

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



PRESENCIA DE *Escherichia coli* 0157:H7 EN VEGETALES DE CONSUMO.

**Tesis**

Que presenta MARIEL GUADALUPE MIRELES VÁZQUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN  
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Noviembre, 2016

PRESENCIA DE *Escherichia coli* 0157:H7 EN VEGETALES DE CONSUMO.

**Tesis**

Elaborada por MARIEL GUADALUPE MIRELES VÁZQUEZ como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



M. C. Abiel Sánchez Arizpe  
Asesor Principal



Dr. Armando Robledo Olivo  
Asesor



Dra. María Elizabeth Galindo Cepeda  
Asesora



Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán  
Asesor Externo



Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Noviembre 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme los medios para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por abrirme sus puertas, arroparme y hacerme sentir como en casa desde el primer día.

A la Facultad de Ciencias Químicas, por brindarme las bases para poder ingresar a la maestría, y ahora por colaborar conmigo para poder terminar este proceso.

A mis maestros, por todo lo nuevo que me enseñaron, por todos los consejos recibidos, por todo lo que me compartieron.

Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe, que fungió como mi asesor principal. Que desde el primer día me brindo todo su apoyo. Gracias por su tiempo y disposición en todo momento.

A la Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por su amabilidad y dedicación. Gracias por su atención y su gran profesionalismo.

Al Dr. Armando Robledo Olivo, de quien siempre recibí un gran apoyo. Quien a la hora que fuera estaba dispuesto a aclarar las dudas que surgía. Gracias por todo el apoyo en todo momento.

Al Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santilla. Quien desde mi educación profesional me brindó todo su apoyo. Gracias por ser parte fundamental en este proceso.

A la Dra. Erika Janeth Acosta Cruz, por su apoyo en las cuestiones moleculares que implicó este trabajo.

## DEDICATORIAS

Primero que nada quiero agradecer a Dios que me brindó los medios para poder estudiar esta maestría.

A mi familia que siempre estuvo conmigo en todo el proceso, que me animo a no desertar, que me dio todos los medios para que pudiera salir adelante.

A mi esposo Favian y mi hija Ana Mariel. Esto es por ustedes, para un mejor futuro, para darles lo mejor. Gracias mi amor por todo el apoyo, te amo y eres el amor de mi vida. Annie, mi niña hermosa, esto es para ti, para que siempre te sientas orgullosa de tu mami. Te amo. Los amo.

A mi mamá, gracias por todo lo que me ayudaste. Gracias por todas las veces que me apoyaste, que me escuchaste. Esto es gracias a ti, que desde pequeña me inculcaste el valor del estudio.

A mi abuelita Cruzita, gracias por las palabras de aliento día con día que me impulsaban a seguir adelante.

A mi Tía Coco, que gracias a ella decidí ser Química, y entrar a estudiar a esta hermosa Universidad.

A César y Orlando, que aunque no lo demuestren sé que siempre podré contar con ustedes.

A Dianita, que siempre estuvo a mi lado para orientarme y escucharme. Gracias amiguita, no sabes lo mucho que te quiero y aprecio nuestra amistad.

A Felipe, Rocío y Eunice, que siempre que tenía un mal momento estaban cerca de mí y me hacían olvidarlo.

A mis compañeros y amigos del programa de Parasitología Agrícola. Gracias a Alicia, Martita, Aideé, Agustín, Mayo, por su gran apoyo en todo momento.

Y principalmente esto es un homenaje para el hombre de mi vida, que sé que desde arriba siempre está pendiente de mí, para ti abuelito. Te quiero mucho.

## ÍNDICE GENERAL

|  |     |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTOS.....   | i   |
| DEDICATORIAS.....  | ii  |
| ÍNDICE GENERAL.....  | iii |
| LISTA DE FIGURAS.....  | v   |
| LISTA DE TABLAS.....   | vi  |
| RESUMEN.....   | vii |
| ABSTRACT.....  | ix  |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| OBJETIVOS.....   | 3   |
| HIPÓTESIS.....   | 4   |
| REVISIÓN DE LITERATURA.....  | 5   |
| ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....                         | 5   |
| TRIÁNGULO DE LA ENFERMEDAD.....                                      | 7   |
| MICROBIOLOGÍA DE HORTALIZAS.....                                     | 7   |
| CONTAMINACION DE HORTALIZAS.....                                     | 8   |
| MICRORGANISMOS INDICADORES.....                                      | 10  |
| ORGANISMOS COLIFORMES.....   | 11  |
| ENTEROBACTERIAS.....   | 12  |
| <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....  | 12  |
| □ Generalidades.....   | 13  |
| □ Sobrevivencia.....   | 13  |
| □ <i>E. coli</i> patógena.....                                       | 14  |
| □ <i>E. coli</i> enteropatógena.....                                 | 14  |
| □ <i>E. coli</i> enterotoxigénica.....                               | 14  |
| □ <i>E. coli</i> enteroinvasiva.....                                 | 15  |
| □ <i>E. coli</i> enterohemorrágica.....                              | 15  |
| □ Enfermedades asociadas al consumo de <i>Escherichia coli</i> ..... | 15  |
| □ <i>E. coli</i> en verduras.....                                    | 17  |
| □ Factores que afectan el comportamiento de <i>E. coli</i> .....     | 18  |
| LECHUGA.....   | 18  |
| □ Generalidades.....   | 18  |

|   |    |
|---|----|
| □ Producción.....   | 19 |
| □ Valor nutritivo.....  | 20 |
| CILANTRO .....  | 21 |
| □ Generalidades .....   | 21 |
| □ Producción.....   | 22 |
| □ Valor nutritivo.....  | 22 |
| PEREJIL.....  | 22 |
| □ Generalidades .....   | 22 |
| □ Producción.....   | 23 |
| □ Valor nutritivo.....  | 23 |
| REPOLLO.....  | 24 |
| □ Generalidades .....   | 24 |
| □ Producción.....   | 25 |
| □ Valor nutritivo.....  | 25 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 27 |
| Ubicación del experimento .....   | 27 |
| Recolección de las muestras.....  | 28 |
| Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales,<br>fecales y E. coli por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos<br>para consumo humano y agua ..... | 28 |
| Prueba presuntiva .....   | 29 |
| Prueba confirmativa .....   | 29 |
| Análisis bioquímico.....  | 29 |
| Conservación y evaluación molecular de las cepas obtenidas.....   | 34 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 36 |
| Análisis microbiológico .....   | 36 |
| Análisis bioquímico.....  | 38 |
| Análisis molecular.....   | 39 |
| CONCLUSIONES .....  | 41 |
| REFERENCIAS .....   | 42 |

