremonias.

Pero ese era su carácter, esa era su personalidad, su idiosincrasia, considero que las propias orquídeas que él estudió y que tanto amó, si pudiéramos comprender su lenguaje, nos expresarían sin lugar a dudas su propio respeto hacia él, por ser quien puso un poquito de orden en ese caos al que se han visto sometidas por la mano de tantos y tantos aficionados interesados en ellas.

Servando Carvajal¹

Servando Carvajal¹

¹ The author thanks L.M. González Villarreal the photograph illustrating this document.

¹ El autor agradece a L.M. González Villarreal la fotografía que ilustra este documento.

Publicaciones | Publications

GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1974. Género nuevo y una nueva especie de Jalisco: *Hagsatera rosilloi*. *Orquídea* (México), n.s. 3(11): 342–357.

GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1975 [1974]. *Rodriguezia dressleriana*, a new species from western México. *Orquídea* (México), n.s. 4(8): 233 [–235].

GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1974. *Rodriguezia dressleriana*, una nota adicional. *Orquídea* (México), n.s. 4(10): 298.

GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1976. Preliminary list of orchids from Jalisco. *Orquídea* (México), n.s. 5(11): 350.

GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1977. *Habenaria brevilabiata*, a rare and variable species. *Orquídea* (México), n.s. 6(6): 176–178.

GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1977. *Mormodes*: algunas consideraciones estructurales de la flor. *Orquídea* (México), n.s. 6(6): 172.

- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1978.** *Habenaria rzedowskiana*, an old undescribed species. *Orquídea* (México), n.s. **7**(2): 138–141.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1991.** *Malaxis martinezii* (Orchidaceae), una especie nueva muy cercana a *M. reichei*. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(1): 33–38.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1992.** Dos especies nuevas del género *Habenaria* (Orchidaceae). *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(4): 321–332.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1992.** *Malaxis luceroana* (Orchidaceae) una nueva especie en honor de una estudiosa de la botánica. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(2): 88–93.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1992.** *Malaxis ruizii*, una nueva especie del occidente de México (Orchidaceae). *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(3): 211–216.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1992.** *Schiedeella garayana* (Orchidaceae), una nueva especie del estado de Jalisco. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(2): 42–48.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1992.** Una nueva especie de *Bulbophyllum* (Orchidaceae) de Jalisco. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(2): 107–112.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** Reseña de libro: R. McVaugh. 1993. Flora Novo-Galiciana Vol. 13, Limnocharitaceae to Typhaceae. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(5): 395–396.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** Una nueva especie de *Epidendrum* (Orchidaceae) del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(6): 441–448.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** Laelias de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(6): 461–462.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** Base de datos Litbul. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(6): 463.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** Algunas consideraciones sobre el género de *Habenaria* (Orchidaceae) en México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(7): 485–511.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** Una nueva especie de *Deyregine* (Orchidaceae) del estado de Jalisco, México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(7): 513–519.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** El género *Physogyne* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Orquídea* (México), n.s. **13**(1–2): 173–180.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1993.** Une nouvelle espèce de *Govenia* du Mexique occidental. *L'Orchidophyle* **109**: 228–232.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1994.** *Malaxis rodriguezana* (Orchidaceae), una nueva especie del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **2**(3–4): 97–102.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1994.** Reseña de libro: Flora de Manantlán. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **2**(3–4): 161.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1994.** *Oestlundorchis velatoides* (Szlach.) Szlach. et Tamayo comb. nov. En: Studies on the Spiranthinae (Orchidaceae). 1. Miscellanea, D.L. Szlachetko. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **39**(2): 417–438.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1994.** *Pseudogodyera pseudogodyeroides* (L.O. Williams) Tamayo y Szlach. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **39**(2): 417–438.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1994.** Una curiosa *Malaxis* (Orchidaceae) del occidente de México. *Acta Botánica Mexicana* **29**: 93–100.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1995.** Algunas especies nuevas de *Habenaria* con flores verdes en México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **3**(1–3): 53–85.

- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1995.** *Malaxis casillasii* (Orchidaceae), interesante especie del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 3(1-3): 123-127.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1995.** Postliminium de género *Ocampoa* (Orchidaceae). *L'Orchidophile* 118: 169-175.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1995.** Una nueva especie de *Kreodanthus* (Orchidaceae-Goodyerinae) del occidente de México y El Salvador. *Acta Botánica Mexicana* 31: 33-38.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1996.** *Malaxis perezii* (Orchidaceae), especie nueva del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 4(1-3): 49-55.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1996.** *Nezahualcoyotlia* (Cranchidinae, Orchidaceae), nuevo género del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 4(1-3): 65-71.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1997.** *Encyclia contrerasii*, une nouvelle espèce du Mexique occidental. *L'Orchidophile* 127: 93-98.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1998.** Dos especies nuevas de *Habenaria* (Orchidaceae) del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 6(2-3): 203-212.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1998.** *Malaxis roblesgilana* (Orchidaceae), especie nueva del estado de Nayarit, México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 6(2-3): 219-225.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1998.** Reseña de libro: Anderson, C. 1997. Monograph of *Stigmaphyllon* (Malpighiaceae). *Systematic Botany Monographs* 51: 1-313. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 5(1-3): 505-506.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1999.** A new subspecies of *Schiedeella llaveana* (Orchidaceae) from western México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 7(1-3): 79-84.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1999.** Dos especies nuevas de *Svenkoeltzia* (Orchidaceae), del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 7(1-3): 39-49.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1999.** Une nouvelle espèce de *Malaxis* (Orchidaceae) du Mexique occidental. *L'Orchidophile* 138: 180-184.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 2000.** Diversité des orchidées du Mexique occidental. Actes du 14 Colloque Paris 6: 90-100. Société Française D'Orchidophilie.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 2000.** Una especie nueva de *Malaxis* (Orchidaceae) del estado de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 8(1-2): 175-179.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 2001.** *Pachygenium*, a new genus of the subtribe Ciclopogoninae (Orchidaceae). *Polish Botanical Journal* 46(1): 3-6.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 2001.** *Deiregyne cochleata* (Orchidaceae, Spiranthinae), a new species from Mexico. *Polish Botanical Journal* 46(1): 35-38.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 2003.** Inauguración de las nuevas instalaciones del Herbario AMO. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 9(1-2): 79-83.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 2003.** Reseña de libro: Espejo-Serna, A., J. García-Cruz, A.R. López-Ferrari, R. Jiménez-Machorro y L. Sánchez-Saldaña. 2002. Orquídeas del estado de Morelos. *Orquídea* 16: 1-332. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 9(1-2): 85-86.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 2003.** *Malaxis* (Orchidaceae), breve discusión de los rasgos específicos y dos taxones nuevos mexicanos. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 10(1-2): 67-75.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. 1982.** *Cutsis Balogh*, Greenwood et González, a new genus from México. *Phytologia* 51(5): 297 [-298].

- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & A. JOUY. 1994.** Aperçu sur les Orchidées mexicaines. *L'Orchidophile* **112**: 101–108.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & A. JOUY. 1994.** Aperçu sur les Orchidées mexicaines. *L'Orchidophile* **113**: 163–170.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & A. JOUY. 1994.** Aperçu sur les Orchidées mexicaines. *L'Orchidophile* **114**: 231–241.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & A. JOUY. 1995.** Aperçu sur les Orchidées mexicaines. *L'Orchidophile* **116**: 53–62.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & A. JOUY. 1995.** Commentaire sur le genre *Crybe*. *L'Orchidophile* **117**: 116–123.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & D.L. SZLACHETKO. 1995.** A new species of *Physogyne* (Orchidaceae, Spiranthinae) from the State of Colima in western Mexico. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **40**(2): 767–770.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & D.L. SZLACHETKO. 1995.** *Gracielanthus*, a new genus of Spiranthinae (Orchidaceae) from Mexico and Central America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **40**(2): 759–765.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & D. L. SZLACHETKO. 1998.** A new definition of the genus *Tamayorkis* (Malaxideae, Epidendroideae, Orchidaceae). *Annales Botanici Fennici* **35**: 21–27.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & E. HAGSATER. 1984.** *Laelia bancalari*, a new species of western México. *Orquídea* (México), n.s. **9**(2): 371–374.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & E. HAGSATER. 1988.** Salvador Rosillo de Velasco, una semblanza biográfica. *Orquídea* (México), n.s. **11**: 1–8.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & E. W. GREENWOOD. 1984.** *Malaxis rosilloi*, a new species from western México. *Orquídea* (México), n.s. **9**(2): 392–395.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & R. SOLTERO-QUINTANA. 1991.** *Ponthieva hildae* (Orchidaceae), una nueva especie de Jalisco. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**: 8–14.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & R. RAMÍREZ-DELGADILLO. 1992.** *Cypripedium luzmarianum* (Orchidaceae), una nueva especie dentro del complejo *C. irapeanum*. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(2): 63–69.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & J.J. REYNOSO-DUEÑAS. 1993.** Una nueva especie de *Habenaria* (Orchidaceae), del occidente de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* **1**(5): 371–379.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & S. ALVARADO-CASILLAS. 1999.** Une espèce nouvelle du genre *Encyclia* (Orchidaceae) du Mexique occidental. *L'Orchidophile* **135**: 5–11.
- GONZÁLEZ-TAMAYO, R. & S. ZAMUDIO. 1993.** *Liparis volcanica* (Orchidaceae), una especie nueva del occidente de México. *Acta Botánica Mexicana* **23**: 59–64.
- GREENWOOD, E.W. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1978.** *Malaxis pollardii* L.O. Williams. *Orquídea* (México), n.s. **7**(1): 42–47.
- GREENWOOD, E.W. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1981.** *Malaxis amplexicolumna* E.W.Greenw. & R.González; una nueva especie de Chiapas, México. *Orquídea* (México), n.s. **8**(1): 121–129.
- GREENWOOD, E.W. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1983.** *Malaxis javensiae* (Reichb.f.) Ames. *Orquídea* (México) **9**(1): 123–134.
- HAGSATER, E. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1975.** *Encyclia kennedy* y *Encyclia adenocaula*. *Orquídea* (México), n.s. **4**(12): 355.
- HAGSATER, E. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1976.** Dos nuevas especies de *Notylia* sección *Atacroclinium* de México: *Notylia lexarzana* and *Notylia pachybulbon*. *Orquídea* (México), n.s. **5**(10): 289–302.

