

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías

Centro de Investigaciones Químicas

**“FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE
HIGIENE Y *Salmonella* Y EL COMPORTAMIENTO DE GRUPOS
PATÓGENOS DE *Escherichia coli* EN GERMINADO DE SOYA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ENRIQUE RAMÍREZ CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS

QA
QUÍMICA EN ALIMENTOS

Pachuca de Soto, Hidalgo 2006.



El presente trabajo se realizo en el laboratorio de botecnologia del centro de investigaciones quimicas de esta universidad.

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A DIOS A MIS PADRES POR CONFIAR EN MI, AL BRINDARME LA CONFIANZA Y EL AMOR A PESAR DE TODAS LAS ADVERSIDADES QUE NOS A PRESENTADO LA VIDA YA QUE DE ELLAS SOLO SE APRENDE.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Las verduras como vehículos de microorganismos patógenos.....	3
2.2 Riesgo asociado al consumo de verduras.....	3
2.3 Factores que contribuyen a la producción de ETAs por verduras.....	3
2.4 Incidencia de bacterias patógenas en verduras.....	6
2.5 Desarrollo y sobrevivencia de bacterias patógenas en verduras.....	8
2.6 Fuentes de contaminación de verduras.....	9
3. Germinados.....	10
3.1 Germinados de semillas.....	10
3.2 Soya.....	12
3.3 Composición del grano.....	12
4. Microbiología de germinados.....	13
4.1 Microorganismos patógenos en germinados de semillas.....	13
4.2 Desarrollo de bacterias patógenas en germinados.....	14
4.3 Algunos brotes por germinados de semillas.....	17
5. Microorganismos de interés sanitario.....	17
5.1 Organismos coliformes y características generales.....	17
5.2 <i>Escherichia coli</i>	18
5.3 Características generales.....	19
6. <i>E. coli</i> patógena.....	20
6.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP).....	20
6.2 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (ECEI).....	22
6.3 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ECET).....	23
6.4 ETAs causadas por <i>E. coli</i>	25
7. <i>Salmonella</i>	26
7.1 Características generales.....	26
7.2 Sobrevivencia.....	27
7.3 Factores de crecimiento.....	27
7.4 Patogenicidad.....	28
7.5 Salmonelosis.....	29
III. OBJETIVOS.....	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1 Material de laboratorio.....	33
4.2 Medios de cultivo.....	33
4.3 Reactivos.....	34
4.4 Equipos.....	34
4.5 Métodos.....	35
4.5.1 Frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y <i>Salmonella</i>	35

4.5.2 Recolección de la muestra.....	35
4.5.3 Análisis microbiológicos.....	36
4.5.4 Preparación de la muestra.....	36
4.5.5 Recuento de microorganismos coliformes.....	36
4.5.6 Recuento de coliformes fecales y <i>E. coli</i>	39
4.5.7 Coliformes fecales.....	39
4.5.8 <i>E. coli</i>	39
4.5.9 Determinación de <i>Salmonella</i>	42
4.6 Comportamiento de cepas patógenas de <i>E. coli</i>	44
4.6.1 Material biológico.....	44
4.6.2 Cepas.....	44
4.6.3 Preparación del inóculo.....	44
4.6.4 Obtención del germinado.....	44
4.6.5 Inoculación de los patógenos.....	45
4.6.6 Contaminación de la semilla.....	45
4.6.7 Contaminación al brotar el tallo.....	46
4.6.8 Comportamiento de 3 cepas patógenas de <i>E. coli</i> , durante la germinación de la semilla de soya a partir de semilla contaminada.....	46
4.6.9 Comportamiento de 3 cepas patógenas de <i>E. coli</i> , durante la germinación de la semilla de soya a partir germinado contaminado después de las primeras 24 h de germinación.....	47
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	48
5.1 Frecuencia de microorganismos en germinado de soya.....	48
5.2 Comportamiento de cepas patógenas de <i>E. coli</i> en germinado de soya.....	53
5.3 Comportamiento de cepas patógenas de <i>E. coli</i> en germinado contaminado desde la semilla.....	54
5.4 Comportamiento de cepas patógenas de <i>E. coli</i> en germinado de soya contaminado después de las primeras 24 horas de germinación.....	57
VI. CONCLUSIONES.....	64
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	65
VIII. ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia y tipo de microorganismos patógenos aislados de verduras.	4
Tabla 2. Brotes de enfermedad por consumo de frutas y verduras	5
Tabla 3. Brotes y casos de enfermedades debidas al consumo de frutas y verduras en Estados Unidos de 1988 a 1997.	6
Tabla 4. Brotes y enfermedades por consumo de frutas y verduras en Estados Unidos de 1983 a 1997.	7
Tabla 5. Fuentes de contaminación y prácticas de manejo de frutas y verduras que propician su contaminación.	10
Tabla 6. Valores mínimos, medianas, máximos y frecuencia de microorganismos en germinado de soya.	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Preparación de la muestra	36
Figura 2. Recuento de organismos coniformes	37
Figura 3. Cuantificación de coliformes fecales	39
Figura 4. Cuantificación de <i>E. coli</i> .	40
Figura 5. Determinación de <i>Salmonella</i>	42

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comportamiento de 3 cepas patógenas de <i>E. coli</i> en semilla de soya	54
Gráfica 2. Comportamiento de 3 cepas patógenas de <i>E. coli</i> en semilla germinada	57

I.-INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son una causa importante de morbilidad en todos los países, incluidos los desarrollados como los Estados Unidos. Los alimentos que históricamente se encuentran mayormente involucrados en brotes de ETAs son los de origen animal (cárnicos o lácteos). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las verduras también participan como vehículos de microorganismos patógenos (Doyle y Cliver., 1990).

Dentro de las verduras involucradas en brotes se encuentran los germinados (Ponka y col., 1995). En los últimos años se ha incrementado la demanda de germinados de semillas en muchas partes del mundo, incluyendo México (Lorenz., 1980). Los germinados presentan una composición nutricional rica en carbohidratos, proteínas, lípidos, algunos aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales (Fordman y col., 1995).

Por lo general, para su consumo los germinados tienen una preparación mínima y sin tratamiento antimicrobiano previo; ello conlleva a generar alimentos de riesgo para el consumidor (Khurdiya.,1995).

El riesgo de contaminación por microorganismos patógenos en germinados no se limita únicamente a su presencia en el alimento, sino que está además en función de la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y proliferar en la tierra y sobre las verduras (Fernández., 2000).

Cualquier factor que prolongue la sobrevivencia o incremente los niveles del patógeno en el germinado, aumenta el riesgo para el consumidor. Factores como la humedad, la temperatura, tipo de suelo, flora competitiva, pH, penetración de la luz

solar y aire en el suelo, tienen influencia en el comportamiento microbiano (Fernández., 2000).

Por lo tanto, es de gran importancia tener conocimiento del comportamiento de los microorganismos patógenos en los germinados ya que ello contribuye a un mejor control de las enfermedades que provocan.

En nuestro país tres grupos patógenos de *E. coli* son endémicos: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enteroinvasiva (Fernández., 2000). Además se sabe que *Salmonella* es endémica en México. Estos patógenos se aíslan con frecuencia de la materia fecal de personas con cuadros diarreicos. Es posible que alimentos como los germinados estén jugando un papel importante en la transmisión de microorganismos patógenos como *E. coli* y de *Salmonella* entre la población. No obstante, la información sobre la frecuencia y comportamiento de grupos patógenos de *E. coli* y *Salmonella* en germinados que se consumen y comercializan en nuestro país es prácticamente nula. Es necesario generar tal información para contribuir a la elaboración de medidas más objetivas que permitan una mejor prevención y control de las enfermedades causadas por estos patógenos. El objetivo de éste trabajo consistió en determinar la frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella* en germinado de soya comercial, así como el comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* y *Salmonella* en germinado de soya obtenido en el laboratorio.

II.- ANTECEDENTES

2.1 Las verduras como vehículos de microorganismos patógenos

2.2 Riesgo asociado al consumo de verduras

Debido a que los patógenos bacterianos forman parte del medio ambiente, pueden contaminar las frutas y verduras si éstas se han manipulado inadecuadamente.

Diversos microorganismos patógenos se han aislado de una gran variedad de frutas y verduras (**Tabla 1**). Es común observar un incremento en el número de ETAs durante el verano. El hecho se asocia con un marcado incremento en el consumo de verduras y frutas frescas en las poblaciones durante esta época del año, aunque otros factores también pueden participar, como el incremento de la temperatura lo cual favorece el desarrollo microbiano. Los brotes de enfermedad asociados al consumo de verduras seguramente no es excepcional ya que persisten inadecuadas prácticas higiénicas durante su cultivo, riego, cosecha, transporte, comercialización y preparación (**Tabla 2**). Diferentes autores señalan que la baja frecuencia de reportes de brotes por verduras en nuestro país, muy probablemente sea debido a la deficiencia en su detección y no a la ausencia real de incidentes (Fernández., 2000).

2.3 Factores que contribuyen a la producción de brotes de ETAs por verduras.

Las enfermedades por consumo de alimentos se producen generalmente por la conjugación de dos factores: la contaminación de los alimentos con agentes patógenos, seguida de un abuso al incrementar o disminuir la temperatura de conservación (Yildiz., 1994). En los Estados Unidos de Norte América (EUA), la conjugación de estos factores son las principales causas que desencadenan brotes (Jong y Andersson., 1995). En los EUA en 10 años se han registrado gran número de brotes asociados al consumo de verduras (Tabla 3).

Tabla 1. Prevalencia y tipo de microorganismos patógenos aislados de verduras

Alimento	País	Patógeno	Prevalencia	Referencia
Alfalfa	Estados Unidos	<i>Aeromonas</i>	NR	Callister y Agger, 1989
Brócoli	Canadá	<i>L.monocytogenes</i>	13.3%	Odumero y col., 1997
Calabaza	Canadá	<i>L. monocytogenes</i>	2.2%	Schlech y col., 1983
	España	<i>Salmonella</i>	17.1%	García-Villanova y col., 1987
Champiñones	Estados Unidos	<i>C. jejuni</i>	1.5%	Doyle y Schoeni, 1986
Cilantro	México	<i>E. coli</i> O157:H7	19.5%	Zepeda-López y col., 1995
Coliflor	España	<i>Salmonella</i>	4.5%	García-Villanova y col., 1987
<u>Germinado de soya</u>	Estados Unidos	<i>B. cereus</i>	NR	Portnoy y col., 1976
Jitomates	Pakistán	<i>L. monocytogenes</i>	13.3%	Vahidy, 1992
Lechuga	Italia	<i>Salmonella</i>	68.0%	Ercolani, 1976
	Canadá	<i>Capylobacter</i>	3.1%	Park y Sanders, 1992
Papas	Estados Unidos	<i>L. monocytogenes</i>	27.1%	Heisick y col., 1989
Rábano	Estados Unidos	<i>L. monocytogenes</i>	36.8%	Heisick y col., 1989
Rábano	Líbano	<i>Staphylococcus</i>	6.3%	Beuchat, 1996
Zanahorias	Líbano	<i>Staphylococcus</i>	14.0%	Beuchat, 1996

Fuente: modificado de Bryan., 1977

Tabla 2. Brotes de enfermedad por consumo de frutas y verduras

Enfermedad	Fuente de contaminación	Alimento
Tifoidea	Abono de lodos activados	Apio
Tifoidea	Riego con aguas negras	Verduras
Tifoidea	Riego con aguas negras	Manzanas
Tifoidea	Heces humanas como abono	Verduras
Shigelosis	Riego con efluente primario	Col
Shigelosis	Portador humano	Lechuga
Salmonelosis	Riego con aguas negras	Verduras
Salmonelosis	Portador humano	Sandía
Salmonelosis	Tierra de cultivo	Melón
Cólera	Riego con aguas negras	Verduras
Hepatitis viral	Contaminación tanque séptico	Verduras
Gastroenteritis por <i>E. coli</i> O157:H7	No reportada	Germinado de alfalfa
Amibiasis	Riego con aguas negras	Verduras
Ascariasis	Uso de estiércol como abono	Verduras

Fuente: modificado de Bryan., 1977.

Tabla 3. Brotes y casos de enfermedades debidas al consumo de frutas y verduras en Estados Unidos de 1988 a 1997.

Período	Brotes	Casos
1988-92	64	1,448
1993-97	66	12,357

Fuente: (CDC., 1996 y CDC., 2000)

En los EUA estos dos factores son los principales desencadenantes de brotes (Tabla4) (CDC., 2000). Los dos factores solos o en combinación han provocado el 65% de brotes en los establecimientos donde fueron servidos, el 31% en los propios hogares y en el 4% de alimentos industrializados (CDC., 1996).

2.4 Incidencia de bacterias patógenas en verduras.

Las verduras crudas se han identificado como vehículo de microorganismos patógenos que pueden afectar la salud humana (Lund., 1992). La contaminación ocurre por lo general en el campo, principalmente por el riego de los cultivos con aguas negras o por el empleo de estiércol de animales de sangre caliente para fertilizar la tierra de cultivo (Bryan., 1977). La contaminación con bacterias patógenas e indicadores de contaminación fecal de verduras cultivadas e irrigadas con aguas negras o residuales, y la fertilización por estiércol, ha sido demostrada por numerosos autores (Lund., 1992). Sin embargo, se ha demostrado que la contaminación de algunos vegetales con *E. coli* se reduce mediante la irrigación de los cultivos con agua tratada con luz ultravioleta (Robinson y Adams., 1978).

Tabla 4. Brotes de enfermedades por consumo de frutas y verduras en Estados Unidos de 1983 a 1997.

Año	Brotes	% del total de todos los alimentos
1983	13	5.5
1984	8	3.4
1985	18	8.1
1986	16	7.9
1987	4	2.6
1988	14	3.1
1989	21	4.2
1990	15	2.8
1991	12	2.3
1992	2	0.5
1993	12	2.5
1994	17	2.6
1995	9	1.4
1996	13	2.7
1997	15	3.0

Fuente: CDC, 1996; CDC, 2000

La deficiente condición de higiene entre los trabajadores durante el cultivo, cosecha, transporte o almacenamiento, puede propiciar también la contaminación de las verduras con enterobacterias (Geldreich y Bordner., 1971). Sin embargo, el riesgo de enfermedad por consumo de verduras contaminadas en el campo va a estar en función de la capacidad de los microorganismos patógenos para sobrevivir bajo las condiciones de cultivo (Carlin y Nguyen., 1994).

Es evidente que una disminución muy importante de contaminación de las verduras con microorganismos patógenos, se lograría evitando la irrigación de los cultivos con aguas residuales y/o la fertilización con estiércol. En muchos países principalmente los industrializados, no se recurre a la irrigación de los cultivos con aguas residuales sin tratar o el empleo de estiércol como fertilizante. En nuestro país por el contrario, todavía es frecuente el empleo de prácticas inadecuadas de cultivo (Fernández., 1997a).

Las verduras juegan un papel muy importante en la transmisión de varios patógenos, por ejemplo, en España la incidencia de *Salmonella* en verduras recolectadas en el campo y diferentes expendios fue del 7.5% (Gilliland y Speck., 1972). Para el caso de México, se tienen reportes de la presencia de *Vibrio cholerae* en diferentes verduras que se expenden en mercados públicos de las ciudades de (México D.F Vázquez y col., 1996 y en Guadalajara Torres y col., 1996).

2.5 Desarrollo y sobrevivencia de bacterias patógenas en verduras.

Es evidente que la presencia de bacterias patógenas en un alimento constituye un riesgo al consumidor. Sin embargo, los niveles del riesgo están en función de la capacidad del microorganismo para desarrollarse y sobrevivir en el alimento. La sobrevivencia de las bacterias patógenas en el campo va a depender de una serie de

factores como el tipo de suelo, flora competitiva, pH y penetración de la luz solar (Fernández., 2000). La cáscara o epidermis de las verduras es una barrera importante para prevenir la penetración de los contaminantes por lo que se han encontrado diversas especies de enterobacterias en la superficie de diferentes vegetales (Mounthey y Wilbour., 1971)

Los procedimientos mecánicos de picado y rebanado de verduras exponen las estructuras internas a la contaminación microbiana y provocan la liberación de nutrientes; se sabe que la actividad microbiana es más alta en verduras cortadas que en las íntegras (Brackett y col., 1997).

En el caso de las bacterias patógenas, existen reportes donde se señalan que tanto las verduras sin procesar como las mínimamente procesadas, sostienen bien el desarrollo microbiano. Se ha observado por ejemplo que *Shigella sonnei* se multiplica rápidamente en lechugas y col rebanadas y almacenadas a 22°C/24h (Davis y col., 1988). Por otro lado, *L. monocytogenes* incrementa su número en lechuga, aproximadamente 1 log dentro de las primeras 8h de almacenamiento a 25° C (Beuchat y Brackett., 1990).

2.6 Fuentes de contaminación de verduras.

Debido a su naturaleza las verduras son susceptibles de contaminarse con bacterias, virus, hongos, levaduras o parásitos. Existen diferentes fuentes de contaminación de las verduras (Tabla 5). Dicha contaminación depende de la cercanía de las verduras con la tierra cuando se desarrollan, las condiciones de humedad y viento, la estación del año, la proximidad de animales y el tipo de agua usada en la irrigación. La lluvia afecta la carga microbiana disminuyendo al inicio su número por arrastre mecánico, pero contribuye a su incremento por la formación de aerosoles de tierra, salpicaduras o por propiciar algún

grado de actividad microbiana al elevar la humedad relativa (Webb y Mundt., 1978).

Entre los animales como fuente de contaminación de las verduras se incluyen los domésticos, los de crianza, los silvestres y los insectos.