## **LISTA DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismos de contaminación de frutas y hortalizas.....          | 8  |
| Figura 2. Producción mundial de lechuga y achicoria para el año 2011 ..... | 19 |
| Figura 3. Ubicación del sitio de estudio. ....                             | 27 |
| Figura 4. Esquema de identificación para bacilos Gram negativos.....       | 33 |
| Figura 5 Esquema de Identificación de Enterobacterias .....                | 34 |
| Figura 6. Incidencia de coliformes totales en 4 vegetales verdes.....      | 36 |
| Figura 7 Resultados de las pruebas bioquímicas según el manual de Bergey . | 38 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Ejemplos de brotes de ETAs asociados al consumo de frutas y verduras en EEUU .....   | 16 |
| Tabla 2. Clasificación taxonómica de la lechuga. ....   | 19 |
| Tabla 3. Valor nutricional de la lechuga en 100g de sustancia .....                           | 21 |
| Tabla 4. Clasificación Taxonómica del Cilantro. ....  | 22 |
| Tabla 5. Clasificación taxonómica del perejil. ....   | 23 |
| Tabla 6. Información nutrimental del cilantro .....   | 24 |
| Tabla 7. Clasificación taxonómica del repollo .....   | 24 |
| Tabla 8. Información nutrimental del repollo .....  | 26 |
| Tabla 9. Pruebas Bioquímicas utilizadas para la identificación bacteriana en el KIT API. .... | 30 |
| Tabla 10. Pruebas bioquímicas que necesitan ser reveladas. ....                               | 31 |
| Tabla 11. Identificación de pruebas bioquímicas en el KIT API. ....                           | 32 |
| Tabla 12. Resultados del primer muestreo realizado en Junio del 2015.....                     | 37 |
| Tabla 13. Resultados del segundo muestreo realizado en Julio del 2015. ....                   | 37 |
| Tabla 14. Resultados del tercer muestreo realizado en Agosto del 2015. ....                   | 37 |



## RESUMEN

PRESENCIA DE *Escherichia coli* 0157:H7 EN VEGETALES DE CONSUMO.

POR

MARIEL GUADALUPE MIRELES VÁZQUEZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE-ASESOR-

SALTILLO, COAHUILA

NOVIEMBRE 2016

Los alimentos son parte fundamental en las necesidades fisiológicas humanas, sin embargo contribuyen en un alto porcentaje a las enfermedades transmitidas por alimentos. Por este motivo se ha puesto mayor atención en las normas de inocuidad alimentaria.

Uno de los patógenos de mayor problema es la cepa de *Escherichia coli* 0157:H7, productora de la toxina Shiga. El cual se transmite principalmente por medio de heces fecales de los rumiantes y es una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales.

Los esfuerzos para solucionar el problema del incremento en enfermedades transmitidas por alimentos, impulsó una nueva colaboración entre las comunidades científicas de patología vegetal e inocuidad alimentaria.

Este trabajo se realizó bajo la NOM-109-SSA1-1994 y NOM-210-SSA-2014. Se hicieron muestreos de Junio a Agosto de 2015 en tres establecimientos de la ciudad de Saltillo, Coahuila.

Se realizaron los trabajos de microbiología en laboratorios del departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Coahuila. Donde se obtuvieron cepas con morfología característica, bacilos cortos Gram negativos.

Posteriormente las muestras fueron conservadas en solución de glicerol al 10% y enviada al laboratorio Macrogen para su estudio molecular. En donde se encontró la presencia de enterobacterias como *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca*.

**Palabras claves:** Inocuidad alimentaria, *Escherichia coli*, patología vegetal.

**ABSTRACT**

PRESENCE OF *Escherichia coli* 0157: H7 IN VEGETABLE CONSUMPTION.

BY

MARIEL GUADALUPE MIRELES VÁZQUEZ

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE-ASESOR

SALTILLO, COAHUILA

NOVEMBER 2016

Food is a fundamental part of human physiological needs, however they contribute a high percentage of foodborne diseases. For this reason it has placed greater attention on food safety standards.

One of the biggest problem is pathogenic strain of *Escherichia coli* O157: H7, which produces Shiga toxin. Which it is mainly transmitted through feces of ruminants and is a major cause of gastrointestinal diseases.

Efforts to solve the problem of increase in foodborne illness, boost a new collaboration between the scientific communities of food safety and plant pathology.

This work was performed under the NOM-109-SSA1-1994 and NOM-210-SSA-2014. Sampling from June to August 2015 were made in three establishments in the city of Saltillo, Coahuila.

The microbiology studies were made in laboratorios of Parasitology Department at Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro and in the Facultad de Ciencias Químicas at Universidad Autónoma de Coahuila. The strains showed characteristic morphology: Gram negative and short bacilli.

The samples were kept in solution 10% glycerol and sent to the laboratory Macrogen for molecular study. Wherein the presence of enterobacteriaceae was found as *Klebsiella* and *Escherichia coli*.

**Keywords:** Food safety, *Escherichia coli*, plant pathology.

## INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras tienen innumerables beneficios para la salud humana, por lo que su consumo se ha incrementado en los últimos años, pero frecuentemente se consumen sin procesar, por lo que se han asociado a brotes por enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos se han incrementado en los últimos años. En los países subdesarrollados estas enfermedades son causadas por la contaminación en frutas y vegetales. En México anualmente se notifican aproximadamente 20 brotes al año con unos 1000 afectados.

Principalmente *Escherichia coli* se ha vinculado con este tipo de enfermedades, ya que se ha logrado aislar de verduras de hoja verde, melones, coles, bayas, tomates y cebollas.

La incidencia de este tipo de microorganismos en las hortalizas es un indicativo de la calidad sanitaria de las fases de tratamiento y el estado microbiológico en el producto crudo en el momento de tratarlo. Muchos microorganismos patógenos poseen la capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en frutas y hortalizas.

La contaminación de hortalizas se ha reconocido como un problema de salud pública, ya que su consumo es vital para la salud humana por los amplios beneficios vitamínicos. Pero su manera de ser cultivados los hace más susceptibles a estos microorganismos, por lo que se vuelve necesario realizar estudios de vigilancia del estado de agua principalmente.

*Escherichia coli* es una enterobacteria, que se considera un microorganismo indicador de calidad microbiana. Es ampliamente usada en la investigación por su rápido crecimiento y lo fácil que es su cultivo. No se ha reconocido por ser patógeno de plantas, sin embargo puede sobrevivir en las plantas y penetrar en los tejidos vegetales y mantener su población causando graves brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Por lo mencionado anteriormente se vuelve indispensable realizar un estudio de control de calidad en cuatro hortalizas de hoja verde como es el caso de lechuga,

cilantro, perejil y repollo, con el fin de determinar el nivel de inocuidad de estos productos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detección de cepas de *Escherichia coli* en cuatro vegetales verdes.

### **Objetivos específicos**

Detección tradicional de cepas de *Escherichia coli* en vegetales comestibles como lechuga (*Lactuca sativa*), cilantro (*Coriandrum sativum*), perejil (*Petroselinum crispum*) y repollo (*Brassica oleracea* var. *Capitata*).

Confirmación molecular de cepas de *Escherichia coli* en vegetales comestibles como lechuga (*Lactuca sativa*), cilantro (*Coriandrum sativum*), perejil (*Petroselinum crispum*) y repollo (*Brassica oleracea* var. *Capitata*).

## HIPÓTESIS

Existe la presencia de enterobacterias como *Escherichia coli* en cuatro vegetales verdes (lechuga, cilantro, perejil y repollo) de tres establecimientos de la ciudad de Saltillo, Coahuila.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### Enfermedades transmitidas por alimentos

Las frutas y verduras tienen innumerables beneficios para la salud humana, esto ha llevado a que su consumo sea mayor en los últimos años. El aumento en el consumo de estos alimentos, se ha relacionado con el aumento de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), esto ha provocado que las autoridades sanitarias consideren estas patologías como un gran problema de salud pública (University of Maryland, 2002).