- HAGSATER, E. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1983.** *Epidendrum neogaliciensis*: una nueva especie de Jalisco, México. *Orquídea* (México), n.s. 9(1): 143–149.
- JENNY, H. & R. GONZALEZ-TAMAYO. 1997.** The Gongorinae, 7. *Stanhopea*, Part 16. Again *Stanhopea maculosa* from México, *Stanhopea saccata* Bateman, *Stanhopea radiosa* Lemaire and a new species, *Stanhopea pseudoradiosa*. *Caesiana* 9: 21–40.
- SALAZAR-CHÁVEZ, G. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1990.** *Ornithocephalus biloborostratus*, nueva especie del sur y occidente de México. *Orquídea* (México), n.s. 12(1): 87–92.
- SZLACHETKO, D. L. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1996.** *Triceratostris* (Orchidaceae, Spiranthinae) a new genus from México. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41(2): 1021–1022.
- SZLACHETKO, D.L. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1996.** *Diskyphogyne* (Orchidaceae, Spiranthinae), a new orchid genus from South America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41(1): 493–495.
- SZLACHETKO, D.L. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1996.** *Ochyrella* (Orchidaceae, Stenorrhynchidinae), a new genus from South America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41(2): 697–700.
- SZLACHETKO, D.L. & R. GONZÁLEZ-TAMAYO. 1998.** A new species of *Brachystele* (Orchidaceae) from western México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 5(1–3): 389–393.
- SZLACHETKO, D. L., R. GONZÁLEZ-TAMAYO & P. RUTKOWSKI. 2000.** *Zhukowskia*, a new orchid genus from Mesoamerica. *Adansonia* 22(2): 235–238.
- ZAMUDIO-RUIZ, S., A. P. MIRANDA-NÚÑEZ, R. GONZÁLEZ-TAMAYO & L. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ. 1998.** Luz María Villarreal de Puga, una maestra con vocación de naturalista. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 5(1–3): 1–59.
- CARVAJAL, S., R. GONZÁLEZ-TAMAYO & A.P. MIRANDA. 2004.** Luz María Villarreal de Puga, Apuntes para una biografía, Universidad de Guadalajara, México.
- RODRÍGUEZ COVARRUBIAS, M.I. & R. GONZÁLEZ TAMAYO. 2005.** Una especie nueva de *Hexalectris* (Orchidaceae) del occidente de México. *ibugana* 12(1): 17–21.
- GONZÁLEZ TAMAYO, R. & X.M. CUEVAS-FIGUEROA. 2006.** Apuntes para el estudio de las habenarias mexicanas con flores blancas (Orchidaceae). *ibugana* 12(2): 3–44.
- GONZÁLEZ TAMAYO, R. & X.M. CUEVAS-FIGUEROA. 2007.** Algunas habenarias del occidente de México, confundidas con *Habenaria filifera* S.Watson (Orchidaceae). *ibugana* 14(1–2): 23–49.
- GONZÁLEZ TAMAYO, R., L. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ & M.E.C. RAMÍREZ MEDINA. 2008.** Algunas novedades del género *Malaxis* (Orchidaceae) en el occidente de México. *ibugana* 14(1–2): 35–64.
- GONZÁLEZ TAMAYO, R. & L. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ. 2008.** Publicaciones del herbario AMO. *ibugana* 14(1–2): 65.
- GONZÁLEZ TAMAYO, R.J. & L. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ. 2010.** Las orquídeas del occidente de México. *CoECyT-JAL*. 1: 1–303.
- BATISTA, J.A.N., L. DE B. BIANCHETTI, R. GONZÁLEZ-TAMAYO, X.M. CUEVAS-FIGUEROA & P.J. CRIBB. 2011.** A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard papers in Botany* 16(2): 233–273.