Tabla 5. Fuentes de contaminación y prácticas de manejo de frutas y verduras que propician su contaminación

Fuentes

1. Uso para riego de agua contaminada con desechos humanos y animales
2. Trabajadores portadores
3. Equipo y recipientes mal saneados
4. Uso de fertilizantes
5. Fauna nociva y animales domésticos
6. Uso de agua contaminada para su lavado
7. Equipo y material usado en la cosecha
8. Contaminaciones cruzadas

Fernández, 2000

3. Germinados

3.1 Germinados de semillas

El germinado es cualquier semilla cuyo metabolismo es activado al ponerse en contacto con el calor, el agua y el aire y son alimentos esenciales para la salud del hombre gracias a la vitalidad que proporcionan y su riqueza en vitaminas, minerales, oligoelementos y enzimas. Los germinados se pueden preparar a partir de diferentes semillas como trigo, soya, fríjol, lenteja, cebada, mostaza, alfalfa, entre otras. No obstante, los de soya y alfalfa son los de mayor consumo a nivel mundial. La

germinación de la semilla es relativamente fácil de obtener y se puede efectuar en ausencia de luz. En diferentes sitios, con frecuencia la producción de germinado se realiza en el hogar sin técnicas ni aparatos sofisticados, únicamente empleando algunos utensilios de cocina. Sin embargo, para su producción a nivel industrial, existen normas y técnicas en lo referente a disposición de espacio, instalaciones, higiene, producción, transporte y venta (Whyte., 1973 y Lorenz., 1980). En nuestro país en general no se cuenta con este tipo de normas y la mayoría de las veces, se producen en sitios e instalaciones inadecuadas y con pobre higiene. Existen diferentes métodos de germinación de las semillas (Lorenz., 1980); de manera general, como primera etapa las semillas son hidratadas hasta aumentar aproximadamente 4 veces su tamaño o hasta que el agua las satura. El tiempo de saturación varía dependiendo del tipo y tamaño de la semilla. Una vez hidratada, el exceso de agua es drenado y las semillas son colocadas en una capa uniforme dentro de contenedores en donde germinan a temperaturas entre 22 y 33°C con irrigación periódica. Los germinados alcanzan un tamaño comercial entre los 4 a 10 días desde el comienzo del proceso. El tiempo va a depender del tipo de semilla y del proceso de germinación empleado (Lorenz., 1980).

En diferentes países una vez que los germinados han alcanzado el tamaño deseado, por lo general se colocan en pequeñas charolas de polietileno y son cubiertos con una película de plástico. De esta forma son mantenidos en refrigeración. En algunos casos además son empacados bajo atmósferas modificadas. En México por el contrario es frecuente observar en mercados públicos y supermercados los germinados expuestos al público sin ninguna protección y en muchas ocasiones fuera de refrigeración. Algunos autores señalan que estas prácticas favorecen la contaminación de los germinados con microorganismos patógenos y favorecen su actividad (Mounthey y Wilbour., 1971).

Los germinados con frecuencia son consumidos crudos y sin un tratamiento antimicrobiano efectivo previo, ésta práctica conlleva el riesgo de ingerir microorganismos patógenos activos que pueden afectar la salud del consumidor.

3.2 Soya

La soya es una leguminosa anual que está presente en la cadena alimenticia desde hace más de 5,000 años. Por muchos años, ha sido un producto básico de la dieta asiática. En 1800 se introdujo la soya en los Estados Unidos. En la actualidad, este producto ha sido modernizado tecnológicamente de diversas formas para atraer a los consumidores interesados en la salud. Su riqueza nutricional se basa en dos elementos: su riqueza natural y los productos obtenidos por la acción de microorganismos y de sus enzimas. Representa una fuente de proteínas que sustituye a la carne de forma eficaz en el plano nutritivo y económico. Se considera como una fuente alimenticia exenta de grasas animales saturadas, responsables en gran parte de los problemas cardiovasculares como aterosclerosis, infarto e anticáncer (Wei., 1995).

3.3 Composición del grano

Los granos de soya están compuestos por un 30 por ciento de hidratos de carbono (de los cuales un 15% es fibra), 18 por ciento de aceite (85% no saturado), 14 por ciento de humedad y 38 por ciento de proteína (Información Básica de la Soya., 2003).

Es la única legumbre que contiene los nueve aminoácidos esenciales en la proporción correcta para la salud humana. Por lo tanto, la proteína de soya está calificada como una proteína de alta calidad. Además es una buena fuente de fósforo, potasio, vitaminas del Grupo B , zinc, hierro y la vitamina E (Propiedades de la soya., 2003).

4. Microbiología de germinados.

4.1. Microorganismos patógenos en germinados de semillas.

Los germinados son muy susceptibles a la contaminación microbiana que puede llegar por diferentes mecanismos y en distinta etapas desde su producción hasta su consumo. Las semillas tienen una flora microbiana variable (Patterson y Woodburn., 1980) que va a depender en parte del tipo de semilla, del manejo y tratamientos a los que se han sometido. Su contaminación con bacterias patógenas puede suscitarse desde el campo directamente en la semilla. La contaminación puede ocurrir por el uso de agua contaminada con microorganismos patógenos para irrigar la plántula. Durante la cosecha, transporte, comercialización del alimento y manipulación del hombre, ya que éste tiene un mayor contacto con el alimento sin dejar a un lado utensilios, equipo o superficies. Cabe destacar que la contaminación cruzada es la causa más común de contaminación en alimentos. La presencia de microorganismos patógenos en germinados ha sido causa de brotes de ETAs. En Tailandia por ejemplo se han aislado diferentes serotipos de *Salmonella* (Lexington, Orion, Senftenberg, Tennessee, Poona y Weltevreden) a partir de germinado de soya con una frecuencia del género de 8.7% *S. Bovismorbificans* y *S. Javiana* se han aislado de germinado de alfalfa cultivado en Finlandia (Jong y Andersson.,1995), *Klebsiella pneumoniae* de germinado de alfalfa y soya (Park y Sanders., 1990), *Bacillus cereus* (Harmon y col., 1987), *L. monocytogenes* (Gohil y col., 1995) y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo con una frecuencia del 24% en germinado de alfalfa (Sepúlveda y col., 1993). En México *Salmonella* sp se ha aislado a partir de germinado de alfalfa con una frecuencia de 3 % (Castro-Rosas y Escartin., 1999).

Por otro lado, en Canadá se han aislado coliformes fecales de germinado de alfalfa con límites de 7.3×10^2 a 1.1×10^3 ufc/g, y organismos coliformes en un intervalo de $3 \times$

10^3 a 4×10^6 (Prokopowich y Blank., 1991). En Alemania, Geisges y col. (1990) señalan que el consumo de ensaladas y germinados de semillas crudos constituyen un riesgo elevado a la salud, luego de una evaluación microbiológica de este tipo de alimentos. Niveles elevados de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y organismos coliformes (OC) en germinado tanto de alfalfa como de soya proviene de investigaciones efectuadas en países desarrollados donde se tiene un control sanitario estricto en lo referente a la producción y comercialización de los germinados. Es de esperar entonces que en nuestro país dadas las prácticas de producción y comercialización inadecuadas, la incidencia de bacterias patógenas en estos productos sea mayor, y en consecuencia los germinados estén participando con mayor frecuencia en brotes o casos de enfermedades. Luego de una evaluación exhaustiva sobre germinados de alfalfa que incluían la evaluación de la higiene de germinados de alfalfa comercial, comportamiento de microorganismos patógenos en el germinado y eficiencia de tratamiento de desinfección (Castro-Rosas., 1999 y Escartín., 2000), concluyen que los germinados de alfalfa crudos son de riesgo elevado para la población.

4.2 Desarrollo de bacterias patógenas en germinados.

Aunque la simple presencia de un microorganismo patógeno en el alimento es suficiente para alertarse y tomar acciones para evitar la presentación de un brote, cualquier incremento de los niveles del patógeno en el alimento, incrementa el riesgo de adquirir una enfermedad. Esto es, para que un microorganismo patógeno desencadene un cuadro clínico en el huésped, entre otras cosas, debe de ingresar en él en una concentración suficiente, conocida como dosis mínima infectante. Concentraciones del patógeno inferiores a la mínima, disminuyen la probabilidad de adquirir una enfermedad por el consumo del alimento. Por lo contrario, niveles muy por arriba de la mínima infectante o muy cercano a esta dosis aumenta la probabilidad de contraer alguna

enfermedad. En consecuencia, el riesgo de un alimento dependerá de la concentración del patógeno presente en éste. El destino de los microorganismos en los alimentos depende de una diversidad de factores tales como el pH, flora asociada, potencial óxido reducción, sustancias antimicrobianas, etc. Se debe entender que en condiciones naturales o normales los niveles de estos factores no son estáticos y varían conforme transcurre el tiempo. En consecuencia los microorganismos para multiplicarse tienen que adaptarse a las condiciones fluctuantes; incluso el microorganismo puede morir al ingresar al alimento; por ejemplo los niveles de la flora nativa son elevados, por la presencia de antimicrobianos naturales o por el procesamiento de los alimentos (Mickelson y Filippim., 1960). Por el contrario, ante bajas concentraciones de la flora nativa (como las que están en la semilla o en las primeras horas de germinación) la oportunidad de los patógenos para desarrollar es mayor. Si aunado a esto se tienen una temperatura y humedad favorables (como las de germinación y durante el crecimiento del germinado), se crean las condiciones adecuadas para la actividad microbiana. Por tanto es factible pensar que en las primeras horas o días de germinación y crecimiento de la plántula, se va a presentar la mayor actividad microbiana, tanto de la flora nativa de la semilla como de los microorganismos patógenos. Se ha encontrado que los germinados son un sustrato que soporta bien el desarrollo de bacterias patógenas. *S. Stanley* y *S. Enteritidis*, por ejemplo, se multiplican activamente en germinado de alfalfa durante las primeras horas de desarrollo de la plántula (Andrew y col., 1982). Un comportamiento semejante se ha observado con *S. typhi* (Castro-Rosas y Escartín., 2000). *Bacillus cereus* también incrementa su número en aproximadamente 4 log en las primeras horas de germinación (Harmon y col., 1987) al igual que *K. pneumoniae* (Park y Sanders., 1990). Por el contrario Carlin y Peck (1996), encontraron que *C. botulinum* (tipo B, E y F) no se multiplican en germinado de soya. Aytac y Gorris., (1994),

observaron nulo desarrollo de *A. hydrophila* y *L. monocytogenes* en germinado de alfalfa contaminado cuando tenía ya un tamaño comercial (7 a 12 cm) y empacado con atmósferas modificadas y mantenido en refrigeración durante 7 días, presentándose una ligera disminución en los niveles de ambos patógenos, y que fue mayor para *L.monocytogenes*. Geisges y col. (1990), reportaron también nulo crecimiento de *L.monocytogenes* durante el almacenamiento de germinado de soya a 4 y 22°C. Es importante destacar que los estudios donde se reporta multiplicación de los patógenos en el germinado, la semilla destinada a la obtención del germinado fue la que se contaminó con los patógenos. Por lo tanto, en el estudio anterior el germinado se contaminó cuando tenía un tamaño comercial; es probable que si el germinado se contaminara con *L.monocytogenes* o *C.botulinum* desde la semilla, los patógenos sean capaces de multiplicarse e incrementar su número al igual que *Salmonella* o *B. cereus*. La hipótesis anterior es un tanto reforzada por las investigaciones de Geisges y col., (1990), quienes reportan nulo desarrollo de *S. Enteritidis* durante el almacenamiento de germinado de soya, no así durante la germinación de la semilla, en donde el microorganismo se multiplica activamente. También Castro-Rosas y Escartín., (2000) observaron que *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* y *E. coli* O157:H7 se multiplican activamente en las primeras horas de germinación de la semilla y no después de que el germinado presenta ya 24 h de crecimiento.

4.3 Algunos brotes por germinado de semillas.

Los germinados se han visto involucrados en brotes de gastroenteritis por diferentes microorganismos tales como *Salmonella* (Andersson y col., 1995), *Bacillus cereus* (Portnoy y col., 1976) y *E. coli* O157 H:7 (MMWR., 1997) en países como los E.U.A, Inglaterra, Suiza y Finlandia, dicha importancia radica en que los germinados son reconocidos como vehículos potenciales de microorganismos patógenos al humano.,

por ejemplo, *V. cholerae* se multiplica muy activamente en germinado de alfalfa (Castro Rosas y Escartín, 2000), al igual que en EUA y Finlandia grupos de población se enfermaron después de consumir germinado de alfalfa (Mahon y col., 1997).

5. Microorganismos de interés sanitario

5.1 Organismos coliformes y características generales

Los microorganismos de interés sanitario de mayor tradición en la microbiología, su presencia se asocia con la contaminación fecal en el agua. Los coliformes son los indicadores más utilizados para el análisis y medición de la contaminación fecal y calidad sanitaria de aguas y alimentos, así como para indicar la presencia en estos ambientes de microorganismos patógenos (Fernández., 2000).

Los organismos coliformes se definen como bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 h de incubación a 35°C, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (Jay., 2000).

La presencia de coliformes en muchos alimentos, se debe principalmente a que han tenido contacto con materiales sucios. Dentro del concepto general de coliformes se distinguen dos grupos: coliformes totales y fecales. Los coliformes totales se caracterizan por su distribución amplia en la naturaleza y por su capacidad de multiplicarse en ambientes oligotróficos como por ejemplo en aguas naturales (Noguera., 2005).

Los coliformes fecales, por otro lado, son aquellos que poseen la capacidad de fermentar la lactosa, con producción de ácido y gas a 44.5°C, siendo en su mayoría propios de las heces de animales de sangre caliente (Jay., 2000 y Back., 2003).

Por lo general, la presencia tanto de coliformes totales como los fecales en los alimentos se relacionan con falta de higiene durante su elaboración. Su aplicación como

indicadores de contaminación fecal o de la posible presencia de enteropatógenos es limitada; los coliformes fecales únicamente tienen relación con contaminación fecal directa y la posible presencia de enteropatógenos en aguas no turbias, los fecales por otro lado, sólo tiene este tipo de relación con bivalvos (animales acuáticos de dos valvas, por ejemplo ostiones) algunas verduras crudas y aguas no turbias (Fernández., 2000).

5.2 *Escherichia coli*

Es la típica bacteria de hábitat intestinal en el hombre y animales de sangre caliente; taxonómicamente bien definida. Pertenece al grupo de coliformes fecales (CF) los cuales tienen la capacidad de fermentar la lactosa con producción de gas a temperatura de 44 a 45°C de 24 a 48 h (Jay., 2000 y Rojas., 2006).

E. coli es el marcador sanitario ideal en el análisis microbiológico de los alimentos crudos o que no se han sometidos ningún tratamiento para asegurar su inocuidad. Así, por ejemplo, si este microorganismo se encuentra en alimentos tales como verduras, hortalizas, moluscos, etc; puede inferirse que ha tenido lugar una contaminación de origen fecal y que, por lo tanto, es posible el ingreso a estos alimentos de microorganismos patógenos de procedencia entérica.

5.3 Características generales

E. coli es representante de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo corto Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo, catalasa-positivo, oxidasa-negativo, no espuralado, reductor de nitritos. La mayoría de las cepas fermenta la lactosa con producción de ácido y gas, no obstante, algunas cepas fermentan lentamente éste azúcar y algunas cepas son lactosa negativas.

Típicamente, la especie es rojo de metilo positiva y Voges - Proskauer negativa y no crece en el medio citrato de Simmons, produciendo indol la mayoría de las cepas.

Dichas cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente unas de otras con base en los antígenos somáticos (O), flagelares (H), y capsulares (K) (Fernández., 2000).

E. coli es una bacteria no termodúrica, susceptible a la congelación y descongelación, desecación y acidez excesiva. En bebidas gaseosas embotelladas, la letalidad observada de *E. coli* a pH 2 es de unas cuantas veces mayor que a pH 3; 250 veces mayor que a pH 4 y 900 veces que a pH 4.5, independientemente de la concentración de sacarosa presente. *E. coli* posee capacidad para sobrevivir en el medio ambiente, a agentes químicos y factores que favorecen o impiden su desarrollo muy semejante al que exhiben los enteropatógenos (FDA., 1998).

Cuando se usan métodos de cultivo aeróbicos a partir de las heces, esta bacteria es la especie que desarrolla predominantemente (FDA., 1998). En materia fecal alcanza cifras de 10^6 a 10^9 ufc/g. *E. coli* tiene una temperatura de crecimiento entre 10 y 45°C, óptima de (30-37°C). Algunos autores (Noguera., 2005) ubican a *E. coli* entre los mesófilos, mientras que para otros (Beuchat., 1998) dada su capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración, debe ubicarse entre los psicrótrofos, aunque no reúne los requisitos de temperatura óptima y máxima para su agrupación como psicrótrofo. Poseen un tiempo de generación que oscila entre 15 y 20 min. En condiciones óptimas, en 10 h una única célula podría producir más de un millón de células (Frazier y Westhoff., 1991).

La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, sin embargo, algunas causan infecciones en el hombre que pueden localizarse en el tracto intestinal o fuera de él ya sea en vías urinarias, sangre, peritoneo o heridas diversas. La mayoría de las veces las cepas patógenas ingresan al individuo a través de los alimentos (Fernández., 2000).

6. *E. coli* patógena

Las primeras investigaciones sobre *E. coli* patógena se centraron en las cepas que causan diarrea en los niños. Para diferenciar una cepa de *E. coli* patógena de una no patógena es la limitada capacidad de la primera para fermentar la lactosa con un tiempo de más de 48 h, y para algunos grupos negativa a 44.5°C. La situación es similar con la producción de indol ya que la *E. coli* no patógena es positiva (99%), y en la patógena la cifra es variable pero visiblemente menor (Fernández., 2000). Actualmente se reconocen 6 tipos de *E. coli* patógenas (enteropatógena, enteroinvasiva, enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroadherente, enteroagregativa) que dan lugar a diversos padecimientos (Fernández, 2000).