Las frutas y las verduras frecuentemente se comen sin procesar, ya que son importantes para una dieta saludable, pero por esta razón se han asociado a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Lynch *et al.*, 2009).

El consumo de verduras crudas constituye un mecanismo potencial de transmisión de *E. coli*, especialmente en países con elevada tasa de parasitosis intestinal (Fernández, 2000).

Las ETA han aumentado en los últimos años (University of Maryland, 2002). En los países subdesarrollados estas enfermedades son causadas por la contaminación en frutas y vegetales, pero debido a la inexistencia en registros sanitarios se carecen de estadísticas.

El número de casos serios de contaminación de alimentos asociada a muertes se ha incrementado en los últimos años, por lo que lo vuelve un importante problema de salud pública. Se estima que en Estados Unidos ocurren 76 millones de casos de enfermedades por alimentos al año (CDC, 2010).

En México se notifican aproximadamente 20 brotes al año con unos 1,000 afectados. En nuestro país, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica solo distingue una categoría en relación a enfermedades transmitidas por alimentos, la intoxicación bacteriana, sin embargo, específicamente no están reportadas las enfermedades transmitidas por alimentos, ninguna de las otras enfermedades gastrointestinales, ni las enfermedades que producen otros cuadros clínicos cuyo vehículo de transmisión son los alimentos. Considerando que se estima que existen unas 400 enfermedades distintas que pueden ser

transmitidas por alimentos es evidente que el impacto de estas enfermedades en la salud pública en nuestro país se desconoce (Fernández, 2001).

Particularmente *Escherichia coli* se encuentra dentro de los principales causantes de enfermedades asociadas al consumo de vegetales frescos (Warriner y Namvar, 2010).

Frecuentemente estas enfermedades se han asociado con verduras de hoja verde, melones, coles, bayas, tomates y cebollas. Los brotes relacionados con la toxina llamada Shiga, producida por *Escherichia coli* 0157:H7 se la vinculado con el consumo de lechuga y espinaca (Heuer *et al.*, 2011; Hilborn *et al.*, 1999). Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en México. Mundialmente, son una de las causas más importantes de mortalidad entre los lactantes y niños (Hernández, 2011). En el año 2002 el Sistema Nacional de Información en Salud reportó a nivel nacional 3,612 casos de intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano (Fuentes *et al.*, 2005).

Las bacterias patógenas de humanos generalmente son oportunistas y facultativas. Estas causan enfermedades principalmente en paciente inmunocomprometidos, que sufren fibrosis quística o infectados de VIH (Parke y Gurian-Sherman, 2001; Steinkamp *et al.*, 2005).

Este tipo de bacterias ha sido el causante de aproximadamente el 45% de las enfermedades adquiridas en hospitales en Europa. Solamente en Alemania son causantes de un millón de enfermedades por año, y 40 000 personas infectadas han muerto (Vicent *et al.*, 1995).

Desde la aparición de los brotes causados por enfermedades entéricas asociadas con la contaminación de frutas y verduras, los patógenos de humanos en plantas han sido el foco de atención en muchos estudios (Brand, 2006; Lynch *et al.*, 2009).

Los recientes esfuerzos para solucionar el problema de la contaminación microbiana en los alimentos y por consiguiente las enfermedades transmitidas por alimentos ha impulsado una nueva colaboración entre las comunidades de patología vegetal e inocuidad alimentaria (Fletcher *et al.*, 2013).

### **Triángulo de la enfermedad**

Es conocido como el dogma central de la patología vegetal. Este triángulo indica el desarrollo de la enfermedad de las plantas, así como sus tres componentes: i) el patógeno debe ser virulento en una especie en particular de la planta y cultivar; ii) el huésped de la planta debe ser susceptible de una cepa especial; y iii) las condiciones ambientales de temperatura, humedad, y la disponibilidad de nutrientes para el patógeno debe ser la adecuada tanto para la supervivencia del patógeno y las interacciones al conducir la enfermedad (Fletcher *et al.*, 2013).

### **Microbiología de hortalizas**

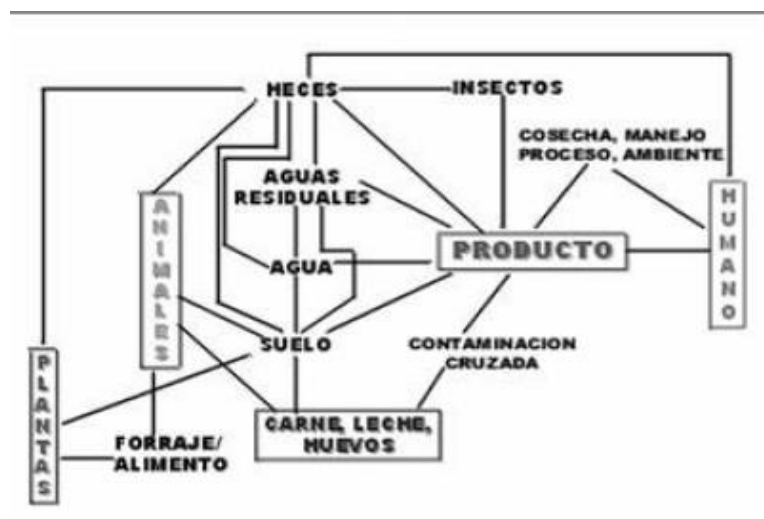
Debido a que los patógenos bacterianos forman parte del medio ambiente, las frutas y verduras pueden contaminarse fácilmente si no se manipulan adecuadamente antes de su consumo. Un sinnúmero de microorganismos se ha logrado aislar de una gran variedad de frutas y verduras. Se han registrado brotes de enfermedad asociadas al consumo de hortalizas cuya etiología ha sido microbiana (Bryan, 1977).

La incidencia de microorganismos en las hortalizas es un indicativo de la calidad sanitaria de las fases de tratamiento y el estado microbiológico en el producto crudo en el momento de tratarlo. Muchos microorganismos patógenos poseen la capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en frutas y hortalizas frescas (Badaway *et al.*, 1985).

Las hortalizas frescas llevan una flora microbiana superficial constituida principalmente por saprófitos del suelo, esporas fúngicas transportadas por el aire y por microorganismos parásitos de los vegetales. Las hortalizas se ofrecen a la venta en supermercados lavadas, peladas y troceadas. Estas manipulaciones sirven como frecuencia para extender los microorganismos por toda la superficie del producto (Roberts *et al.*, 2000).

## Contaminación de hortalizas

Una gran variedad de factores contribuyen a la contaminación de frutas y hortalizas por microorganismos causantes de enfermedades a los humanos (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos de contaminación de frutas y hortalizas.

Fuente: Beuchat, 1996

Algunos factores que pudieran considerarse de riesgo en la calidad microbiológica de los productos frescos incluyen: el uso de agua de riego contaminada con heces de humanos y animales, procesos inadecuados en los campos de cultivo, prácticas deficientes de desinfección, condiciones inapropiadas durante empaque, higiene deficiente de los trabajadores, y el mal manejo durante el almacenamiento y transporte (Badaway *et al.*, 1985).