Reconocimientos

- RZEDOWSKI, J. 1972.** Dos especies nuevas del género *Microspermum* (Compositae) del estado de Jalisco (México). Boletín de la Sociedad Botánica de México **32**: 77–86. [*Microspermum gonzalezii*]
- MCVAUGH, R. 1985.** Flora Novo-Galiciana Vol. 16 (Orchidaceae) *Malaxis tamayoana* Garay et Ktredge. 200–202 pp.
- SOTO ARENAS, M.A. 1987.** Revision of the mexican species of *Trichosalpinx* subgenus *Trichosalpinx*. Orquídea (México), n.s. **10**(2): 278– 96. [*Trichosalpinx tamayoana*]
- HÁGSATER, E. 1993.** *Epidendrum gonzalez-tamayoi* Hágsater, sp. nov. *Icones Orchidacearum* 2, figura 136.
- SOLTERO Q., R. 1993.** *Bletia x tamayoana* (Orchidaceae) Un híbrido natural. Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara **1**(5): 339–345.
- SZLACHETKO, D.L., 1994.** Studies on the Spiranthinae (Orchidaceae). I. Miscellaneous *Oestlundorchis rhombilabia* (Garay) Szlach. subsp. *tamayoi* Szlach. Subsp. nov. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **39**(2): 417–438.
- SZLACHETKO, D.L., 1995.** El género *Tamayorkis* Szlach. gen. nov. *Systema Orchidaliun*. 121–122.
- SZLACHETKO, D.L., 1996.** Studies on the Spiranthinae (Orchidaceae): I. Varia. *Deiregyne tamayoi* Szlach. sp. nov. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **41**(2): 845– 863.
- GARCÍA-CRUZ J., R. JIMÉNEZ, L. SÁNCHEZ, A. ESPEJO, A.R. LÓPEZ-FERRARI. 2000.** Notas sobre el género *Habenaria* (Orchidaceae) en México. Acta Botánica Mexicana **50**: 27–38. [*Habenaria gonzaleztamayoi*]
- VARGAS, O., M. MARTÍNEZ Y P. DÁVILA. 2002.** Two new species of *Physalis* (Solanaceae) endemic to Jalisco. México. *Brittonia* **53**(4): 505–510. [*Physalis tamayoi*]
- CUEVAS-FIGUEROA, X.M. & S. CARVAJAL. 2008.** *Ficus tamayoana*, una nova espécie de seção *Pharmacosycea* (Moraceae). *Albertoa* **35**: 269–275, (fig. 1–4).

e-Cucba es una revista internacional en línea, que publica artículos en cualquier aspecto de las Ciencias Naturales, Ciencias Aplicadas y Tecnología y que son sometidos a revisión por pares antes de su aceptación. Considera documentos sobre: Geociencias, Paleontología, Ciencias Biológicas, Botánica, Zoología, Tecnología y ciencias aplicadas, Ciencias médicas, Ingeniería y operaciones afines, Agricultura, Ganadería, Ciencias Florestales, Ciencia de los alimentos y tecnologías afines. Para los documentos que comprendan 60 páginas o más en la revista, se publicarán en un número especial y se le asignará además, un ISBN.

e-Cucba no tiene ningún costo por página y es una publicación de acceso libre. Todos los textos serán sometidos a revisión por dos o más árbitros anónimos antes de ser aceptados. **e-Cucba** pretende publicar cada documento en un plazo de seis meses después de la aceptación por parte de los editores. Para hacer esto posible, se aconseja en la preparación de su manuscrito leer con cuidado la información para los autores y consultar los números más recientes de **e-Cucba** en: <http://e-cucba.cucba.udg.mx>



Consejo Editorial del Cucba 2013-2016

Salvador Mena Munguía
Salvador González Luna
Servando Carvajal
Florencio Recendiz Hurtado
Daniel Ortuño Sahagún
Eduardo Ríos Jara
Rogelio Lépiz Ildefonso
Agustín Gallegos Rodríguez
Elisa Cabrera Díaz
Margarita Hernández Gallardo