6.1 *E. coli* enteropatógena (ECEP)

ECEP fue el primer grupo identificado por el año 1940. El hombre es un reservorio importante del grupo. Su patogenicidad se observa en recién nacidos, especialmente como enfermedades intrahospitalarias. También ocurre en niños mayores. El término diarrea de verano fue popular en un inicio. Aunque en los adultos se aíslan diversos serovares reconocidos como patógenos, en ellos no es común observar casos clínicos. La explicación más aceptada es el desarrollo de la inmunidad que resulta de un reiterado contacto con el microorganismo (Fernández., 2000). No obstante, las personas sensibles inmunológicamente (personas de la tercera edad, mujeres embarazadas, con padecimientos crónicos degenerativos como la diabetes, entre otros), son susceptibles a enfermarse por este patógeno. Se conocen sin embargo, algunos brotes en adultos de países en desarrollo, por consumo de agua (Doyle y Padhye., 1989). La transmisión ocurre a través de alimentos contaminados o directamente siguen la ruta ano-mano-boca. La enfermedad en los niños se caracteriza por diarrea acuosa, en ocasiones vómito y fiebre baja. En los menores de 6 meses la condición puede prolongarse por más de 14

días y terminar letalmente. Los serovares más comunes incluidos entre estas cepas patógenas son O55, O86, O11, O119, O125, O126, O127, O128ab y O142 (Benenson., 1990).

La ECEP causa una lesión característica en el intestino que en algunos aspectos es similar a las lesiones que produce *E. coli* O157:H7, pero puede ser diferenciada de las producidas por los demás tipos de *E. coli*. La lesión implica la destrucción de las micro vellosidades sin que exista otro indicio de invasión de los tejidos. Las pruebas sobre el potencial patógeno de ECEP provienen de estudios con voluntarios humanos y animales de laboratorio. Un componente importante es la adhesión a las células de la mucosa intestinal mediada por un plásmido, al que se asocia la producción de una toxina similar a la colérica, e incluso una endotoxina que interfiere con procesos metabólicos de absorción celular (Robins y Browne., 1987). El lavado adecuado de las manos acompañado de desinfección completa es una medida primaria de prevención de las infecciones en el personal que maneja recién nacidos y alimentos. Como medidas de prevención, es importante la protección de las fuentes de agua contra la contaminación por materia fecal directa o descargas de aguas negras, y una adecuada desinfección de agua a base de agentes químicos germicidas como cloro, son algunas medidas mínimas de prevención (Fernández., 2000).

6.2 *E.coli* enteroinvasiva (ECEI)

Este grupo de *E. coli* tiene un parecido estrecho con *Shigella* en cuanto a patología. La ECEI se diferencia de la mayoría de las de *E. coli* debido a que no fermenta la lactosa en absoluto, pueden ser anaerobios y son inmóviles. Atacan de modo específico la mucosa del colon, invadiendo las células epiteliales, multiplicándose y finalmente causando la ulceración del intestino. La capacidad invasora depende de la presencia de un plásmido de gran tamaño que contiene los genes necesarios para la

invasión, que codifica la producción de varios polipéptidos implicados en la capacidad invasora (Hall y Hauser., 1966). Un brote extensivo registrado en EUA, ocurrió en noviembre-diciembre de 1971, estuvo asociado al consumo de quesos Camembert y Brie importados de Francia, se tuvo conocimiento de 277 personas enfermas distribuidas en 8 estados y el Distrito de Colombia; la tasa de ataque fue de 94%. Después de una incubación de 24 h las personas afectadas mostraron vómito (35%), diarrea (90%), fiebre (73%), dolor abdominal (66%), cefalea y en algunos casos sangre en las heces. La fuente de contaminación se debió al agua utilizada en la sanidad de la planta procesadora del queso; ya que provenía de un río y el sistema de filtración funcionaba defectuosamente en esa época (Marier y col., 1973). Otro brote ocurrido en este país se encontró vinculado con platillos de un buffet servido en un barco, específicamente ensalada de papa según se estableció mediante pruebas estadísticas (Doyle y Padhye., 1989).

6.3 *E.coli* enterotoxigénica (ECET)

Las *E. coli* enterotoxigénicas son la causa principal de la diarrea infantil en los países en desarrollo. Las cepas enterotoxigénicas de *E. coli* suelen corresponder a diversos serogrupos de *E. coli*, en especial el O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O139, O148, O159 y O167 (Fernandez., 2000).

La virulencia de las cepas enterotoxigénicas dependen de la formación de toxinas mediadas por plásmidos. Han sido descritos dos tipos principales de toxina, que son fácilmente diferenciables en base a la termoestabilidad, peso molecular y modo de acción; estos dos tipos son la toxina termolábil y la toxina termoestable (Gross y Rowe., 1984). La toxina termolábil está compuesta por cinco subunidades B, cada una de las cuales tiene un peso molecular de aproximadamente 11,500 Da, y de una subunidad A que tiene un peso molecular de aproximadamente 25,000 Da. La

subunidad B se une a un ganglósido en las células epiteliales del intestino, después de lo cual la subunidad A penetra en la célula y estimula la actividad de las adenilciclasas. La consiguiente acumulación de monofosfato de adenosina – 3',5' cíclico origina un aumento de la secreción de las células y una disminución de la absorción de las células del extremo de las vellosidades (Fields y col., 1968). Entre la toxina colérica existe un elevado grado de parentesco biológico e inmunológico (Gross y Rowe., 1984).

La toxina termoestable adopta más de una forma. Los polipéptidos de moléculas pequeña (P.M. 2,000 – 5,000 Da) son diferenciables por su solubilidad en varios disolventes y por su actividad en varias pruebas animales. El cuadro clínico es más grave cuando es producido por la toxina termolábil. Puede haber deshidratación y acidosis grave por la pérdida importante de agua y electrolitos. Es una de las principales causas de deshidratación y malnutrición en países en vías de desarrollo, además de ser una de las causas principales de diarrea del viajero. Al menos una forma termoestable A, parece ser que actúa estimulando la actividad de la guanilatociclasa, aumentando de este modo los niveles del ganglósido cíclico (Fields y col., 1968). En contraposición de la toxina termolábil parece ser que la toxina termoestable actúa principalmente como un antiabsorbente más que de una forma secretora. La toxina termoestable es extraordinariamente termorresistente, siendo estable a 100°C durante 15 min. La dosis infectante calculada, en voluntarios humanos es elevada; de 10^8 a 10^{10} células (DuPont y col., 1971).

Es necesaria entonces una contaminación seguida de multiplicación del microorganismo, lo que implica deficientes condiciones de almacenamiento de los alimentos. No existen muchos reportes al respecto, pero se sabe por ejemplo, que *E. coli* enterotoxigénica incrementa su número de 2 a 3 log ufc/g en las primeras 4 h de fabricación de un queso tipo Colby (Kornacki y Marth., 1982). Seguramente por tal

razón, no se tienen evidencias de enfermedad por transmisión de persona a persona. En EUA no parece ser un patógeno común en los quesos. El análisis de 78 muestras comerciales de 5 variedades con diferentes contenidos de humedad no condujo a una sola célula positiva para cepas enterotoxigénicas (Glatz y Brudving., 1980).

En México se originó un brote causado por *E. coli* debido al desbordamiento del canal de aguas negras en Chalco, el 31 de mayo del 2000. De los pacientes que presentaron diarrea y vómito, se realizó el aislamiento e identificación bioquímica de enterobacterias, de los cuales el 0.45% correspondió a *Salmonella* y 76.6% a *E. coli*: 62.2% a ECET (44.6% con LT, 11.2% con ST, 44.1%), 0.84% a ECEI, 0.84% a ECEP, 0.08% a ECEH. (Cortes y col., 2002). En restaurantes de Guadalajara México en el período de 1992-1997, adquirieron diarrea del viajero 928 personas, de las cuales en 195 fue aislada ECET (Zhi y col., 2000).

6.4 ETAs causadas por *E. coli*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que el 70 % de las muertes de niños menores de 5 años en los países en vías de desarrollo, es originado por 5 enfermedades comunes, prevenibles o de fácil manejo y entre ellas está la diarrea. En Cuba, se ha logrado reducir la mortalidad por diarrea mediante diferentes medidas tales como: uso de las sales de rehidratación oral (SRO), incremento de la lactancia materna, uso racional de antibióticos, capacitación de los recursos humanos y manejo correcto de la diarrea en la atención primaria de salud. Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) en su mayoría son de naturaleza infecciosa, pero de carácter autolimitado. En Cuba como en otras partes del mundo, los virus constituyen la causa más importante de diarrea grave, potencialmente mortal en niños menores de 2 años, no obstante en algunos trabajos publicados predomina la causa bacteriana. En varios estudios publicados se halló que *E. coli* enteropatógena fue la bacteria más aislada en la diarrea

infantil en niños menores de 2 años. Otra enfermedad que es causada por *E. coli* es la enteritis que es un tipo de gastroenteritis bacteriana, cuyos síntomas son el resultado de una invasión de toxinas o bacterias a los intestinos. El período de incubación es de 24 a 72 horas. En los adultos, la infección usualmente no es severa, pero en los niños y bebés, generalmente se requiere hospitalización y en algunos casos es mortal (Fernández., 2000).

La mayoría de los brotes de intoxicación causados por el consumo de alimentos revela que factores como la refrigeración incorrecta de los alimentos, la elaboración inadecuada o el proceso térmico inadecuado así como la contaminación de los alimentos por un manipulador enfermo y el recalentamiento inadecuado de los alimentos cocinados dan la pauta para dichos brotes (Nguyen y Carlin., 1994).

7. Salmonella

7.1 Características generales

Este patógeno es de los más estudiados que se pueden aislar de los alimentos. Esto se debe a la frecuencia con la cual el germen participa en brotes y casos individuales de enfermedades como fiebre entérica y gastroenteritis (Fernández,2000).

Salmonella es un género de la familia *Enterobacteriaceae*. Con una forma de bacilo que se caracteriza por ser una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa y asporógena. Produce ácido sulfúrico y en ocasiones produce gas con la fermentación de la glucosa; suele ser catalasa positiva y oxidasa negativa y reduce nitratos a nitritos (Brenner., 1984).

La mayoría de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentra en el tracto intestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos o como iniciadores. Para la identificación y diferenciación entre otros patógenos de *Salmonella* es necesario recurrir a las pruebas bioquímicas como son: catalasa (positiva) y oxidasa (negativa); la fermentación de glucosa y otros carbohidratos (raramente fermentan la lactosa y la

sacarosa) con la producción usualmente de gas. La reducción de los nitratos a nitritos, la producción de ácido sulfhídrico, la actividad lisindescarboxilasa, la capacidad de crecimiento en agar citrato de Simmons. La prueba de Vogues Proskauer es negativa, la prueba del rojo de metilo positiva, la no producción de Indol y la incapacidad de hidrólisis de la urea (Mejía., 2003).

En cuanto a los vegetales, éstos se pueden contaminar con *Salmonella*, a partir del contacto directo con materia fecal animal o humana. Se le detecta en cereales, frutas y verduras en la precosecha, e incluso en especias y granos de cocoa, en ambos casos, en relación con brotes de salmonelosis (Geldreich y Bordner., 1971).

7.2 Sobrevivencia

La sobrevivencia de *Salmonella* fuera del cuerpo humano y de los animales está afectada por el grado de humedad ambiental, la temperatura, la exposición a agentes germicidas y la composición del material en el que se encuentran. Se ha hecho una recopilación de diferentes autores publicando el tiempo de sobrevivencia de *Salmonella* por ejemplo: 200 días de sobrevivencia en la tierra, 228 días en la ropa, 10 meses en el polvo, 148 días en materia fecal de roedores, 199 días en las cucarachas, más de 9 días en pollo, y mas de 4 años en huevos enteros desecados (Bryan., 1968). En distintos tipos de agua se ha reportado sobrevivencia de esta bacteria como: 87 días en agua de la llave y 115 días en agua de pozo (USDA., 1969 y FDA., 2001).

7.3 Factores de crecimiento

Salmonella es una bacteria que es fácil de cultivar en el laboratorio. Dicha bacteria posee una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 35 y 37°C. Capaz de multiplicarse en un intervalo más amplio de temperatura (6-45°C). *Salmonella* como la mayoría de las bacterias Gram negativas son sensibles al calor de forma que la

pasteurización (72°C, 15 s) asegura su destrucción en la leche. La tasa de desarrollo empieza a declinar notoriamente al disminuir la temperatura por debajo de 20°C y se torna ya muy lenta en refrigeración hasta los 5-6°C, es cuando ya se suspende. Estudios han demostrado que las temperaturas de refrigeración permiten sobrevivencia de este microorganismo y la congelación, aunque provoca un descenso considerable en su número, no produce su total desaparición por lo tanto, no garantiza su destrucción en los alimentos, de hecho han sido detectadas células de esta bacteria en productos que habían estado almacenados en congelación durante años como carne cruda, pescado y huevo líquido (Georgala y Hurst, 1963; Kampelmacher, 1963). Datos publicados reportan que *Salmonella* resiste pH en el intervalo de 3.8 a 9 con un óptimo de 7 (Jay., 2000 y la CDC., 1991) y 3.8 a 9.5 con óptimo de 7.5 según la ICMSF, (1980), aunque existen estudios que revelan su presencia en mayonesas muy ácidas (Chung y Goepfert, 1970; Leyer y Johnson, 1993). La actividad de agua de límite para que se desarrolle esta bacteria es de 0.94 (ICMSF., 1980). *Salmonella* es capaz de sobrevivir durante un año o más en alimentos que tienen una actividad de agua baja (pimienta negra, chocolate o gelatina). *Salmonella* es bastante resistente a los nitritos y puede sobrevivir bastante tiempo en alimentos con alta concentración de sal p.e. salmueras (Foster., 1993).

Este microorganismo no es buen competidor, y es fuertemente inhibido por la microflora láctica; por el contrario se sabe que resiste bien y durante mucho tiempo en los medios exteriores como la tierra, materia fecal, equipos, locales, etc., lo cual ha jugado un papel determinante en la epidemiología de la salmonelosis (Airoldi y Zottola., 1998). Los desinfectantes comunes como fenoles iodados y clorados son eficientes frente a *Salmonella* (Mejía., 2003).

7.4 Patogenicidad

Salmonella invade la luz del intestino delgado, donde se multiplica. Después atraviesa en menor grado el colon, donde se produce una reacción inflamatoria. Los folículos linfáticos pueden aumentar de tamaño y se pueden ulcerar. En ocasiones, *Salmonella* atraviesa las barreras mucosa y linfática, llega a la corriente sanguínea y origina abscesos en varios tejidos. Las cepas invasoras por ejemplo *S. typhi* a través de la mucosa intestinal, pasan al sistema linfático y son englobadas por los fagocitos en cuyo interior se multiplican. Después estas bacterias vuelven a entrar en la corriente sanguínea, causando septicemia (Infante y col., 1981 y Noguera y col., 1992)

Las investigaciones de algunos brotes han sugerido que los alimentos implicados tenían concentraciones altas de *Salmonella* por la forma con que el alimento fue manipulado y almacenado. En algunos casos, sin embargo, especialmente cuando el vehículo ha sido el agua o alimentos grasos, en los alimentos implicados epidemiológicamente se han encontrado pequeñas cantidades de *Salmonella* (D'Aoust., 1975; Hockin y col., 1989)

7.5 Salmonelosis

La salmonelosis humana es una toxiinfección de origen alimentario producida por la ingestión de alimentos donde se han podido multiplicar algunas de las especies de *Salmonella*. La ruta primaria de la infección es la ingestión del microorganismo por un huésped susceptible y en un número suficiente para que se llegue a desarrollar la enfermedad. Se ha demostrado como algunas cepas de *S. typhimurium* son capaces de producir enderotoxinas (Bryan y col., 1979; Kapperud y col., 1990).

Dicha enfermedad puede incidir en cualquier tipo de persona, principalmente en niños recién nacidos o en su defecto menores de 6 años, generalmente y ancianos (Levine y col., 1991). La incidencia de ésta enfermedad aumenta en tiempo caluroso cuando el organismo se deshidrata frecuentemente, la tasa de ataque puede llegar a ser de 100% debido a la ingesta, principalmente de niños, de frutas y aguas frescas, ensaladas etc (Fernández, 2000). Se han reportados algunos brotes de salmonelosis por consumo de germinado de soya afectando a 143 personas en Rusia (O'Mahony., 1990).

III.- OBJETIVO

1.- Objetivo General

Determinar la frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella* y el comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* en germinado de soya.

2.- Objetivos Específicos

1. Determinar la frecuencia de coliformes totales, coliformes fecales y *Salmonella* en germinado de soya.
2. Determinar el comportamiento de tres grupos patógenos *E. coli* en semilla y germen de soya a temperatura ambiente.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material de laboratorio

Bolsas de polietileno, sin marca comercial
 Cajas Petri de plástico
 Charolas de plástico
 Espátula
 Gradillas plásticas y metálicas
 Matraz Erlenmeyer (50-100 y 500-1000 mL).
 Micropipetas (5-100 y 100-1000 µL).
 Pipetas de vidrio (0.1-1mL y 5-10 mL).
 Probetas de vidrio y plástico (100, 500 y 1000 mL).
 Termómetro
 Tubos de vidrio con rosca y tapón
 Recipientes de plástico estériles

4.2. Medios de cultivo

Agar de bilis y rojo violeta (ABRV) Bioxon ®
 Agar eosina azul de metileno (AEMB) BD Bioxon ®
 Agar soya tripticaseína (AST) BD Bioxon ®
 Agar citrato de Simmons (AC) BD Bioxon ®
 Agar triple azúcar y hierro (TSI) BD Bioxon ®
 Agar Cuenta Estándar (ACE) Merk
 Agar *Salmonella Shigella* (ASS) BD Bioxon ®
 Agar sulfito bismuto (ASB) BD Bioxon®
 Agar base sangre (ABS)
 Agua peptonada, 1 % (AP) BD Bioxon®
 Base de caldo tetracionato (BCT) BD Bioxon®

Caldo lactosado (CL) BD Bioxon®
Caldo lactosado verde brillante fluorocult (CLF) BD Bioxon ®
Caldo selenito cistina (CSC) BD Bioxon ®
Caldo Soya Trypticaseína (CST) Merck ® KGaA
Caldo urea (CU) BD Bioxon ®
Peptona de Caseína 0.1 % (DP) BD Bioxon ®

4.3. Reactivos

Antibiótico Rifampicina (Rif) (Biomedical Inc, Ohio, USA)
Hipoclorito de sodio sin marca comercial
Metanol (Sigma Chemical, USA)
Reactivo de Kovacs (RK) Merck ®KgaA
Solución salina isotónica estéril al 0.85% (SSI)
Solución yodo-yoduro Técnica Química, S. A. de C. V.