Una vez que la contaminación ocurre, muchos microorganismos patógenos poseen la capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en frutas y hortalizas frescas (Badaway *et al.*, 1985). Algunos microorganismos también son capaces de sobrevivir a procesos de desinfección, e incluso multiplicarse en el producto durante el almacenamiento (Berrang *et al.*, 1989).

La contaminación de los productos puede ocurrir en cualquier parte de la cadena alimenticia, siendo el agua de riego una de las fuentes de contaminación más importantes (Cooley *et al.*, 2007). La humedad constante y las temperaturas cálidas, juegan un papel importante en el crecimiento de bacterias patógenas

humanas, tales como *E. coli* (Andrews *et al.*, 1982; Castro-Rosas y Escartin, 2000; Gandhi *et al.*, 2001; Hara-Kudo *et al.*, 1997; Inami y Moler, 1999).

La presencia de bacterias patógenas afecta la inocuidad de frutas y hortalizas frescas y se constituye en problemas de salud humana. La falta de inocuidad se refleja en una alta incidencia de brotes de gastroenteritis e implicaciones clínicas de mayor importancia en quienes consumen estos productos. Se ha reportado que la frecuencia de infecciones asociadas al consumo de frutas y hortalizas frescas es mayor en restaurantes establecidos y de comida rápida, esto es resultado de la inadecuada manipulación de los productos frescos, además de la contaminación por parte de las superficies donde se preparan los alimentos (Webb *et al.*, 1978).

Existen diversas etapas en las que se puede afectar la inocuidad de los alimentos. Los brotes de *Escherichia coli* se han asociado en su gran mayoría al deficiente manejo de los alimentos por parte de las personas que realizan la preparación de alimentos (Díaz *et al.*, 1999). La temperatura de almacenamiento constituye un factor principal para el desarrollo de bacterias en los alimentos, como es el caso de las verduras (Castro Del Campo *et al.*, 2004).

La contaminación de hortalizas se ha reconocido como un potencial problema de salud pública (Geldreich y Bordner, 1970; Gould, 1973). Su consumo es vital para la salud humana por sus amplios beneficios, ya que es una gran fuente de vitaminas, minerales, fibra y energía (García *et al.*, 2002). Pero su manera de ser cultivados los hace más susceptibles a estos microorganismos, por lo que se vuelve necesario realizar estudios de vigilancia del estado de agua, principalmente (García *et al.*, 2002; Blumenthal *et al.*, 2000; Pajares, 2004).

Se ha demostrado la participación de artrópodos y otros animales como vectores de patógenos de las plantas, ya que existe una gran evidencia de que estas especies de insectos se mueven libremente entre los terrenos ganaderos y campos de producción.

Experimentos de laboratorio han demostrado que la mosca doméstica puede recoger *E coli* 0157:H7 a partir de estiércol contaminado y depositarlo en la

superficie de las plantas comestibles, donde las bacterias pueden colonizar y multiplicarse (Talley *et al.*, 2009).

### **Microrganismos indicadores**

Los denominados microorganismos indicadores de la calidad microbiana o indicadores de la durabilidad, son organismos, o productos metabólicos de éstos, cuya presencia en determinados niveles en los alimentos se utiliza para evaluar la calidad del alimento o para predecir la durabilidad del mismo (Jay, 2002). Los indicadores son específicos para cada producto, pero en general deben satisfacer los siguientes criterios: deben estar presentes y ser detectables en todos los alimentos cuya calidad debe ser evaluada, su multiplicación y cantidad deben ser inversamente proporcionales a la calidad del producto, se deben poder detectar y contar de manera fácil y en poco tiempo, debe ser posible diferenciarlos de otros organismo y su proliferación no puede ser interferida por la flora normal del alimento en estudio (Jay, 2002).

Los indicadores de inocuidad deben tener antecedentes de asociación con el patógeno cuya presencia tienen que indicar y estar presentes cada vez que aquel lo haga. También deben desaparecer simultáneamente con el patógeno y estar ausentes en los alimentos que estén exentos de éste (Jay, 2002).

Entre los indicadores más usados se encuentran los coliformes, representados habitualmente por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Jay, 2002). La principal bacteria de este grupo es *Escherichia coli* cuya presencia en los alimentos indica una posible contaminación fecal por lo cual el consumidor en caso de ingerir ese alimento podría ser expuesto a bacterias entéricas (Haller *et al.*, 2009; Enviroment Agency, 2002). *E. coli* reúne las condiciones del indicador ideal de contaminación fecal, ya que se encuentra universalmente presente en las heces y en las aguas residuales, no pueden crecer en las aguas naturales y es fácilmente detectable por métodos rápidos (Envimoment Agency, 2002). Muchas cepas de *E. coli* son causantes de enfermedad en humanos y animales. La detección de

contaminación fecal se debe realizar de forma rápida y precisa para proteger la salud humana y el medio ambiente (Paruch *et al.*, 2012).

### **Organismos coliformes**

Los organismos coliformes son bacilos gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que producen gas y ácido a partir de lactosa dentro de 24-48 horas de incubación a 35°C (APHA, 1992; Fernández, 1981).

Los coliformes termotolerantes forman un grupo microbiano más reducido que el de los organismos coliformes totales al cual pertenecen los termotolerantes. Este grupo está formado por aquellos microorganismos con características semejantes a las que presentan los organismos denominados coliformes totales, la única diferencia es que los termotolerantes fermentan lactosa con producción de gas a 44-45°C dentro de las 24-48 horas de incubación. Dentro de los coliformes termotolerantes se encuentra *E. coli* (Fernández, 1981).

Cuando se intentaba aislar el agente del cólera en 1885, Escherich aisló y estudió el microorganismo que en la actualidad se conoce como *Escherichia coli*. En un principio se denominó *Bacterium coli commune* porque se encontraba presente en las heces de todos los enfermos examinados. Schardinger fue el primero que propuso el uso de este organismo como índice de contaminación fecal porque se podía aislar e identificar con mayor facilidad que cualquiera de los patógenos transmitidos por las aguas (James, 2002).

Estos ponen en evidencia una exposición a la contaminación fecal o animal (coliformes fecales en bivalvos), sugieren que se han dado facilidades para que ocurra o esté ocurriendo algún grado de actividad microbiana (bacterias mesófilas aerobias en alimentos perecederos), constituyen evidencia de contaminación posterior a la aplicación de tratamientos térmicos (coliformes en la leche), su concentración y los productos de su metabolismo indican falta de frescura (trimetil amina en pescado) y son indicadores de un riesgo potencial a la salud (Fernández, 2000).

La detección de microorganismos coliformes se usa como un indicador de la calidad sanitaria del agua, o como indicador general de las condiciones higiénicas

del ambiente en un área de procesamiento de alimentos, además de indicar la posibilidad de haber ocurrido una contaminación posterior a la etapa de eliminación de microorganismos en alimentos (Lecea, 2009). Los coliformes son bacterias entéricas, es decir, que viven en el intestino de animales, que fermentan la lactosa a una temperatura de 35° C o 37°C, con producción de ácido y gas en un período de 24 a 48 hrs (OPS, 1988).

Los grupos microbianos indicadores de mayor aplicación en los alimentos son las bacterias mesófilas aerobias, los organismos coliformes, los coliformes fecales, *E. coli*, hongos, levaduras, las bacterias psicrótrofas, los termodúricos, los termófilos, los proteolíticos y lipolíticos, los osmotolerantes y los acidúricos (Fernández, 2000).

Los miembros del grupo coliforme proliferan abundantemente en los medios de cultivo simple. Sus demandas nutricionales son satisfechas sin necesidad de recurrir a compuestos especialmente complejos (Fernández, 1981)

### **Enterobacterias**

Se ha reportado el aislamiento de enterobacterias en vegetales como espárrago, apio, brotes de soja, alfalfa, brócoli, lechuga, coliflor, cilantro, repollo, coles de Bruselas, perejil, zanahoria y rábano (Beuchat, 2008; Hedberg *et al.*, 1994; Potter *et al.*, 1997; Arce *et al.*, 2002; Arias y Antillón, 2000; Beuchat y Ryu, 1997; Buck *et al.*, 2008; CESCO, 2000; Giese, 2003; Monge *et al.*, 1996; European Commission, 2008; Sahoo *et al.*, 2001; The world of food Science, 2008).

Los patógenos bacterianos asociados con los alimentos han sido muy bien descritos por la *Food and Drug Administration* en el *FDA/CFSAN Bad Bug Book* (FDA, 202) *Escherichia coli* enterohemorrágico 0157:H7 ha sido detectado en espinacas (CDC, 2006), cebollas y otras verduras, agua de consumo y de riego (Rubaglio *et al.*, 2007).

### ***Escherichia coli***

*E. coli*, es una bacteria con forma de bastón (bacilo), perteneciente a la familia de las Enterobacteriáceas; está considerada como el material biológico más



utilizado en experimentación. Esta bacteria es un organismo adecuado para la investigación por su crecimiento rápido y porque su cultivo es sencillo. Ha facilitado descubrimientos muy importantes sobre metabolismo, reproducción celular e ingeniería genética (AESAs, 2003).

*Escherichia coli* no se ha reconocido por ser patógeno de plantas (Barak y Schroeder, 2012). Sin embargo puede sobrevivir en las plantas y penetrar en los tejidos vegetales y mantener su población causando graves brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

- **Generalidades**

Forma parte de la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales (Erwing *et al.*, 1985).

- **Sobrevivencia**

*Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de los animales y seres humanos, en un entorno que proporciona un amplio suministro de nutrientes para el crecimiento bacteriano (Chung *et al.*, 1979; Nixon y Mawer, 1970; Savageau, 1983; Savageau, 1974) y al ser parte de la flora intestinal se puede utilizar como principal indicador para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la seguridad de los alimentos y del agua (Anderson *et al.*, 2005). Generalmente son inofensivos, ya que constituyen el 1% de la población microbiana del tracto gastrointestinal; pero algunas cepas de *E. coli* son patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua y el medio ambiente (Kaper *et al.*, 2004). Diferentes cepas de *E. coli* que causan enfermedades humanas se clasifican según el tipo de síntomas que producen; se ha encontrado que de los cinco grupos de cepas, *E. coli* serotipo O157:H7 (Entero hemorrágica,

ECEH) es la más importante, ya que se ha considerado como un patógeno emergente en relación con la salud pública por ser la causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en el mundo.

- ***E. coli* patógena**

*E. coli* patógeno intestinal, son aquellas cepas capaces de causar una enfermedad diarreica en el hombre y en los animales. La subdivisión de las formas patógenas se realiza en base al mecanismo subyacente a la enfermedad. En la actualidad, cuatro cepas de *Escherichia. coli* patógeno con enfermedades transmitidas por alimentos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), y *E. coli* enterohemorrágica (*E. coli* 0157:H7; ECEH) (ICMSF, 1998-b). Las primeras investigaciones de este agente infeccioso se centraron en las cepas que causaban diarrea en niños. Posteriormente se admitió que la mayoría de estos organismos eran de los serogrupos O específicos y con frecuencia se les conoce como *E. coli* enteropatógeno “clásico” (ECEP). Entre las décadas de los años 60 y 70, se identificó el mecanismo patógeno de las cepas productoras de toxina y el de las cepas invasoras de *E. coli*. Sin embargo, la patogenicidad de los organismos “clásicos” no pudo ser explicada por la producción de toxina o por el poder invasor, por lo que se ha puesto un mayor esfuerzo en la investigación de estas cepas (ICMSF, 1998-b).

- ***E. coli* enteropatógena**

Las ECEP causan lesiones características similares a las producidas por *E. coli* 0157:H7 en el intestino. La lesión implica la destrucción de las microvellosidades sin que exista otro indicio de invasión en los tejidos.

- ***E. coli* enterotoxigénica**

Las ECET son la principal causa de la diarrea infantil en los países en desarrollo y son la primera causa de diarrea del viajero en algunos países desarrollados. En contra posición a las ECEP, que colonizan la totalidad del intestino, los ECET se encuentran circunscritos al intestino delgado. De este tipo de *E. coli* se han

descrito principalmente dos tipos de toxina, que son fácilmente diferenciables en base a la termoestabilidad, peso molecular y modo de acción; estos dos tipos son la toxina termolábil (LT) y la termoestable (ST) (ICMSF, 1998-b).

- ***E. coli* enteroinvasiva**

*E. coli* enteroinvasiva (ECEI) tiene un gran parecido con *Shigella* en cuanto a su patología. Los organismos se diferencian de la mayoría de las *E. coli* en que fermentan lentamente la lactosa, o no la fermentan en absoluto, pueden ser anaerógenos y son inmóviles. Atacan de modo específico la mucosa del colon, invadiendo las células epiteliales, multiplicándose y finalmente causando la ulceración del intestino (ICMSF, 1998-b).

- ***E. coli* enterohemorrágica**

*Escherichia coli* 0157:H7 fue reconocido como un patógeno entérico en 1982 (Riley *et al.*, 1983). Se ha caracterizado por los síntomas característicos como son diarrea, colitis hemorrágica y síndrome hemolítico (Doyke, 1991; Meng *et al.*, 2001).

Estados Unidos ha reconocido a *Escherichia coli* 0157:H7 como el mayor responsable de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Griffin y Tauxe, 1991).

- **Enfermedades asociadas al consumo de *Escherichia coli***

El consumo de frutas y vegetales sin cocinar se ha señalado como causa de enfermedades humanas. Entre las infecciones de este tipo se incluyen enfermedades como la salmonelosis, la disentería bacilar y amebiana, el cólera, la leptoriosis, la hepatitis vírica, la gastroenteritis vírica y la fasciolosis (Tabla 1) (Roberts *et al.*, 2000). El agente infeccioso generalmente es un contaminante superficial. Para controlar la contaminación de los vegetales puede utilizarse *Escherichia coli* como microorganismo indicador.