4.4. Equipos

Auto clave (Yamato Sterilizer SM 200)
Autoclave eléctrica SM 200 Yamato Scientific ®
Baño maría con circulación Riosa (0-120°C)
Balanza analítica PC 2000 Mettler ®
Báscula (Mettler Pc 2000)
Centrífuga (Hérmle Labnet Z 323 K)
Cuenta colonias American Optical Quebec ®
Incubadora bacteriológica Blue M ®
Lámpara de luz UV ENF-240C, Spectroline ®
Refrigerador (Lab-line Environeers Inc.)
Stomacher® 400 Circulator Seward
Vortex-Genie 2 Scientific Industries

4.5 Métodos

4.5.1 Frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y *Salmonella*.

4.5.2 Recolección de la muestra

Se recolectaron 100 muestras de germinado de soya distribuidas en 10 meses. Las muestras de germinados fueron obtenidas de un centro comercial establecido en la ciudad de Pachuca, Hgo. Cada muestra estuvo formada por 100 g de germinado. Las muestras se transportaron bajo condiciones asépticas y de refrigeración tal y como lo establece la legislación sanitaria en México (NOM-109-SSA1-1994). Las muestras se analizaron dentro de las 2 primeras horas después de su recolección. El germinado era comercializado en charolas de plástico y mantenidas a una temperatura de 10°C, aproximadamente cada charola contenía 10 kg de germinado.

Por lo general, a simple vista el germinado de soya presentaba descuido en la higiene durante la comercialización, por ejemplo residuos de tierra, residuos de otros vegetales, agua abundante para mantenerlo fresco, entre otros. Además, en ocasiones el germinado al momento de la compra presentaba una coloración amarillenta y hasta ligeramente café y olor poco atractivo.

Se realizó la cuantificación de coliformes totales y fecales, *E. coli* y la presencia de *Salmonella* de acuerdo a los manuales especializados (FDA., 2001; NOM-112-SSA1-1994; NOM-113-SSA1-1994; NOM-114-SSA1-1994).

4.5.3 Análisis microbiológicos

4.5.4 Preparación de la muestra

Una vez pesada la muestra, el germinado fue colocado en una bolsa de polietileno y se adicionó 200 mL de Caldo lactosado (CL); posteriormente dicha bolsa con la muestra se sometió a un proceso de homogenización empleando un Stomacher a condiciones de 260 rpm. Esta mezcla inicial se consideró como la dilución “0”. En la **(Figura 1)**, se muestra la preparación de la muestra, para iniciar la investigación de los diversos microorganismos indicadores de higiene.

4.5.5 Recuento de microorganismos coliformes

La cuantificación de organismos coliformes se realizó con base en lo descrito por la FDA.,2001 y la NOM-113-SSA1-1994. El análisis se basa en el desarrollo de microorganismos en el medio selectivo agar rojo violeta bilis (**figura 2**). La cuantificación de los OC se realizó mediante la técnica de Vaciado en Placa. A partir del germinado diluido en CL se realizaron 6 diluciones decimales en diluyente de peptona. Para ello 1 mL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} fue colocado en cajas de Petri vacías. Posteriormente se agregó aproximadamente 15 mL agar de bilis y rojo violeta (ABRV) a las cajas de Petri inoculadas. Se homogeneizó y dejó solidificar; finalmente, se adicionó otra capa de 5 mL del mismo medio, se dejó solidificar y se incubaron las cajas a 35°C / 24h. Se contaron las colonias rojas o guindas con o sin precipitación de sales biliares y de un tamaño mayor (en la caja contable) de 0.5 mm. El valor obtenido se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g) (Jay., 2000).

Figura 1. Preparación de la muestra

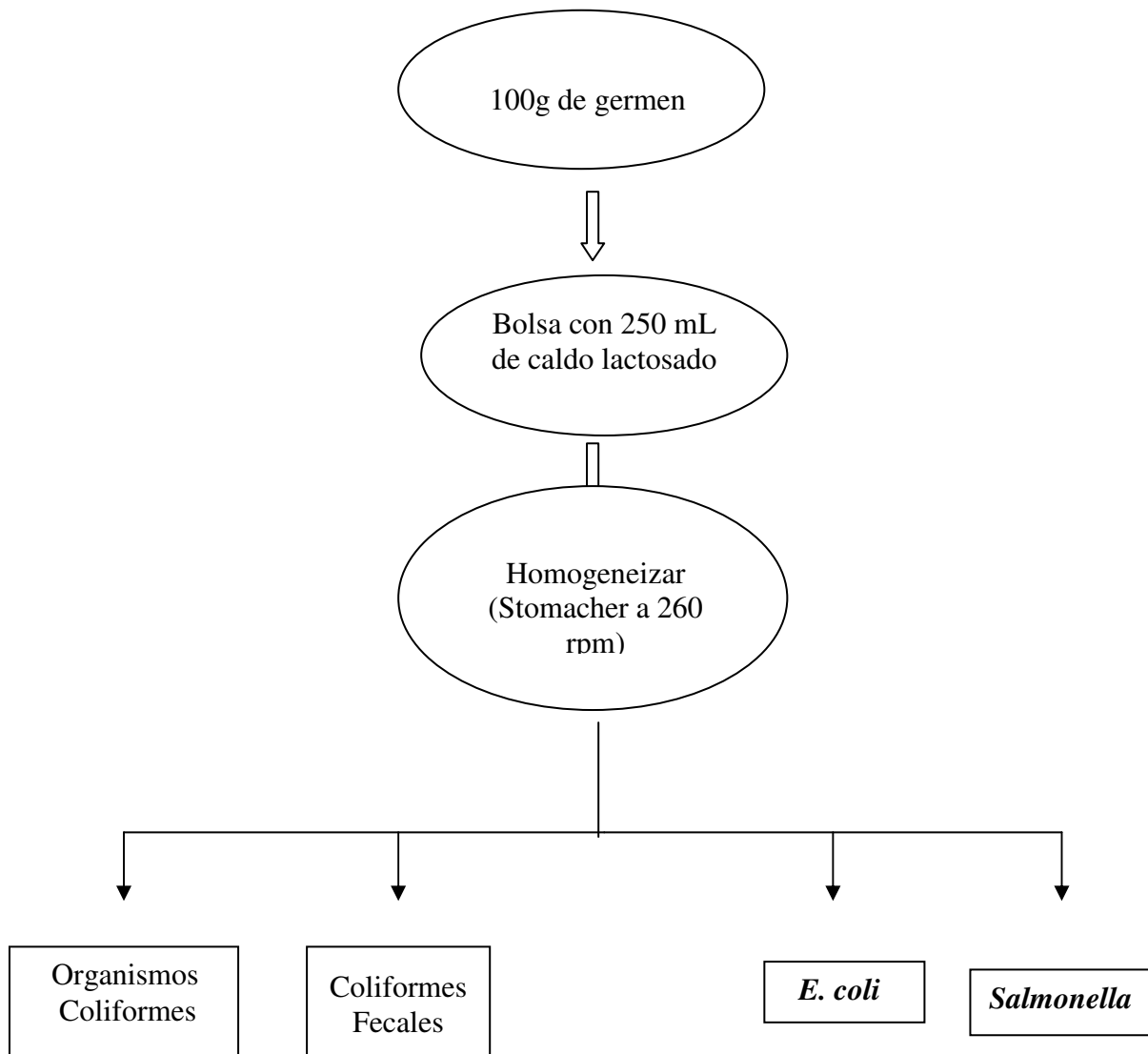
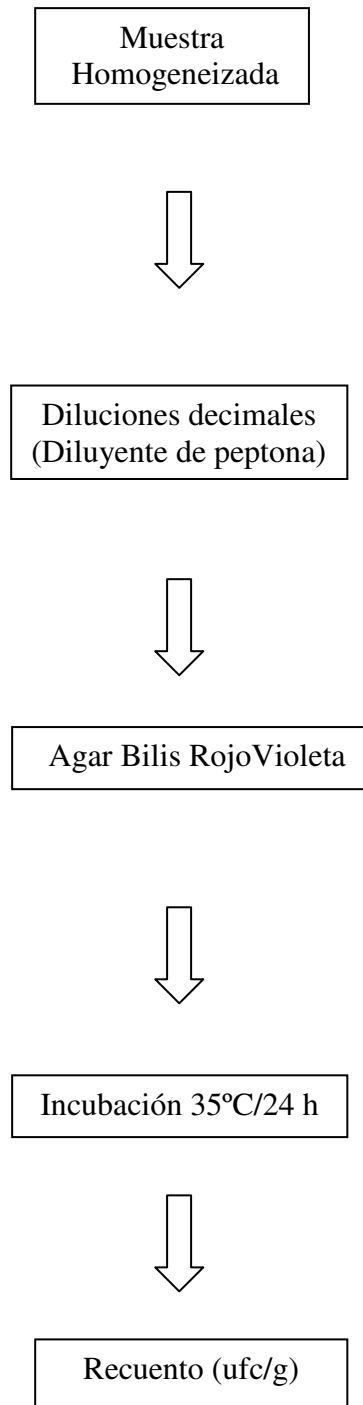


Figura 2. Recuento de organismos coliformes



4.5.6 Recuento de coliformes fecales y *E. coli*

4.5.7 Coliformes fecales

La cuantificación de los CF se realizó mediante la técnica del Numero Más Probable (NMP). A partir de la suspensión de germinado de soya homogeneizada en el Stomacher (dilución 10^0), se realizaron dos diluciones decimales más en DP (dilución 10^{-1} y 10^{-2}). A partir de la suspensión del germinado (10^0) se inoculó 1 mL en cada uno de tres tubos que contenían CL y campana Durham. La misma operación se realizó a partir de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . Los 9 tubos de CL inoculados fueron incubados a 35°C por 24 h. Una asada de los tubos que presentaron desarrollo y producción de gas, se transfirió en tubos conteniendo caldo lactosado bilis verde brillante fluorocult (CLF) y campanas Durham. Los tubos de CLF se incubaron a 44.5°C / 24-48 h. Los tubos de CLF que presentaron desarrollo y producción de gas se tomaron como positivos para la cuantificación de coliformes fecales (**Figura 3**). El cálculo de la concentración de CF se realizó con base en las tablas del NMP (Noguera., 2005)

4.5.8 *E. coli*

Para la cuantificación de *E. coli* se empleó la técnica rápida conocida como MUG (**Figura 4**). Ésta técnica se basa en la presencia de la enzima β -D- glucuronidasa en *E. coli*, la cual actúa sobre el 4-metil-umberiferil- β -D-glucorónido (MUG) presente en el medio de cultivo de (CLF), liberando 4-metil-umberiferona que emite fluorescencia azul/verde cuando se ilumina con luz ultravioleta (FDA., 2001 y Jay., 2000). En los tubos positivos a fluorescencia se investigó la producción de indol; el CLF es rico en triptofano por lo que permite la investigación de producción de indol por los microorganismos a partir de este aminoácido. La producción de indol se reveló

Figura 3. Cuantificación de coliformes fecales

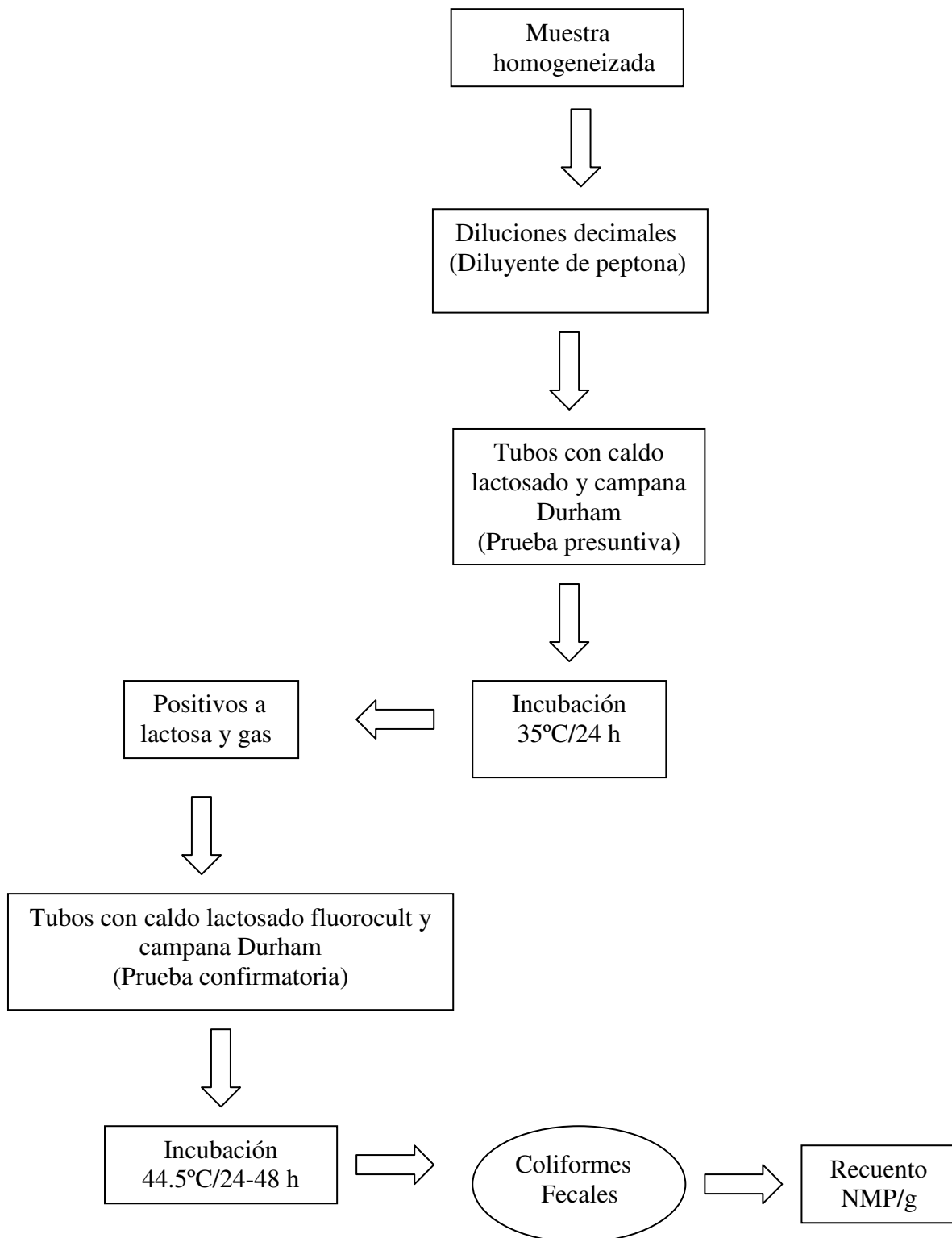
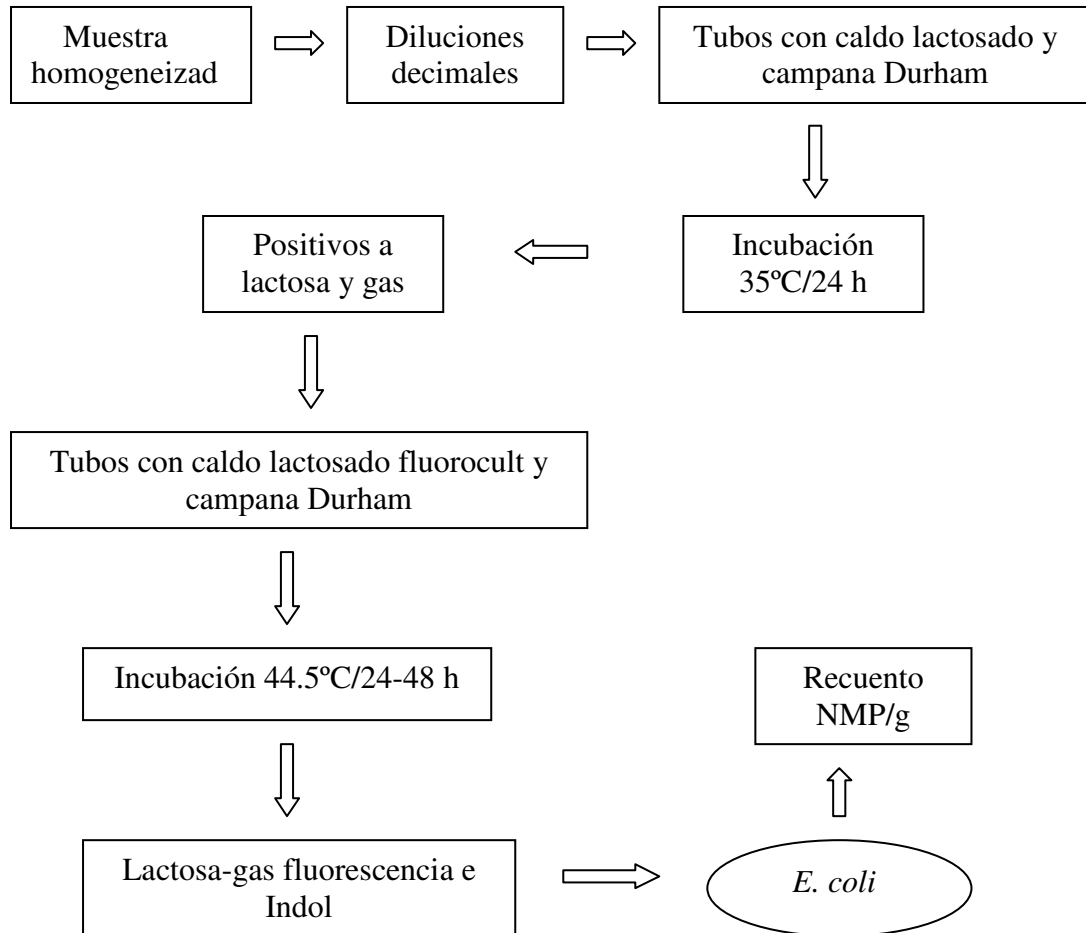