*Escherichia coli*, productor de Shiga es un patógeno asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (Karmali, 1989). La contaminación de productos

hortícolas con esta toxina se ha convertido en una preocupación mundial, ya que contribuye un gran factor de riesgo por su forma de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en ambientes agrícolas y alimentarios (Brandl y Mandrell, 2002; Dreux *et al.*, 2006; Na *et al.*, 2006; Wang, 1998).

| Microorganismo                         | Fruta o Verdura                              |
|--|--|
| <b><i>C. botulinum</i></b>             | Ensalada de col                              |
| <b><i>Escherichia coli</i> 0157:H7</b> | Lechuga, germinados, melón, jugo de manzana. |
| <b><i>Shigella</i></b>                 | Perejil, lechuga                             |
| <b><i>Listeria monocytogenes</i></b>   | Ensalada de col                              |
| <b>Hepatitis A</b>                     | Lechuga, fresa                               |
| <b><i>Cyclospora</i></b>               | Frambuesa, albahaca, pasto                   |
| <b><i>Cryptosporidium</i></b>          | Jugo de manzana, lechuga                     |

**Tabla 1.** Ejemplos de brotes de ETAs asociados al consumo de frutas y verduras en EEUU (FDA, 1999.)

El brote ocurrido por *Escherichia coli* 0157:H7 en 2006 en espinaca resultó en 205 casos confirmados y 3 muertes (CDC 2006), lo que provocó que se pusiera mayor atención en las medidas de seguridad alimentaria (Matthews 2009) y de las buenas prácticas agrícolas, con el fin de reducir la contaminación en vegetales de hoja verde.

Esta bacteria, constituye el principal factor de riesgo en la transmisión de enfermedades por alimentos, ya que se hay una deficiencia en las condiciones higiénico-sanitarias durante el proceso de producción, contaminación cruzada durante la preparación, almacenamiento y consumo (Flores, 2008).

Los brotes de esta bacteria se han asociado a un sinfín de alimentos, como los de origen bovino, agua, vegetales y algunas frutas como melón y manzana (Swerdlow *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1988; Cieslak *et al.*, 1993; Oregon Health Division, 1943; Besser *et al.*, 1993). También se ha asociado con gran número de alimentos que le sirven como vehículo transmisor de la bacteria. La contaminación con este microorganismo puede ser cruzada, ya que se puede producir el procesamiento de alimentos, su manipulación y su posterior

elaboración, lo que implica una gran gama de alimentos que pueden asociarse a brotes de este microorganismo (Beuchat, 2002; Institute of Food technologist, 2001; Mead *et al.*, 1999).

La prevención de la infección por microorganismos en especial por *E. coli* requiere medidas de control en todas las etapas de la cadena alimentaria desde la producción, hasta la fabricación y preparación de los alimentos (Arzu, 2000; Iriarte, 2006).

- ***E. coli* en verduras**

Existen reportes que muestran salsas y guacamole contaminados con esta bacteria en restaurantes de Guadalajara, Ciudad de México y Houston. Alrededor del 66% de los casos reportados fueron de restaurantes de Guadalajara, causando el padecimiento comúnmente conocido como “diarrea del viajero” (Warner, 2002).

De las muestras analizadas de los restaurantes más populares de la ciudad de Guadalajara, las más contaminadas eran las de guacamoles, el pico de gallo fue el que presento el nivel más bajo de contaminación, probablemente debido a la acidez del jitomate y a otros componentes que pueden estar inhibiendo a *E. coli* (Warner, 2002). Más recientemente, *E. coli* se aisló con una frecuencia de 66.7% a partir de ensaladas de verduras crudas listas para su consumo obtenidas en restaurantes de la ciudad de Pachuca (Noguera, 2005). Y el 10.5% de estas cepas de *E. coli* fueron identificadas como patógenas; los grupos patógenos fueron: enteropatógeno, enteroinvasivo y enterotoxigénico (Méndez, 2006).

En los países en desarrollo, han sido identificados determinados alimentos como vehículos de infecciones por ECET. Una investigación prospectiva de la diarrea del viajero en los médicos que asistían a una conferencia en la Ciudad de México, revelo que ECET explicaba aproximadamente el 45% de los casos de diarrea y que la enfermedad estaba relacionada con el consumo de ensaladas que contenían hortalizas crudas, (ICMSF, 1998).

- **Factores que afectan el comportamiento de *E. coli***

*E. coli* es una bacteria termodúrica, susceptible a la congelación y descongelación, desecación y acidez excesiva. La letalidad observada de *E. coli* a pH 2 es mayor a pH 3.25 que a pH 4 y 900 veces mayor que a pH 4.5 (bebidas gaseosas), independientemente de la concentración de sacarosa presente. Esta bacteria posee la capacidad de resistencia al medio ambiente, agentes químicos y factores que favorecen o impiden su desarrollo, tienen una limitada capacidad psicotrófa y es incapaz de proliferar en una concentración de NaCl por encima de 6% (Fernández, 2000).

## **Lechuga**

- **Generalidades**

La lechuga es un vegetal que se consume principalmente en fresco. Una ventaja agronómica de este cultivo es que presenta un ciclo corto, lo que permite su producción todo el año (Maroto, 1989).

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es originaria de Europa y Asia y sus primeros usos fueron destinados a la producción de aceites y semillas. (ASERCA, 2000).

La lechuga se produce en cualquier época del año y como el resto de las hortalizas, es un abastecedor de vitaminas, minerales y sales; indispensables para el organismo. La lechuga se ubica en el grupo de las hortalizas de hoja y se consumen prácticamente en fresco.

La lechuga es una planta herbácea anual, dicotiledónea, autógama, perteneciente a la familia Compositae, cuyo nombre botánico es *Lactuca sativa* L., y está ampliamente relacionada con la lechuga silvestre *Lactuca serriola*; cuando joven contiene en sus tejidos un jugo lechoso llamado látex, cuya cantidad disminuye con la edad de la planta. Dentro de la familia Compositae (Asteracea) también hay otras especies de importancia medicinal como los cardos, el diente de león, la cerraja y la alcachofa (Osorio & Lobo, 1983; Díaz et al., 1995; Valadez, 1997).

Todas las variedades de la lechuga doméstica pertenecen a la especie *Lactuca sativa*. La lechuga cultivada es una planta anual, de cabeza paniculada y flor

amarilla y derivada probablemente de la lechuga silvestre o espinosa, *Lactuca serriola* (Whitaker & Ryder, 1964).

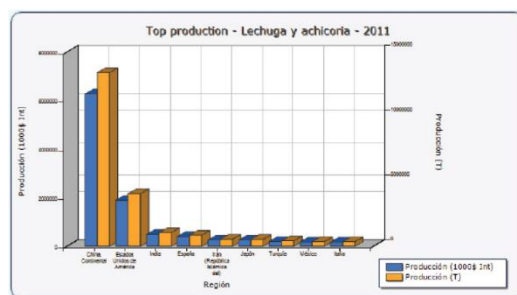
La lechuga es un cultivo que se adapta mejor a las bajas temperaturas. Las temperaturas óptimas para su crecimiento son de 18 a 25°C durante el día y de 7 a 15°C durante la noche, como temperatura máxima se puede considerar los 30°C y como mínimas puede soportar temperaturas de hasta -6°C, sin embargo las plantas maduras son las más sensibles a las temperaturas bajo cero. (Asaduzzman *et al.*, 2010; Floz *et al.*, 2009; Jaques & Hernández, 2005; Ryder, 1998).

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| <b>Reino</b>    | <b>Plantae</b>   |
| <b>División</b> | Spermatophyta    |
| <b>Clase</b>    | Magnoliopsida    |
| <b>Orden</b>    | Asterales        |
| <b>Familia</b>  | Asteriaceae      |
| <b>Genero</b>   | Lactuca          |
| <b>Especie</b>  | <i>L. sativa</i> |

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de la lechuga (Maroto, 1992).

- **Producción**

Según la FAO (2011), los países con mayor producción de lechuga fueron China con 13,439,000 toneladas y Estados Unidos con 4,070,780 toneladas, seguidos por India, España, Irán, Japón, Turquía, México e Italia (Figura 2). En Latinoamérica los mayores productores de estas hortalizas son México con 370,066 toneladas y Chile con 101,559 toneladas.



**Figura 2.** Producción mundial de lechuga y achicoria para el año 2011 (FAO, 2011)

Para el 2010 la superficie cosechada en México fue de 16645 ha con un rendimiento medio de 20.5 t ha<sup>-1</sup> (FAOSTAT, 2012). El consumo per cápita de lechuga en México en el período de 1994 a 2002, se elevó de 1.8 a 2.5 kg (Bobadilla *et al.*, 2010).

A nivel nacional los estados con mayor superficie sembrada al 31 de Junio de 2010, fueron Guanajuato, Puebla y Baja California, con 2394, 1342, y 1234 hectáreas (ACERCA, 2000).

- **Valor nutritivo**

El valor nutricional de la lechuga se resalta por el contenido de minerales y vitaminas. Es una fuente importante de calcio, hierro y vitamina A, proteína, ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2) y niacina. El contenido nutricional tiene similitud con otras hortalizas, como el apio, el espárrago y el habichuelín o ejote. Dado su bajo valor calórico, se ha tornado en ingrediente básico en las dietas alimenticias (Whitaker & Ryder, 1964).

El aporte de calorías de esta hortaliza es muy bajo, mientras que en vitamina C es muy rica; las hojas exteriores tienen más cantidad de esta vitamina que las interiores. También resulta una fuente importante de vitamina K; por lo tanto, protege de la osteoporosis. Otras vitaminas que destacan en la lechuga son la A, la E y el ácido fólico. Así mismo, aporta mucho potasio y fósforo y está compuesta en un 94% de agua (Alzate & Loaiza, 2008).

La lechuga en general provee fibra, carbohidratos, proteína, y una mínima cantidad de grasa, tiene acción antioxidante, lo cual está relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares e incluso cáncer. (Osorio & Lobo, 1983).

La lechuga es también un buen recurso de vitamina C, calcio, hierro y cobre. Los tallos proveen fibra dietética que es ingrediente básico en dietas incalóricas, mientras que las vitaminas y minerales están concentrados en la parte más delicada de sus hojas (Tabla 3) (Granval & Gaviola, 1991).



|                          |       |
|--------------------------|-------|
| <b>Carbohidratos (g)</b> | 20.1  |
| <b>Proteínas (g)</b>     | 8.4   |
| <b>Grasas (g)</b>        | 1.3   |
| <b>Calcio (g)</b>        | 0.4   |
| <b>Fósforo (mg)</b>      | 138.9 |
| <b>Vitamina C(mg)</b>    | 125.7 |
| <b>Hierro (mg)</b>       | 7.5   |
| <b>Niacina (mg)</b>      | 1.3   |
| <b>Rivoflavina (mg)</b>  | 0.6   |
| <b>Tiamina (mg)</b>      | 0.3   |
| <b>Vitamina A (U.I)</b>  | 1155  |
| <b>Calorías (cal)</b>    | 18    |

**Tabla 3.** Valor nutricional de la lechuga en 100g de sustancia  
(<http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm>)

## Cilantro

- **Generalidades**

El cilantro fue uno de los primeros miembros cultivados de la familia Umbellifera. Esta semilla se encontró por primera vez en una tumba en Egipto, la cual era utilizada por los antiguos hebreos como una de las hierbas más amargas que se usaba para preparar sus comidas en la pascua judía (Rao, 1983).

El cilantro fue introducido a América en 1670, y fue ampliamente usada por los nativos de India. Esta planta es importante para la destilación con vapor de agua, aceite esencial de olor agradable, volátil, usado como saborizante de alimentos, y usado en la síntesis de vitamina A (Hedrich, 1972; Rao, 1983).

Su clasificación taxonómica se encuentra explicada en la tabla 4.

|                 |                |
|-----------------|----------------|
| <b>Reino</b>    | <b>Plantae</b> |
| <b>División</b> | Magnoliphyta   |
| <b>Clase</b>    | Magnoliopsida  |
| <b>Orden</b>    | Apiales        |
| <b>Familia</b>  | Apiaceae       |

|                |                   |
|----------------|-------------------|
| <b>Género</b>  | Coriandrum        |
| <b>Especie</b> | <i>C. sativum</i> |

**Tabla 4.** Clasificación Taxonómica del Cilantro (Carrera, 2010).

- **Producción**

Los países con mayor producción de cilantro como semilla seca son la India, Marruecos, Canadá, Rumania, Rusia, Irán, Turquía, Israel, Egipto, China, Pakistán, Sudáfrica, Australia, Estados Unidos, Argentina y México (Solano, 2010).

En México su importancia radica a partir de su follaje en fresco. Este se utiliza como condimentos. Se produce en casi todos los estados, principalmente en Baja California Norte, Coahuila, Nuevo León, Sonora, Puebla, Jalisco, Aguascalientes, Zacatecas y Guanajuato (Neri, 1975; Hedrick, 1972).

En México el cilantro es una hortaliza de importancia tanto para el mercado nacional como el de exportación, siendo el principal país al que se exporta Estados Unidos (Del Angel, 1991).

- **Valor nutritivo**

Respecto a su valor nutricional, 100 g de cilantro en semilla aportan 297.5 Kcal; grasas monoinsaturadas 13.6 g; proteínas 12.4 g; grasas poliinsaturadas 1.8 g; calcio 708.6 mg, grasas saturadas 1 g; magnesio 330.2 mg; fósforo 408.8 mg; vitamina C 21 mg; potasio 1.267 mg y sodio 35.3 mg (<https://www.buenasalud.net/2010/11/22/propiedades-del-cilantro.html>).

## **Perejil**

- **Generalidades**

El perejil (*Petroselinum sativum*) es una hortaliza de la familia de las apiáceas (Díaz *et al.*, 2002).

El perejil sin duda alguna es la hierba de más uso en la cocina europea y americana. Es una hortaliza originaria de los países que rodean el Mediterráneo Oriental (Simon *et al.*, 1984). Todas sus partes son comestibles, ya que es de gran utilidad como condimento (Janick, 1986).

Esta hortaliza es originaria de la zona mediterránea. El nombre genérico viene del griego *petrol* (piedra o roca), que responde al hecho de que crece bien sobre suelos rocosos (<http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/perejil.pdf>).