Figura 4. Cuantificación de *E. coli*

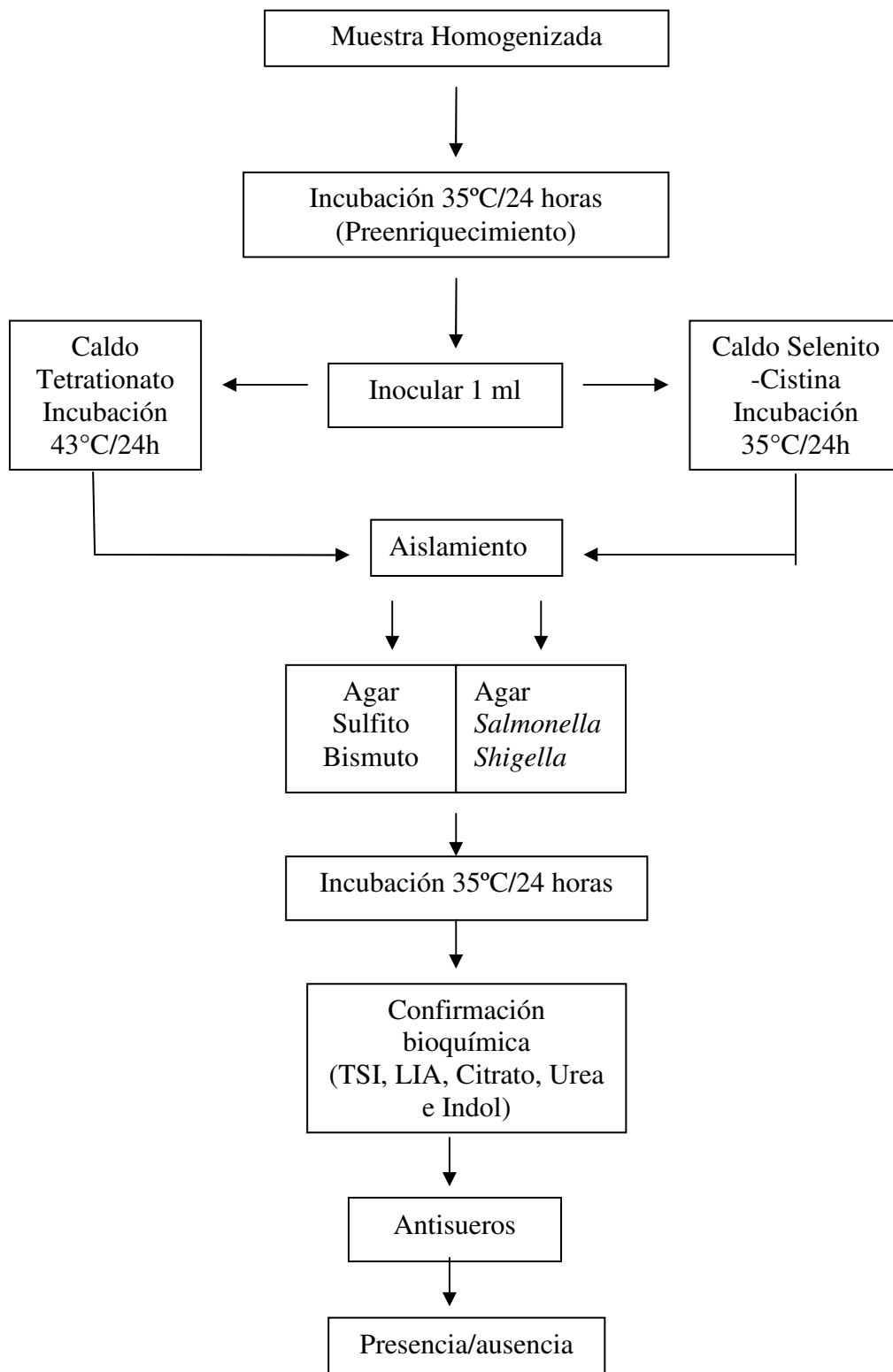


mediante el reactivo de Kovacs. Los tubos de CLF que presentaron un anillo púrpura en la superficie del caldo luego de la adición del reactivo fueron considerados como positivos. Los resultados fueron reportados como NMP/g de *E. coli* en el germinado de soya. Para mostrar la confiabilidad de la presencia de *E. coli* fue necesario someterla a una técnica que consistió en que los tubos positivos a las tres pruebas se estriaron en agar EMB (eosina azul de metileno) y se observaron colonias típicas que se caracterizan por ser incoloras de *E. coli*. (Jay., 2000 y Noguera., 2005).

4.5.9 Determinación de *Salmonella*

La determinación de éste patógeno se realizó de acuerdo a los manuales especializados (Vanderzant y Splittstoesser., 1992; FDA., 2001) y a la NOM-114-SSA1-1994 (**Figura 5**). La muestra de germinado de soya fue homogenizada en caldo lactosado en Stomacher a 260 rpm como ya se ha explicado y éstas bolsas fueron inmediatamente incubadas a 35°C de temperatura durante 24h. Posteriormente se transfirió 1 mL de CL a 9 mL de caldo selenito cistina (CSC) y 1 mL a 9 mL de base de caldo tetrionato (CT), los caldos se incubaron a 35°C/24 h y 43°C/24 h, para CSC y CT, respectivamente. De cada tubo se sembró por estría en medios selectivos diferentes como agar *Salmonella Shigella* (ASS), y agar Sulfito Bismuto (ASB); las cajas fueron incubadas a 35°C durante 24h. Entre 2 y 3 colonias típicas de cada medio se sometieron a algunas pruebas bioquímicamente en medios agar hierro y triple azúcar (TSI), agar hierro lisina (LIA), Urea, Indol y Citrato. Las colonias con pruebas bioquímicas típicas de *Salmonella* se confirmaron serológicamente con antisueros polivalentes (Jay., 2000).

Figura 5. Determinación de *Salmonella*



4.6 Comportamiento de cepas patógenas de *E. coli*.

4.6.1 Material biológico

4.6.2 Cepas

Para el estudio de comportamiento se trabajó con tres grupos patógenos de *E. coli*; de cada grupo patógeno se emplearon 3 cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP): 872 TL 489, 873 TL 489, 52 GM 291; 3 cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ECET): 1620 TL 326, 10ET, 150 TL 419 y 3 cepas de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI): 4VC81-5, 323GM894, TL3. Dichas cepas fueron obtenidas por el departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, México D.F. Todas las cepas se marcaron previamente con resistencia a rifampicina (Rojas, 2005).

4.6.3 Preparación del inóculo

Las 9 cepas patógenas de *E. coli* R+ fueron cultivadas en CST a 37°C durante 24 h, bajo estas condiciones de cultivo las cepas de *E. coli* alcanzan una concentración de aproximadamente 9 log ufc/mL. Posteriormente los cultivos fueron lavados dos veces en SSI y centrifugados a 3500 rpm durante 20 min; eliminando el sobrenadante en cada lavado. En tubos estériles, las tres cepas de cada grupo patógeno fueron mezcladas en volúmenes iguales de cada cepa lavada; de esta forma se tuvo una mezcla de cada cepa ECEI, otra de ECET y una más de ECEP. Posteriormente se prepararon diluciones decimales en DP para obtener el nivel de inóculo deseado. Esto se realizó para cada uno de los estudios que se describen más adelante.

4.6.4 Obtención del germinado

Para el estudio del comportamiento se compró semilla de soya en la central de abastos de la ciudad de Pachuca, Hgo. La semilla fue sometida a revisión con el fin de quitar materia extraña como otros granos, basura, piedras, insectos etc. La semilla se

sometió a 2 lavados con agua potable no estéril, con el propósito de quitar polvo y residuos de insecticidas o pesticidas que pudieran interferir en el estudio. Posteriormente, se desinfectó empleando 0.5mL de hipoclorito de sodio en 500mL de agua durante 5 min con agitación. Transcurrido el tiempo de desinfección la semilla se lavó de 2 a 3 veces con 500 mL de agua potable estéril con la finalidad de eliminar el desinfectante. La semilla desinfectada se hidrató con 500 mL de agua estéril dejándola en reposo de 6 a 8 h. Una vez hidratada, la semilla se recolectó en coladeras (previamente desinfectadas) y se extendió en charolas de plástico desinfectadas de manera que formara una monocapa, y se cubrió con una película de polietileno. Las charolas se almacenaron a $22^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. Periódicamente se hidrató el germinado esparciendo agua potable estéril.

4.6.5 Inoculación de los patógenos.

El germinado se contaminó en dos etapas de su desarrollo: en la semilla lavada y 24 h después, cuando el tallo había brotado.

4.6.6 Contaminación de la semilla.

La semilla hidratada se colocó en una coladera estéril y se dejó drenar durante 10 min con agitación periódica. A partir de un cultivo fresco en CST del patógeno se preparó una suspensión que contenía 10^5 ufc/mL según la concentración final deseada. En la suspensión de cada patógeno, por separado, se mantuvo sumergida la coladera que contenía la semilla durante 10 min y se dejó escurrir durante 5 min con agitación periódica. El germinado se depositó en charolas desinfectadas de plástico como se describió en 4.5.2.4.

4.6.7 Contaminación al brotar el tallo

La semilla hidratada se colectó en una coladera estéril y se drenó agitando periódicamente durante 10 minutos. Se distribuyó en toda la superficie de la coladera y se colocó sobre un vaso estéril de acero inoxidable. Con una película de polietileno se protegió contra la contaminación del ambiente y pérdida de humedad. La germinación se consiguió almacenándola durante 24 h a $22^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Por Separado, el germinado (de aprox. 0.5 cm de tallo) contenido en la coladera, se sumergió completamente durante 15 min en la suspensión de los grupos patógenos de *E. coli* que contenía 10^5 ufc/mL. Finalmente, el germinado fue depositado en charolas desinfectadas de plástico como se describió en 4.5.2.4.

4.6.8 Comportamiento de 3 cepas patógenas de *E. coli* durante la germinación de la semilla de soya a partir de semilla contaminada.

El muestreo se realizó al momento de inocular la semilla denominándolo tiempo “0” así como a 3, 6 24 y 48h, dichas muestras se realizaron por triplicado, se retiraron porciones de 10 g de semilla o germinado, se depositaron en 90 mL de solución salina isotónica (SSI; 0.85%) y se homogeneizó en Stomacher a 260 rpm. A partir de esta dilución se efectuaron otras diluciones decimales para determinar el contenido de los patógenos en las muestras analizadas. Para el recuento se empleó la técnica de vertido en placa empleando AST conteniendo 100 ppm de rifampicina. En estudios preliminares, se encontró que 100 ppm de Rifampicina. eran suficientes para inhibir el 99.99 % de la microflora nativa del germinado de soya tanto comercial como preparado en el laboratorio. Las cajas inoculadas se incubaron a 35°C durante 24h a 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias y se reportó como ufc/g.

4.6.9. Comportamiento de 3 cepas patógenas de *E. coli* durante la germinación de la semilla de soya a partir de germinado contaminado después de las primeras 24 h de germinación.

El seguimiento del comportamiento de los grupos patógenos se efectuó de la misma manera que en 4.6.8; diferenciándose en los tiempos de muestreos ya que se realizaron en tiempo “0”, 24, 48 y 72h

V.-RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Frecuencia de microorganismos en germinado de soya.

En general el germinado de soya presentó mala calidad microbiológica (Tabla 7, anexos). Todas las muestras estuvieron contaminadas con OC con límites que oscilaron entre 7.4×10^3 ufc/g y 7.4×10^5 ufc/g. Los CF y *E. coli* se encontraron con una frecuencia de 98 y 95 %, respectivamente, y con límites respectivos de entre; <3 y 1100 NMP/g y <3 y 1100 NMP/g (Tabla 7, anexos).

Las cifras de OC que encontramos en el germinado son más bajas que las reportadas por Patterson y Woodburn.,(1997); ellos reportan límites de 1×10^5 ufc/g a 1×10^8 ufc/g y mediana de 1.9×10^6 ufc/g en germinado de alfalfa. Otros autores reportan niveles elevados de OC en germinado tanto de alfalfa como de soya (Kuhmonen y Pitkaelae., 1991).

Las cifras de CF que observamos en el germinado que analizamos son semejantes a los reportados por Prokopowich y Blank.,(1991) a partir de germinado de alfalfa, los límites estuvieron entre 7.3×10^2 ufc/g a 1.1×10^3 ufc / g.

A pesar de haber obtenido cifras de OC menores que Patterson y Woodburn.,(1997), los niveles que encontramos revelan falta de higiene durante la producción y/o comercialización del germinado de soya. Es importante subrayar que en general la presencia de OC y CF en los alimentos no implica un riesgo en la salud (Fernández., 2000). Los OC son frecuentes en vegetales crudos (Duncan y Razzell., 1972; Prokopowich y Blank., 1991 y Khan y col., 1992). Aunque los CF son menos frecuentes en los vegetales, es posible su hallazgo en otros materiales (diferentes a la materia fecal) que pueden contaminar a las verduras (Fernández, 2000). Debido a ello tanto los OC y los CF son comúnmente empleados como indicadores de la eficiencia de

los procesos de desinfección de materiales y equipo y de la higiene durante la preparación de los alimento (Noguera., 2005). En consecuencia, el alto número de OC o CF que se detectó en el germinado de soya es posible relacionarlo con malas prácticas higiénicas durante la preparación de dicho germinado. Los altos niveles de OC y de CF en el germinado que analizamos pueden explicarse de dos maneras: una alta exposición a la contaminación durante su germinación, recolección, transporte y comercialización o una discreta contaminación y en función de su riqueza de nutrientes, alta humedad y temperatura ambiente (como la de crecimiento del germinado) que favorece la multiplicación de los microorganismos; dicho desarrollo de tales grupos microbianos puede ser tan activo que rápidamente alcancen su concentración máxima en el alimento (Buck., 2003).

No obstante, es muy probable que la segunda esté ocurriendo. En estudios realizados con germinado de alfalfa se observó un incremento considerable en la concentración de OC en las primeras horas de brotación de la plántula: partiendo de 10 ufc/g de semilla, en las primeras 24 h de germinación las cifras se incrementaron hasta alrededor de 100 000 000 de ufc/g de germinado a temperatura ambiente (Castro-Rosas y Escartín., 2000).

A diferencia de los OC y los CF, la presencia de *E. coli* sí se relaciona con contaminación fecal reciente de los alimentos; su hallazgo implica la posibilidad de que un patógeno pueda estar presente. En algunos alimentos como los mariscos, se ha encontrado una buena correlación de la presencia de *E. coli* con la de bacterias enteropatógenas (Fernández., 1981).

Tabla 6. Valores mínimos, medianas, máximos y frecuencia de microorganismos en germinado de soya.

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Máximo	Frecuencia %
OC (a)	7.35×10^3	4.61×10^4	7.36×10^5	100
CF (b)	<3	31.5	1100	98
<i>E. coli</i> (b)	<3	15	1100	95
<i>Salmonella</i>	-	-	-	5

(a) UFC/g

(b) NMP/g

En un estudio realizado con germinado de alfalfa en la ciudad de Querétaro, *E. coli* se aisló con una frecuencia del 74% (Castro Rosas y Escarpín., 1999). En éste tipo de germinado también se ha podido aislar *E. coli* en un 86% (Cruz, 1998). A raíz de un brote ocurrido en Japón (epidemiológicamente ligado al consumo de germinado de rábano) se demostró que el contacto entre las semillas con agua de riego contaminada con *E. coli* O157:H7 fue suficiente para esperar una semilla y un germen contaminado, en determinado tiempo (0-24h) tomando una concentración inicial de 100 ufc/mL en agua a una concentración de 7.3 – 7.8 log ufc/g (Hara y col., 1997). Recientemente se han reportados brotes de gastroenteritis por *E. coli* asociados al consumo de germinado de alfalfa en donde se estiman que el número de infecciones ocasionadas por *E. coli* O157:H7 rebasa en E.U.A. los 20,000 casos anuales, de los cuales 250 culminan con el fallecimiento del paciente (MMWR., 1997); no obstante, es claro que las deficiencias diagnosticas llegan a enmascarar las tasas reales (CDR., 1997), todo esto se ve reflejado en brotes ocasionando diarreas, tomando mayor impacto entre la población infantil de los países subdesarrollados y llegan a originar epidemias en adultos (Depto., unam 2006). Otros estudios se han realizado en semillas de alfalfa detectando *E. coli* en semillas listas para germinar, (Wu y col., 2001), así como el comportamiento de cepas patógenas de *E. coli* durante la germinación de dichas semillas (Taormina y Beuchat., 1999) y el crecimiento de la bacteria al hacer crecer la semilla de alfalfa (Stewart y col., 2001).

Se sabe que la mayoría de las cepas de *E. coli* son no patógenas, sin embargo, existen algunas cepas que causan enfermedad tal es el caso de *E. coli* O157:H7, cuya dosis mínima de infección es muy baja (10-100 células). Sin embargo, para otros

grupos patógenos de *E. coli* como los que se emplearon la dosis mínima infectante es mucha mayor (p.e ECET 1×10^8 ufc). En algunos países se ha relacionado la presencia de *E. coli* con numerosos brotes de enfermedades producidas por el consumo de verduras crudas afectando los sistemas inmunológicos principalmente a niños y ancianos (Taormina y Beuchat., 1999).

En México, al menos tres grupos de *E. coli* son patógenos: *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enterotoxigénica (Fernández., 2000). Estos grupos patógenos se aíslan frecuentemente de la materia fecal de enfermos (Karch y col., 1995; Hancock y col., 1997).

Debido a las deficientes condiciones de higiene con las que generalmente se producen, transportan y comercializan los germinados de soya, es posible que algunas de las cepas de *E. coli* que aislamos del germinado sean patógenas. En tal caso, es necesario someter las cepas de *E. coli* a pruebas de patogenicidad.

Finalmente, en relación a los estudios de frecuencia se encontró *Salmonella* con una frecuencia de 5 %. Este valor aunque aparentemente bajo en realidad no lo es, ya que generalmente se acepta que la frecuencia de *Salmonella* en verduras crudas es de 1 a 3 % (FDA., 2001). En consecuencia, el valor que hemos encontrado esta por arriba del valor promedio.

En estudios realizados en germinado de alfalfa, se encontró *Salmonella* en un 82% (Cruz., 1998). En germinado de alfalfa obtenido en la Ciudad de Querétaro *Salmonella* se ha aislado con una frecuencia de 1.1% (Castro Rosas y Escartín., 1999). Otros estudios han reportado en Finlandia y EUA grupos de población que se enfermaron después de consumir germinado de alfalfa, al ser evidente el tratamiento inadecuado para asegurar la actividad del microorganismo (Mahon y col., 1997). Otros

brotos reportados de *Salmonella* en germinados, destaca 143 personas afectadas en Rusia por consumir germinado de soya (O'Mahony y col., 1990); al igual que en Finlandia fueron afectadas 492 personas al ser aislada *Salmonella* del germinado de alfalfa (Ponka y col., 1995). Los datos indican que a pesar de la baja frecuencia de microorganismos patógenos en las muestras que analizamos hay que admitir la posibilidad de su presencia, ya que en un alto porcentaje de las muestras se detectó *E. coli* en cantidades muy pequeñas del producto. En tal caso, los resultados nos indican un riesgo potencialmente elevado en el germinado de soya (Slutsker., 1997).

5.2 Comportamiento de cepas patógenas de *E. coli* en germinado de soya.

En general, la simple presencia de un microorganismo patógeno en un alimento es razón suficiente para rechazarlo (Fernández., 2000). La razón es que algunos como *Shigella* tienen dosis infectante muy baja (Cliver., 1990). Cualquier factor que favorezca la multiplicación de los microorganismos en el alimento incrementa el riesgo. En otras palabras, un alimento es más o menos peligroso dependiendo del tipo de microorganismos patógenos que contenga y de las facilidades que presente para su eventual desarrollo. El comportamiento microbiano en los alimentos, no obstante, depende del efecto de una variedad de factores ecológicos (ICMSF., 1980). Debe entenderse que este efecto en los alimentos no es constante, la influencia de tales factores suelen variar con respecto al tiempo (actividad acuosa), temperatura por ejemplo (Rojas., 2005).

Como se sabe, en las verduras existen suficientes nutrientes para sostener la multiplicación de microorganismos. Específicamente, los germinados de semillas contienen nutrientes fácilmente aprovechables por las bacterias (Kylan y McCready.

1975). Existen diferentes estudios que muestran la capacidad que tiene diferentes microorganismos patógenos para multiplicarse en los germinados de semillas (Pelczar., 1983, Cliver., 1990; Fernández., 1997b); sin embargo, el comportamiento de grupos patógenos de *E. coli* diferentes a la *E. coli* O157:H7 no se ha investigado.

En consecuencia, estudiamos el comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* (ECEI, ECET y ECEP) en germinado de soya. Para evaluar el comportamiento de los tres grupos patógenos de *E. coli* se emplearon cepas resistentes al antibiótico rifampicina eliminado con ello la interferencia de la flora nativa del germinado (Castro-Rosas y Escartín., 2000). Se prepararon cepas de *E. coli* patógenas resistentes a 100 ppm de rifampicina. Esta concentración del antibiótico fue suficiente para inhibir por completo la flora nativa.

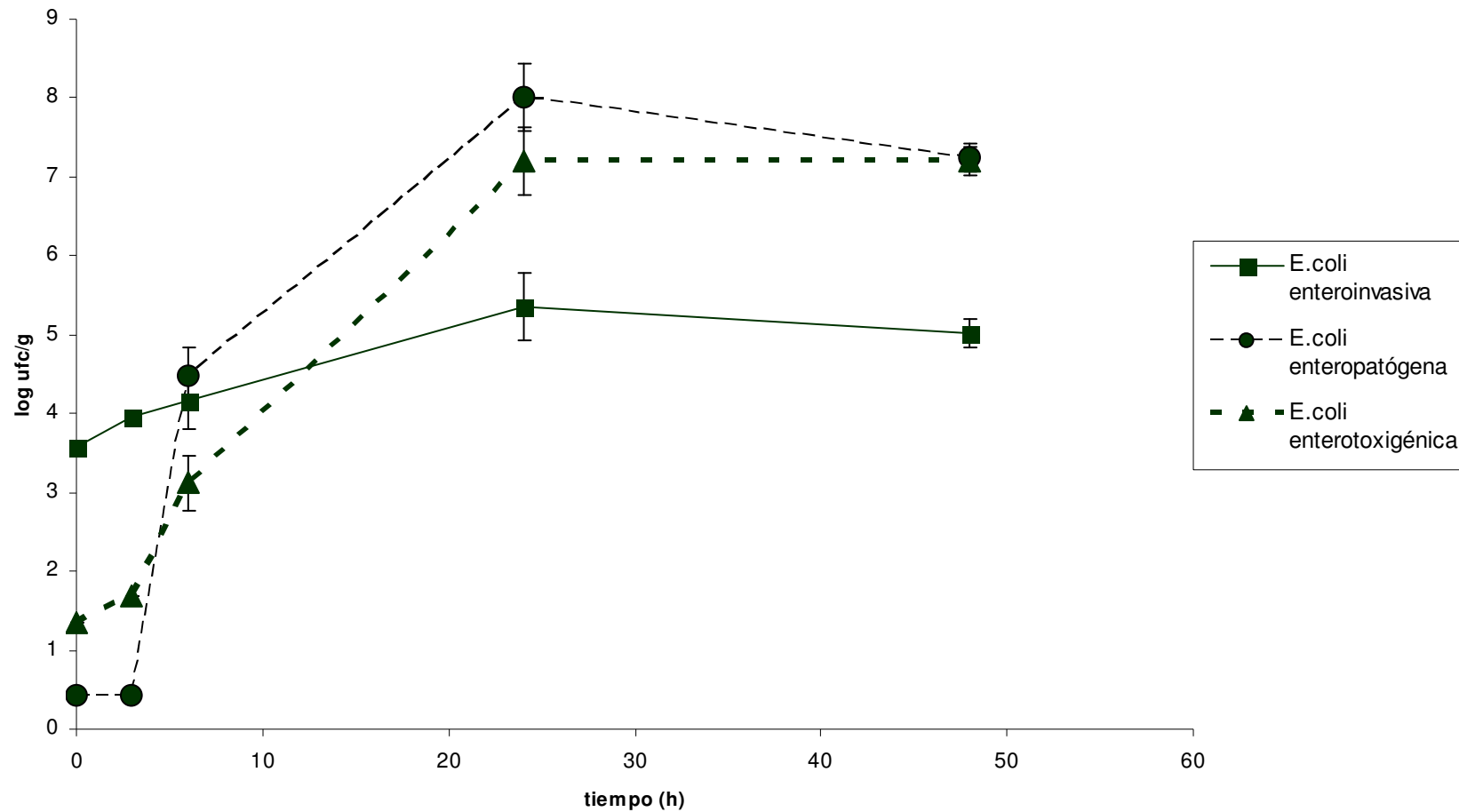
El recurso de emplear cepas resistentes a un antibiótico para monitorear su comportamiento en diversos materiales es muy utilizado para abatir la interferencia de la flora asociada (Lal, y col., 1995; Castillo y col., 1997; Castro-Rosas y Escartín., 2000; Gustafsson, y col., 2003).

El comportamiento de las cepas patógena de *E. coli* en el germinado de soya se estudió de dos formas diferentes: contaminado la semilla con el patógeno o contaminado el germinado después de las primeras 24 h de desarrollo.

5.3. Comportamiento de cepas patógenas de *E. coli* en germinado contaminado desde la semilla.

Los tres grupos patógenos de *E. coli* se multiplicaron durante la germinación de la semilla (**gráfica 1**). A partir de entre 1 a 2 log ufc/g de los grupos patógenos /g de semilla, en tan sólo 24 h de germinación, *E. coli* patógena alcanzó una concentración de entre 5 a 7 log ufc/g de semilla germinada (gráfica 1). Es importante observar que la *E.*

Gráfica 1. Comportamiento de 3 cepas patógenas de *E. coli* en semilla de soya.



coli enteroinvasiva mostró ligera actividad; sólo incrementó 1 log después de 24 h de germinación de la semilla de soya. Sin embargo, después del máximo las tres cepas patógenas de *E. coli* mantuvieron sus niveles constantes durante el crecimiento de la plántula, de manera que para el segundo día la concentración por gramo de germinado fue de 5 a 7 log ufc/g.

De cualquier forma, el germinado de soya resultó un sustrato que soporta muy bien el desarrollo de las bacterias patógenas estudiadas y en cualquier caso, la concentración final de los patógenos en el germinado constituye un riesgo severo para los consumidores. Por otra parte, los resultados indican que si la semilla se encuentra contaminada con estas bacterias patógenas al inicio de la germinación, éstas se encuentran un medio favorable para su multiplicación; es muy probable que en tan sólo 24 h de crecimiento del germinado y partiendo aún con cifras muy discretas del patógeno, se alcancen niveles de 10^6 - 10^7 ufc de patógeno /g de germinado.

Es importante subrayar que en la **gráfica 1** los valores que se reportan son por gramo de germinado; si consideramos que una persona consumiera mínimo 50 g de un germinado contaminado con algún grupo patógeno de *E. coli*, en donde el patógeno se hubiera multiplicado durante la germinación de la semilla tal como en nuestro estudio, la concentración del patógeno que estaría ingiriendo sería de entre 270 000 000 a 400 000 000 ufc. Como se puede observar es una cifra muy alta y con mayor probabilidad para provocar una enfermedad.

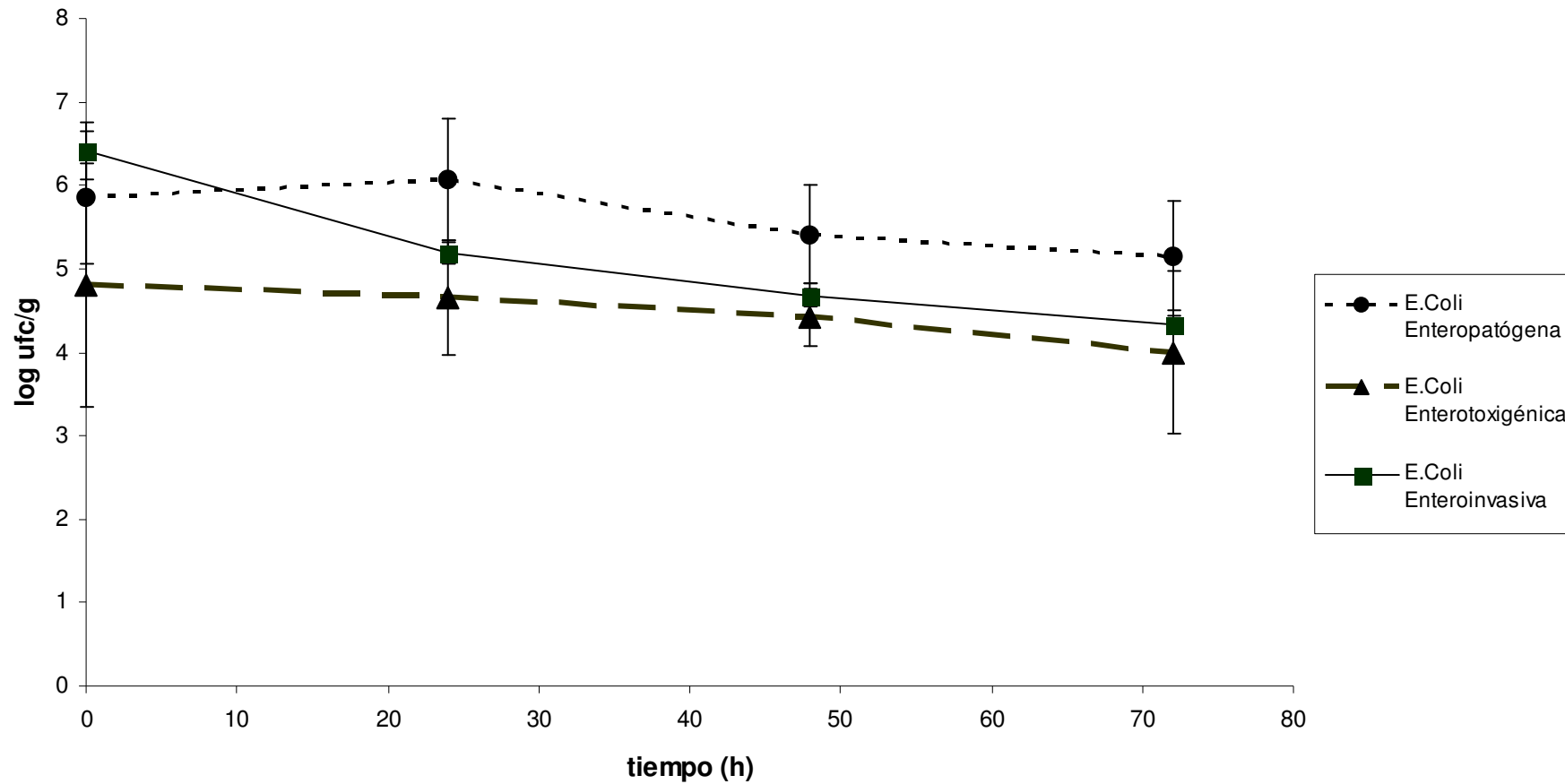
5.4. Comportamiento de cepas patógenas de *E. coli* en germinado de soya contaminado después de las primeras 24 horas de germinación de la semilla.

El comportamiento de los patógenos en el germinado cuando se inoculó desde la semilla, nos llevó a cuestionar si estas bacterias eran capaces de multiplicarse en la plántula una vez que habían transcurrido las primeras 24 horas de germinación de la semilla de soya. Esto por dos razones:

1. En los estudios en donde inoculamos la semilla y después se dejó germinar, los microorganismos se multiplicaron activamente durante las primeras 24 h, no así después de este tiempo. Este comportamiento podría deberse a que el patógeno llegó a un máximo de desarrollo (por agotamiento de nutrientes o saturación de espacio) o bien por efecto inhibitorio de la flora asociada.
2. Para simular una posible contaminación del germinado, con algún grupo patógeno de *E. coli*, después de las primeras 24 h de germinación de la semilla. Este estudio se justifica ya que durante su desarrollo y comercialización el germinado está expuesto a diversas fuentes de contaminación como por ejemplo el agua de irrigación, el humano, la fauna, entre otras.

Cuando se contaminó el germinado de 24 h (aprox 0.5 cm.) con los grupos patógenos de *E. coli* no se observó desarrollo (**gráfica 2**). Por el contrario, el número disminuyó progresivamente.

Gráfica 2. Comportamiento de 3 cepas patógenas de *E. coli* (semilla germinada)



Debido a la baja actividad acuosa de la semilla, la dinámica microbiana en ésta, es nula. Durante la hidratación y ulterior germinación se promueve la actividad enzimática, de la que se generan nutrientes fácilmente metabolizables por los microorganismos tales como la glucosa, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados solubles (Kylan y McCready., 1975; Ranhota y col., 1977; Lorenz., 1980). Se sabe que una diversidad de microorganismos puede subsistir y multiplicarse en la superficie de los vegetales a expensas de los escasos nutrientes (sales, vitaminas, carbohidratos, proteínas) que se disuelven en el agua de exudación (Thaysen y Galloway., 1992; Brackett y col., 1997). La actividad de los patógenos dependerá además de la eficiencia para competir con la flora microbiana nativa del alimento. En nuestro caso, las 3 cepas patógenas de *E. coli* fueron capaces de multiplicarse durante las primeras horas del desarrollo del germinado, pero no después de 24 h. Un comportamiento similar al que exhibieron las cepas patógenas de *E. coli* en el germinado de soya durante su crecimiento, ha sido reportado en la literatura trabajando con diferentes tipos de germinado y otros microorganismos. Andrews y col., (1982) describen un desarrollo muy activo de 2 serotipos de *Salmonella* (*eimsbuettel* y *poona*) en germinado de alfalfa. Asimismo, *S stanley* y *S. enteritidis* incrementan su número durante las primeras horas de desarrollo de germinado de alfalfa (Andrew y col., 1982; Geiges y col., 1990). *Bacillus cereus* lo incrementa en aprox 4 log durante las primeras horas de germinación (Harmon y col., 1987), al igual que *Klebsiella pneumoniae* (Patterson y Woodburn., 1997; Park y Sanders., 1990). Por el contrario Geisges y col., (1990), reportan nulo crecimiento de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento de germinado de soya a 4 y 22°C. Carlin y Peck., (1996) encontraron también que *C. botulinum* (tipo B, E y F) no se multiplica en germinado de soya. De igual forma Aytac

y Gorris., (1994), observaron nulo desarrollo *A. hydrophila* y *L. monocytogenes* en germinado de alfalfa empacado en atmósfera modificada y mantenido en refrigeración durante 7 días. También Geisges y col., (1990), reportan nulo desarrollo de *S. enteritidis* durante el almacenamiento de germinado de soya, pero no durante la germinación de la semilla en donde el microorganismo se multiplica activamente. Por otro lado Castro-Rosas y Escarpín., (2000) observaron un comportamiento de *V. cholerae*, *S. Typhi* y *E. coli* O157:H7 en germinado de alfalfa muy semejante al que observamos con los tres grupos patógenos de *E. coli* en germinado de soya.

De todos los estudios señalados, es importante destacar que en todos los casos, los investigadores observan incremento en los niveles de los patógenos sólo en las primeras horas del desarrollo del germinado; no después de las primeras 24-48 h de desarrollo de la plántula. En tal caso, esos hallazgos concuerdan con los que obtuvimos.

Dos explicaciones pueden proponerse para tal comportamiento: el efecto antagónico referido, y la síntesis de sustancias antimicrobianas por parte de la planta como las fitoalexinas, que son compuestos de bajo peso molecular sintetizados en respuesta a una infección microbiana o por condiciones de estrés (Subba y col., 1967; Amin y col., 1988; Beuchat., 1989, 1990 y Beuchat y col., 1994). Quizá estas sustancias se formen o incrementen su concentración después de las primeras 24 hs de crecimiento de la plántula. Es muy probable la ocurrencia simultánea de ambos efectos en el germinado. Con el propósito de disminuir riesgos a la salud, es pertinente subrayar la importancia de utilizar semilla de soya, libre de microorganismos patógenos en la obtención del germinado, ya que como queda evidenciado estos entran fácilmente en actividad. A la postre pueden alcanzar niveles muy elevados desde las primeras horas de la germinación. En reportes recientes, se manifiesta el interés creciente por evaluar

métodos de desinfección a base de agentes físicos y químicos que permitan disponer de semilla libre de microorganismos patógenos (Okuda y col., 1994; Jaquette y col., 1996; Beuchat., 1997; Piernas y Guiraud., 1997).

Es importante también que el agua empleada para la germinación de la semilla y para la irrigación del germinado sea de excelente calidad microbiológica. El agua empleada para la irrigación de la semilla durante su germinación tiene relación con algunos brotes que han sido publicados (Stewart y col., 2001), lo cual pone en duda su calidad microbiana, así como el agua empleada en el establecimiento donde se vende al público dicho germinado, proporcionando una hidratación periódica de modo que cumpla las características organolépticas superficiales proporcionando color, olor y principalmente dando la apariencia de frescura. Es pertinente el análisis de la calidad del agua para una germinación libre de agentes patógenos y una adecuada desinfección mediante el uso de agentes químicos, como hipoclorito de sodio y yodo, lo cual se ha demostrado que inicialmente reduce en gran cantidad la presencia de microorganismos coliformes y *Salmonella* en germinado de alfalfa (Garg y col., 1990; Fett., 2002; Lang y col., 2000).

Se ha sugerido que una forma de disminuir el riesgo de salmonelosis por consumo de germinado de alfalfa, consiste en mantenerlo en refrigeración y consumirlo dentro de los primeros 4 días a partir del comienzo de la germinación de la semilla (Jong y Andersson., 1995). Esta recomendación no parece congruente con los resultados que obtuvimos o al menos no se aplica para el caso de los grupos patógenos de *E. coli* que analizamos. Como se observó, en todos los casos se presentó incremento de los patógenos en las primeras 24 h de crecimiento de la plántula.

Idealmente el objetivo es obtener germinado a partir de semilla libre de microorganismos patógenos y observar prácticas sanitarias durante la producción y comercialización del germinado para evitar contaminación. Especialmente ante bacterias que pueden mostrar muy baja dosis infectante; como se observa en grupos de personas hipersensibles: niños, ancianos o mujeres embarazadas.

Aparte de las bacterias, otros agentes patógenos pueden llegar al germinado. Aunque incapaces de multiplicarse en él constituyen un riesgo de consideración; por ejemplo un sólo huevecillo de *Taenia solium* basta para provocar cisticercosis cerebral en un individuo (INDRE., 1991).

Las fuentes de contaminación que se han venido deduciendo pudieran ser a) agua con materia fecal humana utilizada en la irrigación del germinado de soya, b) el contacto manual directo de las personas que lo manejan constituye también un riesgo especial, ya que pueden ser portadores de microorganismos patógenos. La elevada tasa de portadores de bacterias patógenas y parásitos en México da soporte a esa posibilidad.

Se han evaluado diferentes métodos de desinfección del germinado de tamaño (o sub-tamaño) comercial y hasta el momento ninguno de los reportados ha mostrado eficiencia (Castro-Rosas y Escartín., 1999; Adams y Cox., 1989; Shapiro y Holder., 1960; Garg y col., 1990).

En consecuencia, en los EUA se ha llegado a la conclusión que por el momento la única forma de obtener germinado con alto grado de inocuidad es prepararlo a partir de semilla libre de microorganismos patógenos y mediante la aplicación conjunta del sistema HACCP (FDA., 1999). Es importante señalar que a diferencia de los EUA en México no está regulada la producción de germinados de semillas.

El germinado de soya resultó un sustrato que soporta muy bien el desarrollo de las bacterias patógenas estudiadas y en cualquier caso, la concentración final de los patógenos en el germinado constituye un riesgo para los consumidores.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- Todas las muestras de germinado presentaron mala calidad higiénica
- 2.- El 95 % de las muestras presentaron indicios de contaminación fecal
- 3.- La frecuencia de *Salmonella* fue de 5 %.
- 4.- A pesar de la relativa baja frecuencia de *Salmonella* en el germinado no puede excluirse su presencia, pues el alto porcentaje de *E. coli* detectado (95%) constituye una evidencia de exposición a la contaminación fecal de este producto.
- 5.- Los tres grupos patógenos de *E. coli* se multiplicaron durante las primeras 24 h de germinación de la semilla de soya a temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$).
- 6.- La concentración que alcanzaron las tres cepas patógenas de *E. coli* al multiplicarse en la semilla y el germinado fue mayor o igual a la dosis mínima infectante.
- 7.- Ninguno de los grupos patógenos de *E. coli* se multiplicó en germinado de soya contaminado después de las primeras 24 horas de germinación de la semilla.
- 8.- Con fundamento en los resultados de este estudio, podemos afirmar que la prevención de la contaminación por microorganismos patógenos en cualquiera de las etapas de obtención de este producto, pero principalmente en la semilla, debe mantenerse como una acción prioritaria. En México, en tanto no se dé énfasis adecuado a las acciones preventivas, especialmente bajo condiciones endémicas de gastroenteritis por grupos patógenos de *E. coli* u otros microorganismos patógenos que prevalecen en el país, la población debería abstenerse de consumir crudo el germinado de soya (y otros similares).

VIII.- BIBLIOGRAFIA

1. - Adams, M. R., A.D. y Cox, L. J. (1989). Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol.* 6 : 69 – 77.
2. - Andrew, W. H., Mislivec, P. B., Wilson, C. R., Bruce, V. R., Poelma, P. L., Gibson, R., Trucksess, M. W. y Young, K. 1982. Microbial Hazards Associated with Bean Sprouting. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65(2): 241-248
3. - Airoldi, A. A. y Zottola, E. A. 1998. Growth and survival of *Salmonella typhimurium* at low temperature in nutrient deficient media. *J. Food Sci.*, 53: 1511-1513.
4. - Amin, M., F. Kurosaki, y A. Nishi. 1988. Carrot phytoalexin alters the membrane permeability of *Candida albicans* and multilamellar liposomes. *J. Gen. Microbiol.* 134: 241 – 246.
5. - Andersson, Y., Ponka, A., Siitonen, A., Jong, B., Jahkola, M., Haikala, O., Kuhmonen, A. y Pakkala, P. 1995. *Salmonella* in alfalfa sprouts. *Lancet.* 345: 462 – 463.
- 6.-Aytac, S. A., y Gorris, L. G. M. 1994. Survival of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under moderate vacuum. Abstract. *World J. Microbiol. Biotechnology.* 10(6): 670-672.
7. - Benenson, A S. 1990. Control of Communicable Diseases in Man. 15th Ed. Am. Pub. Health Association, Washington, DC
8. - Beuchat, L.R. y Golden D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43: 134 – 142.
9. - Beuchat, L. R. y Brackett, R. E. 1990 Inhibitory effect of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1734-1742.
10. - Beuchat, L.R., Brackett R. E. y Doyle P. M. 1994. Lethality of Carrot Juice to *Listeria monocytogenes* as Affected by pH, Sodium Chloride and Temperature. *J. Food Prot.* 57: 470 – 474.
11. - Beuchat, L R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59:204-216
12. - Beuchat, L. R. 1997. Comparison of chemical treatments to kill *Salmonella* on alfalfa seeds destined for sprout production. *Int. J. Food Microbiol.* 34(3): 329 - 333.

13. - Beuchat L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2. Available via the Internet at <http://www.who.int/fsf/fos982~1.pdf>
14. - Brackett E. R., Doyle, P.M., Beuchat. L. R. y Montuile. J. T.(eds.). 1997. Food Microbiology Fundamentals and Fronters. ASM-Press, Washington D.C.
15. - Brenner, D.J. 1984. Family I. *Enterobacteriaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. (Ed.). Vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A.
16. - Bryan, F.L. 1968. What the sanitarian should know about staphylococci and salmonellae in non dairy products. II. *Salmonella*. J. Milk Food Technol. 31: 131 – 140.
17. - Bryan, F L. 1977. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. *J. Food Prot.*40:45-56
18. - Bryan, F. L., Fanelli, M. J. y Riemann, H. 1979. *Salmonella* infections. En: Food borne infections and intoxications, 2.^a ed., p. 74-130, Riemann, H. y Bryan, F. L. ed., Academic Press (New York).
19. - Buck, J. W. Walcott, R. R. y Beucht, L. R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Online. Plant Health Progress. 10: 121-134.
20. - Carlin y Nguyen–the, C F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruit and vegetables. *Crit. Revs. In food. Sci. & Nutr.* 34: 371- 401
21. - Carlin, F. y Peck, M. W. 1996. Growth of and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in cooked pureed vegetables at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3069-3072.
22. -Castillo A A., Dickson, J S., Clayton, R P. y Lucia G.R. Acuff.1997. Eficiencia de un método químico de disolución de pelo en la reducción bacteriana de origen fecal en la piel de bovino. XIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los alimentos. Guadalajara, Jal, México
23. -Castro – Rosas, J. y Escartín, E.F. 1999. Incidence and germicide sensitivity ok *Salmonella typhi* and *Vbrio cholerae* O1 in alfalfa sprouts. *J. Food Saf.* 19: 137-146.
24. -Castro-Rosas, J. y Escartín, E.F. 2000. Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. *Journal of Food Science.* 65 (1): 162-165
25. - Chung, K.C. y Goepfert, J.M. 1970. Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci.* 35: 326 -328.

26. – CDC., 1991 (Centers for Disease Control and Prevention). Multi-state outbreak of *Salmonella poona* infections - United States and Canada. Morbidity and Mortality Weekly Report 40(32): 549.
27. - CDC., 1996 (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice - British Columbia, California, Colorado, and Washington, October, 1996. Morbidity and Mortality Weekly Report 45(44): 975.
28. - CDR., 1997. Hospital outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with a rare phage type, Ontario. Canada Communicable Disease Report 23(5): 33.
29. -CDC., 2000 (Centers for Disease Control and Prevention). Surveillance for food borne-disease outbreaks- United States, 1993 – 1997. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 49: 297-299.
30. - Callister S.M. y Agger W A. 1989. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophilia* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:249-253
31. - Cliver, D.O. 1990 viruses: 275-292. In: Food borne Diseases. Cliver, D.O (Ed), *Acad. Press Inc*
32. -Cortes L.A, Rodríguez-Angeles G, Moreno-Escobar E.A, Tenorio-Lara J.M, Torres-Mazadiego B.P y Montiel-Vázquez E. 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco México, *Salud Pública Méx.*; 44:297-302
33. - Cruz Ariadna, 1998. Determinación de patógenos entéricos en germinados de alfalfa. Departamento de Microbiología, ENCB – IPN, y Facultad de Medicina UNAM.
34. - D’Aoust, J.Y., B.J., Thisdale, P., 1975. *Salmonella* eastbourne outbreak associated with chocolate. *J. Inst. Can. Sci. Technol.* 8: 181 – 184.
35. - Davis, H., Taylor, J. P., Perdue, J. N., Stelma, G. N., Jr. Humphrey, J.M. Jr., Rowntree, R. III. y Greene, K.D. 1988. A Shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce, *Abstr. Am. J. Epidemiol.* 128: 1312.
- 36.-Departamento de bacteriología UNAM., consulta 2006., <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-ECEH.pdf>.
37. - Doyle, M P., y Schoeni. J L. 1986. Isolation of *Campilobacter jejuni* from retail mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:449-450
38. - Doyle, M P. y Padhye, V V 1989. *Escherichia coli*: 236-281. In: Food borne Bacterial Pathogens, Doyle, M.P. (Ed.). *Marcel Dekker, Inc*

39. -Doyle, M P. y Cliver, D O. 1990. *Escherichia coli*: 209-215. In: “Food borne Diseases”. Cliver, D.O. (Ed.). *Acad. Press. Inc*
40. -Duncan D. W. y Razzell, W.E. 1972. *Klebsiella* biotypes among coliform isolated from forest environments and farm produce. *Appl. Microbiol.* 24 : 933 – 938.
41. - DuPont, L H., Formal, S B. y Hornick, R B. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *New Engl J Med.* 285
42. - Ercolani, G.L. 1976. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:847-852
43. - FDA. 1998. Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. U.S. Food y Drug Administration. Available via the Internet at <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodguid.html>
44. - FDA (Food and Drug Administration) 1999. ISSUES GUIDANCE TO ENHANCE SAFETY OF SPROUTS. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/hhsprout.html>
45. - FDA (Food and Drug Administration).2001. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. In: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Chapter IV. 2001. <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-4g.html>
46. - Fernández, E. E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara, México. pp. 209-349.
47. - Fernández Escartín, E. 1997a. Manual de Curso de Microbiología Sanitaria de Agua y Alimentos. D.I.P.A. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
48. -Fernandez, E E. 1997b. Identification and prevention of microbial risks in foods: the HACCP approach and priorities in México. *Environ. Health* 40-42
49. - Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
50. - Fett W.F. 2002. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on laboratory-inoculated mung bean seed by chlorine treatment. Eastern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Wyndmoor, Pennsylvania 19038, USA. *J Food Prot*: 65(5):848-52
51. - Fields, M.L., Richmonds, B.S. y Baldwin, R.E. 1968. Food quality as determined by metabolic by-products of microorganismos. *Adv.Food Res.* 16: 161 – 229.

52. -Frazier, W. C. y Westhoff, D. C. 1991. Microbiología de los Alimentos. Tercera Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, Spain. pp. 439
53. - Fordman, J. R., Well, C. E. y Chen, L. H. 1995. Sprouting of seed and nutrient composition of seed and sprout. *J. Food Sci.* 40: 552-556.
54. - Foster, J.W. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* 175: 1981 – 1987.
55. - García-Villanova, R B. y Galvez-Vargas, R. 1987. Contamination of fresh during cultivation and marketing. *Int. J. Food Microbiol.* 4:285-291
56. - Garg, N., Churey, J. J. y Splittstoesser, D.F. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *J. Food prot.* 53: 701 – 703.
57. - Glatz, B A. y Brudving, S A. 1980. Survey of commercially available cheese for enteropathogenic *Escherichia coli* K J. *Food Prot.* 43:395-398
58. - Geiges, O., Staehlin, B. y Bauman, B. 1990. Microbiological evaluation of prepared salad vegetables and sprouts Mikrobiologische Beurteilung von Schnittsalat and Sprossmuese Abstract Mitteilungen-aus-dem-Gebiete-der- lebensmitteluntersuchung-und-Higiene.81 (6): 648
59. - Geldreich, E. E. y Bordner, R. H. 1971. Fecal contamination on fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review. *J. Milk Food Techn.*, 34: 184-195.
60. - Gilliland, S. E. y Speck, M. L. 1972. Interactions of food started cultures and food borner pathogens: lactic streptococci versus *staphylococci* and *Salmonella*. *J. Food Milk Technol.* 35: 307-310.
61. - Gohil, V. S., Ahmed, M.A., Davies, R. y Robinson, R.K. 1995. Incidence of *Listeria ssp.* In retail food in the United Arab Emirates. *J. Food Prot.* 58: 102-104.
62. - Georgala, D. L. y Hurst, A. 1963. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 26: 346-358.
63. - Gross y Rowe, R.J. 1984. *Shigella* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. and Jolt, J.G. (Eds.). 9th Ed. Baltimore, Wilkinson & Wilkins
64. -Gustafsson I, Sjölund M, y Torell E. 2003. Bacteria with Increased Mutation Frequency and Antibiotic Resistance are Enriched in the Commensal Flora Of Patients with High Antibiotic Usage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52(4):645-650.
65. - Hancock, D.D., Rice, D.H., Thomas, L.A., 1997. Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *J. Food Prot.* 60: 462 – 465.

- 66.- Hall, H.E. y Hauser, C.H. 1966. Examination of feces from food handlers for salmonellae, shigellae, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 14: 928-933.
- 67.- Hara-Kudo, Y., Konuma, H., Iwaki, M., 1997. Potential hazard of radish sprouts as a vehicle of *Escherichia coli* O157:H7. J.Food Prot. 60: 1125 - 1127
- 68.- Harmon, S. M., Kautter, D. A. y Solomon, H. M. 1987. *Bacillus cereus* contamination of seeds and vegetables sprouts grown in home sprouting kit. J. Food Prot. 50: 62-65
69. Heisick, J E., Wagner, D. E., Nierman, M L. y Peeler, J T. 1989. *Listeria spp.* found on fresh market produce. Appl. Environ. Microbiol. 55:1925-1927
- 70.- Hockin, J.C., D'Aoust, J.Y., Bowering, D., 1989. An international outbreak of *Salmonella mima* from imported chocolate. J.Food Prot. 52: 171 – 178.
- 71.-ICMSF., 1980 (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).. Microbial Ecology of Foods. Vol. II. Food Commodities. Acad. Press. N.Y.
- 72.- INDRE., 1991. (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos). Teniasis y Cisticercosis por *Taenia solium*. Publi. Tec. No. 4. México.
- 73.-Infante, D.; A. Leon, C. de NogueraA y C. Quiroz . 1981. Metodología para el diagnóstico Bacteriológico y Serológico de la Salmonelosis Aviar .Instituto de Investigaciones Veterinarias
- 74.- Jaquette, C. B., Beuchat, L. R. y Mahon, B. E. 1996. Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella* Stanley inoculated onto alfalfa seeds and wrowth and survival of the pathogen during sprouting and storage. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2212 – 2215.
- 75.- Jay, M. J. 2000. Indicadores de la calidad e inocuidad microbiana de los alimentos. Microbiología de los alimentos. Zaragoza España, p. 366-369.
- 76.- Jong, B. y Andersson, Y. 1995. *Salmonella* bovis morbificans in alfalfa sprouts. Abstract, Svensk – Veterinartidning. 47 (2): 53.
- 77.- Kampelmacher, E.H. 1963. The role of *Salmonella* in food borne diseases: 84-94. In: Microbial Quality of Foods. Slanetz, L. W., Chichester, C.O., Gaufin, A.R. and Ordal, Z.J. (Eds.) Acad, Press Inc. U.S.A.
- 78.- Karch, H., Russmann, H., Smith, H., 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in diarrheal diseases. J. Clin. Microbiol. 33: 1602 – 1605.

- 79.-** Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hasen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., Jahkola, M., Montenegro, M.A. y Helmuth, R. 1990. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60 megadalton virulence plasmid. *J. Clin. Microb.*, 28: 2597-2601.
- 80.-** Khan, M. R. Saha, M. L. y Kribia, A. H. M. G. 1992. A Bacteriological profile of salad vegetables in Bangladesh with special referente to coliforms. Abstract, *Lett. Appl. Microb.*, 14: 88.
- 81.-** Khurdiya, 1995. Non-thermal Methods for Preservation of Fruits and Vegetables: A Critical Appraisal. *J. Food Technol.* 32 (6): 441 – 452.
- 82.-**Kornacki, J L y Marth, E H. 1982. Fate of nonpathogenic and enteropathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of Colby- like cheese. *J. Food Prot.* 45:310-316
- 83.-** Kuhomen, A. y Pitkaelae, A. 1991. Sprouts seeds- a health hazard?. Abstract. Suomen – ElaeinlaeaeKaerilehti. 97 (12): 574.
- 84.-** Kylene, A. M. y Mc Cready, R. M. 1975. Nutrients in seed and sprouts of alfalfa, lentils, mung beans and soybeans. *J. Food Sci.* 40: 1008 – 1009.
- 85.-**Lal R, Khanna M, Kaur H, Srivastova N, tripathi KK, Lal S. Rifamycins: strain improvement program. *Crit rev Microbiol* 1995; 21(1):19-30.
- 86.-** Lang MM, Ingham BH, Ingham SC.2000. Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. Department of Food Science, University of Wisconsin-Madison, 53706-1565, USA. *J Food Microbiol* 30;58(1-2):73-82
- 87.-** Levine, W.C., Buehler, J.W., Bean, N.H. y Tauxe, R.V. 1991. Epidemiology of nontyphoidal *Salmonella* bacteremia during the human immunodeficiency virus epidemic. *J. Infect. Dis.* 164: 81 – 87.
- 88.-** Leyer, G.L. y Johnson, E.A. 1993. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* ssp in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2075 – 2080.
- 65*.-** Lorenz. 1980. Cereal sprouts: composition, nutritive value, food applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13 : 353 – 385.
- 89.-**Lund, B.M 1992. Ecosystems in vegetable foods. *J. Appl. Bact.* Vol 73 Suplement 21: 115s-135s
- 90.-** Mahon, B.E., Ponka, A., Hall, W.N., 1997. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J.Inf.Dis.* 175: 876 – 882.

- 91.- Marier, R., Wells, J G. y Swanson, R C. 1973. An outbreak of *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. *Lancet* ii:1376-1378
- 92.- Mejía, S. J. 2003. Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.
- 93.- Mickelson, M.N. y Filippim, R.S. 1960. Use of *Salmonellae* antagonists in fermenting egg white. I. Microbial antagonists of *Salmonellae*. *Appli. Microbiol.* 8 : 366-370.
- 94.- Mountney, G J. y Wilbour, A. G. 1971. Fruits and vegetables. In *Practical Food Microbiology and Tecnology*. 3th Ed. AVI, Published by Von Nostrand R. N. Y
- 95.- MMWR., 1997. (Morbidity and Mortality Weekly Report). Outbreaks of *Escherichia Coli* O157:H7 Infection Associated with Eating Alfalfa Sprouts – Michigan and Virginia, June – July 1997. *New Engl. J. Med.* 46 (32) : 741-744
- 96.- Nguyen-the, C. y Carlin, F. 1994. The Microbiology of Minimally Processed Fresh Fruits and Vegetables. *CRI. Rew. Food Sci. Nut.* 34(4): 371 – 400.
- 97.- Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Salud. México.
- 98.- Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número Más Probable. Secretaría de Salud. México
- 99.- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de organismos coliformes totales en Placa. Secretaría de Salud. México.
- 100.- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Secretaría de Salud. México.
- 101.- Noguera. C.*, Dilia Infante*, Antonio León A.*, Nelva R. de Rolo*, Antonio Herrera y Pedro Valdillo., 1992. Estudio de patogenicidad de *Salmonella saint-paul*. *Nacional de Investigaciones Agropecuarias.* , Maracay 2102- Venezuela.
- 102.- Noguera, U.Y., 2005. Frecuencia de *Salmonella*, *E. coli* y organismos coliformes en ensaladas listas para su consumo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos.
- 103.- Odumero, J A., Mitchell, S J., Alves D M., Lynch, J A., Yee, A J., Wang, S L., Styliades, S. y Farber, J.M. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food-services. *J.Food Prot.* 60:954-960

- 104.-** Okuda, S., Aoki, M., Kikuno, R., Nishimura, T. y Nagumo, T. 1994. Preparation of germ-free bean sprout, and identification of bacteria associated with their putrefaction. Abstract, J. Antibact. Antifung. Ag. Jap. 22(12): 711 – 715.
- 105.-** Ó'Mahony, M., Cowden, J., Smyth, B., Lynch, D., Hall, M., Rowe, B., Teare, E. J., Tettmar, E. E., Rampling, A. M., Coles, M., Gilbert, R. J., Kingcott, E. y Barlett, C. L. R. 1990. An outbreak of *Salmonella* saintpaul infection associated with beansprouts. Epidemiol. Infec. 104: 229 – 235.
- 106.-** Park. C.E. y Sanders, G.w. 1990. Source of *Klebsiella pneumoniae* in Alfalfa and Mung Bean Sprouts and Attempts to Reduce its Occurrence. Abstract, Can. Int. Food Sci. Technol. J. 23 : 189 – 192.
- 107.-** Patterson, J. E. y Woodburn, M.J. 1997. *Klebsiella* and other bacteria on alfalfa and bean sprouts at the retail level. J.Food Sci. 45: 492 – 495.
- 108.-** Park, C E., y Sanders G W. 1992. Ocurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetable sold at farmers outdoor markets and supermarkets. *Can J. Microbiol.* 38:313-316
- 108.-** Pelczar, J. M. Microbiología. 2da Ed. 1983. McGraw-Hill.
- 109.-** Piernas, V. y Guiraud, J. P. 1997. Desinfection of Rice Seed Prior to Sprouting. J. Food Sci. 62 : 611 – 615.
- 110.-** Ponka, A., Andersson, Y., Siitonen, A., Jong, B., Jahkola, M., Haikala, O., Kuhomen, A. and Pakkala, P. 1995. *Salmonella* in alfalfa sprouts. Lancet. 345: 462 – 463.)
- 111.-**Portnoy, B L., Goepfert, J M. y Harmon, S M. 1976. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulted from contaminated vegetables sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 103:589-594.
- 112.-** Prokopowich, D. y Blank, G. 1991. Micribiological evaluation of vegetables sprouts and seeds. J. Food Prot. 54: 560 – 562.
- 113.-** .-Propiedades de la soya, consulta web., 2003
<http://www.solae.com/company/sp/soyessentials/soyessentials.html>
- 114.-** Ranhota, G. S., Loewe, R. J. y Lehmann, T. A. 1977 Breadmaking quality and nutritive value of sprouted wheat. J. Food Sci. 42: 1373 – 1375.
- 115.-** Robinson, I. y Adams, R. P. 1978. Ultraviolet treatment of contaminated irrigation water and its effect on the bacteriological quality of celery at harvest. J. Appl. Bacteriol. 45: 83-86.

- 116.-**Robins y Browne, M R. 1987. Traditional enterotrophatogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Inf. Dis.* 9:28-53
- 117.-** Rojas, O. M., 2005. Comportamiento de tres grupos patógenos de *Escherichia coli* en cuatro grupos de verduras crudas. Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos
- 118.-** Schlech W F., Lavigne, P M., Bostoulussi, R A., Allen, A C., Haldane, E V., Wort, A J., Hightower, A W., Johnson, S E., King, S.H., Nicholls, E.S y Broome, V. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, 308:203-206
- 119.-** Sepúlveda, J. 1993. Epidemiología y cólera: 169 – 184. En : El Cólera, epidemias, endemias y pandemias. Kumate, J, Sepúlveda, J. y Gutiérrez, G. (Eds.) Infomación Profesional Especializada, México.
- 120.-** Shapiro, J. E. y Holder, I. A. 1960. Effect of antibiotic and chemical dips on the microflora of packaged salad mix. *Appl. Microbiol.* 8 : 341 – 345.
- 121.-**Slutsker, L. 1997. An international outbreak of *Salmonella* infectionscaused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Journal ofInfectious Diseases* 175: 876.
- 122.-** Stewart D, Reineke K, Ulaszek J, Fu T, Tortorello M., 2001. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 during sprouting of alfalfa seeds. *Lett Appl Microbiol* 33:95 – 99
- 123.-** Subba, M. S., Soumithri, T.C. y Suryanarayanara Rao, R. 1967. Antimicrobial action of citrus oil. *J. Food Sci.* 32: 225 – 227.
- 124.-** Taormina PJ, Beuchat LR., 1999. Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatments with various chemicals. *J Food Prot* 62:850 - 856
- 125-** Thaysen, A. C. y Galloway, L.D. 1992. “The Microbiology of Starch and Sugars” p.191. Oxford Univ. Press, New Cork. En: “Fruits and Vegetables”. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd (ed). American Public Health Assoc. Washington.
- 126.-** Torres, M. R., Rodríguez, M. O., Navarro, H. V. y Martínez, N. 1996. El consumo de frutas puede ser de alto riesgo para la salud. Laboratorio de Microbiología Sanitaria del CUCEI. Gaceta Universitaria. Guadalajara, Jal, México.
- 127.-**USDA., 1969 (U.S. Department of Agriculture and Food and Drug Administration.). An Evaluation of the *Salmonella* Problem. Nat. Acad. Sci. Washington, D.C.
- 128.-**Vahidy R. 1992. Isolation of *Listeria* from fresh fruits and vegetables (abstract). *Hort Science*, 27:628

- 129.- Vanderzant, C. y Splittstoesser, D.F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd ed. American Public Health Assoc. Washington.
- 130.-Vázquez Salinas, C., Quiñones Ramírez, E., y Lugo de la Fuente, G.1996. Investigación de *Vibrio cholerae* en hortalizas que se consumen crudas en la Ciudad de México. XIII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los alimentos. Guadalajara, Jal, México.
- 131.- Webb, T A. y Mundt, J O. 1978. Molds on vegetables at the time of harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:655-658
- 132.-Wei H, Bowen R y Cai Q, 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*;208:124–9.
- 133.- Whyte, K. C. 1973 The Complete Sprouting Cookbook, Troubador Press, San Francisco. En : Klaus Lorenz. 1980. Cereal sprouts : Composition, Nutritive Value, Food Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13: 353 – 385.
- 134.- Wu FM, Beuchat LR, Wells JG, Slutsker L, Doyle MP, y Swaminathan B.2001. Factors influencing the detection and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J Food Microbiol.*71: 93 – 99.
- 135.- Yildiz, F. 1994. Inicial preparation, handling, and distribution of minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: Minimally Processed Refrigerated Fruits & Vegetables. Ed. Wiley, R.C. Chapman & Hall, New York
- 136.- Zepeda-López H., Ortega-Rodríguez, E. Quiñonez-Ramírez y Vázquez-Salinas, C. 1995. Isolation of *Escherichia choli* O157:H7 from vegetables. *Annu.Mtg.Am. Soc. Microbiol.* (abstracts). Washington D.C
- 137.- Zhi-Dong, Mathewson J., Ericsson C., Svennerholm, pulido C. y Dupont. 2000 .Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains in Patients with Traveler’s Diarrhea Acquired in Guadalajara, México, 1992-1997. *The Jorurnal of Infectious Disceases*; 181:779-82

VII. ANEXO
Coliformes Totales, Coliformes Fecales y *E. coli* por muestra

# de muestra	Coliformes Totales	Coliformes Fecales	<i>E. coli</i>
	UFC/gr	NMP	NMP
1	1.59X10 ⁴	20	3.6
2	3.99 X10 ⁴	120	6.1
3	6.78 X10 ⁴	43	3
4	4.56 X10 ⁴	21	3.6
5	7.32 X10 ⁴	<3	<3
6	2.84 X10 ⁴	28	14
7	3.77 X10 ⁴	26	3.6
8	4.30 X10 ⁴	20	9.2
9	5.35 X10 ⁴	<3	<3
10	3.65 X10 ⁴	15	3
11	5.69 X10 ⁴	64	7.3
12	3.36 X10 ⁴	15	9.1
13	4.18 X10 ⁴	210	6.2
14	3.34 X10 ⁴	26	23
15	8.40 X10 ⁴	28	27
16	5.92 X10 ⁴	15	11
17	7.08 X10 ⁴	6.1	210
18	8.34 X10 ⁴	39	20
19	7.31 X10 ⁴	75	93
20	1.07 X10 ⁵	120	53
21	4.20 X10 ⁴	39	15
22	3.89 X10 ⁴	12	9
23	2.79 X10 ⁴	39	15
24	3.17 X10 ⁴	20	16
25	2.46 X10 ⁴	120	53
26	1.16 X10 ⁴	15	42
27	1.43 X10 ⁴	93	35
28	5.25 X10 ⁴	24	150
29	1.26 X10 ⁴	28	12
30	1.15 X10 ⁴	15	210
31	1.18 X10 ⁴	27	460
32	9.45 X10 ³	460	290
33	2.14 X10 ⁴	16	1,100.00
34	1.28 X10 ⁴	35	290
35	1.07 X10 ⁴	36	150
36	1.37 X10 ⁴	93	7.3
37	1.18 X10 ⁴	1100	3.6
38	1.03 X10 ⁴	>1100	9.3
39	1.53 X10 ⁴	160	3.6

40	7.56X10 ³	>1100	<3
41	1.43 X10 ⁴	>1100	<3
42	1.34 X10 ⁴	1100	3
43	1.27 X10 ⁴	24	<3
44	8.19X10 ³	93	3.6
45	2.30 X10 ⁴	210	36
46	6.38 X10 ⁴	460	460
47	1.58X10 ³	240	28
48	1.22 X10 ⁴	460	7.2
49	8.35X10 ³	240	7.3
50	2.69 X10 ⁴	43	15
51	5.32 X10 ⁴	43	15
52	7.36X10 ⁵	43	11
53	2.65X10 ⁵	240	11
54	6.35 X10 ⁴	21	3
55	9.24X10 ³	75	36
56	1.34 X10 ⁴	29	21
57	1.28 X10 ⁴	21	6.2
58	7.35X10 ³	1100	20
59	1.76 X10 ⁴	34	15
60	4.01 X10 ⁴	11	1,100.00
61	4.28 X10 ⁴	34	1,100.00
62	3.91 X10 ⁴	15	1,100.00
63	2.21 X10 ⁴	19	1,100.00
64	3.13 X10 ⁴	75	1,100.00
65	3.11 X10 ⁴	20	1,100.00
66	3.78 X10 ⁴	35	6.1
67	3.45 X10 ⁴	150	7.3
68	3.86 X10 ⁴	12	6.1
69	2.90 X10 ⁴	20	9.3
70	3.99 X10 ⁴	42	19
71	3.70 X10 ⁴	290	290
72	3.60 X10 ⁴	240	21
73	2.48 X10 ⁴	42	20
74	3.82 X10 ⁴	460	28
75	3.11 X10 ⁴	16	12
76	3.55 X10 ⁴	29	3
77	3.80 X10 ⁴	9.1	13
78	3.61 X10 ⁴	9.3	36
79	4.26 X10 ⁴	64	240
80	2.54 X10 ⁴	7.3	9.2
81	3.15 X10 ⁴	3	20
82	2.88 X10 ⁴	11	44
83	3.21 X10 ⁴	36	6
84	3.30 X10 ⁴	9	3
85	3.00 X10 ⁴	12	3
86	2.63 X10 ⁴	3	6.1

87	3.21×10^4	3	7.3
88	2.50×10^4	11	3
89	2.30×10^4	43	3.6
90	2.54×10^4	7.3	20
91	2.47×10^4	15	11
92	2.39×10^4	21	15
93	9.11×10^4	16	3
94	1.46×10^5	12	6
95	9.11×10^4	29	15
96	1.62×10^5	43	20
97	1.59×10^4	35	15
98	1.68×10^4	28	15
99	2.90×10^4	93	15
100	3.38×10^4	16	7.3