La clasificación taxonómica es la siguiente (Tabla 5):

| <b>Reino</b>    | <b>Plantae</b>    |
|-----------------|-------------------|
| <b>División</b> | Embryobiontas     |
| <b>Clase</b>    | Magnoliopsida     |
| <b>Orden</b>    | Apiales           |
| <b>Familia</b>  | Apiaceae          |
| <b>Género</b>   | Petroselinum      |
| <b>Especie</b>  | <i>P. crispum</i> |

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica del perejil (Cecchini, 1978).

- **Producción**

El perejil se cultiva principalmente en zonas mediterráneas y se extiende desde el sur de Europa hasta la península de los Balcanes.

Los países donde mayormente se produce son Holanda, Italia, Francia, Israel y otros países europeos y asiáticos. Se estima que en Francia su producción comercial es de 20 000 toneladas por año (<http://www.frutas-hortalizas.com/Hortalizas/Origen-produccion-Perejil.html>).

- **Valor nutritivo**

El perejil es una fuente de Vitamina C, flavonoides y miristicina. La ración media de perejil es de 1 g. El perejil fresco tiene muchas propiedades y sabor que el perejil en seco, ya que pierde sus propiedades (Tabla 6) (<http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/perejil.pdf>).

| <b>Información nutrimental</b> | <b>Por 100 g de porción comestible</b> |
|--------------------------------|--|
| <b>Energía (Kcal)</b>          | 45                                     |
| <b>Proteínas (g)</b>           | 3                                      |

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| <b>Lípidos totales (g)</b>     | 1.3  |
| <b>Hidratos de carbono (g)</b> | 2.7  |
| <b>Fibra (g)</b>               | 5    |
| <b>Agua (g)</b>                | 88   |
| <b>Calcio (mg)</b>             | 200  |
| <b>Hierro (mg)</b>             | 7.7  |
| <b>Magnesio (mg)</b>           | 23   |
| <b>Zinc (mg)</b>               | 0.7  |
| <b>Potasio (mg)</b>            | 760  |
| <b>Fósforo (mg)</b>            | 64   |
| <b>Tiamina (mg)</b>            | 0.23 |
| <b>Vitamina C (mg)</b>         | 190  |

**Tabla 6.** Información nutrimental del cilantro  
(<http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/perejil.pdf>)

## Repollo

- **Generalidades**

El repollo es una hortaliza conocida por su antigüedad. Eran cultivadas por los egipcios y las consideraban plantas medicinales (Sarriá, 2001).

El repollo es originario de las costas del mediterráneo y Europa Occidental, crece de manera silvestre principalmente en Dinamarca, Inglaterra y Grecia (Lozano *et al.*, 2004).

La clasificación taxonómica según López (2003) y Sarriá (2001) es la siguiente (Tabla 7).

| <b>Reino</b>    | <b>Vegetal</b>   |
|-----------------|------------------|
| <b>División</b> | Magnoliophyta    |
| <b>Clase</b>    | Magnoliopsida    |
| <b>Orden</b>    | Brassicales      |
| <b>Familia</b>  | Crucíferas       |
| <b>Género</b>   | <i>Brassica</i>  |
| <b>Especie</b>  | <i>Oleracea.</i> |

**Tabla 7.** Clasificación taxonómica del repollo (López, 2003; Sarriá, 2001).

- **Producción**

Actualmente se producen aproximadamente 70 millones de toneladas de repollo por año a nivel mundial, sobre una superficie de 3.8 millones de hectáreas en 150 países. El mayor productor de repollo es China, con aproximadamente 50% de la producción mundial con 19.653 miles de toneladas. Rusia, India y Corea producen más de 4500, 4200 y 2700 miles de toneladas respectivamente, seguidos por Japón, Estados Unidos, Polonia, Indonesia, Ucrania y finalmente Rumania (<http://www.yara.com.co/crop-nutrition/crops/brassicas/informacion-esencial/produccion-mundial/>).

- **Valor nutritivo**

El repollo es una gran fuente de Vitamina C y folatos. Aporta cantidades apreciables de potasio, hierro, fósforo y, en menor cantidad de calcio. Es una fuente importante de fibra soluble, lo que favorece el tránsito intestinal y así evitar el estreñimiento (Tabla 8) ([http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/repollo\\_tcm7-315482.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/repollo_tcm7-315482.pdf)).

| <b>Agua (%)</b>      | <b>95%</b> |
|----------------------|------------|
| <b>Proteínas</b>     | 1.2 g      |
| <b>Lípidos</b>       | 0.8 g      |
| <b>Carbohidratos</b> | 3.0 g      |
| <b>Fibras</b>        | 0.6 g      |
| <b>Cenizas</b>       | 0.7 g      |
| <b>Calcio</b>        | 43 mg      |
| <b>Fósforo</b>       | 40 mg      |
| <b>Hierro</b>        | 0.6 mg     |
| <b>Sodio</b>         | 23 mg      |
| <b>Potasio</b>       | 253 mg     |
| <b>Tiamina</b>       | 0.05 mg    |
| <b>Riboflavina</b>   | 0.04 mg    |

|                        |         |
|------------------------|---------|
| <b>Niacina</b>         | 0.26 mg |
| <b>Ácido ascórbico</b> | 25 mg   |

**Tabla 8.** Información nutrimental del repollo (Lozano *et al.*, 2004).

Debido a la importancia de los vegetales frescos como fuentes de enfermedades causadas por *Escherichia coli*, así como la utilidad de las demás bacterias entéricas indicadoras para evaluar la seguridad sanitaria de los alimentos, el presente trabajo tiene como finalidad analizar la calidad microbiológica de vegetales frescos que se encuentran en 3 establecimientos de la localidad de Saltillo, Coahuila, México, a través de la determinación de indicadores entéricos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento

La investigación se realizó en tres establecimientos previamente seleccionados en la ciudad de Saltillo, Coahuila. Se recolectaron muestras mensuales de cilantro, lechuga, perejil y repollo, durante los meses de Junio a Agosto de 2015. Estos establecimientos fueron seleccionados ya que son los que presentan mayor número de clientes, y se definieron como A, B y C.

Como ya se mencionó anteriormente, las enterobacterias se encuentran principalmente en vegetales verdes, razón por la cual se eligieron estos cuatro vegetales.



**Figura 3.** Ubicación del sitio de estudio.

El análisis microbiológico se realizó en los laboratorios de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.



### **Recolección de las muestras**

Se colectaron 3 muestras de cada uno los vegetales antes mencionados. Estas muestras fueron elegidas al azar, y se depositaron en bolsas estériles para su traslado a los laboratorios, en los cuales se les realizó los estudios microbiológicos requeridos en base a la NOM-210-SSA1-2014.

### **Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y E. coli por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua**

Actualmente se utilizan tres grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias del grupo coliforme se usan como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes totales, fecales y *E. coli* continúan siendo el indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas.

El principio de la técnica se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menos dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y crecimiento microbiano propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa de  $45.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  (para alimentos) dentro de las 48 horas de incubación (coliformes fecales y *E. coli*).

Para obtener el NMP en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.



### **Prueba presuntiva**

Se pesaron 25 g de alimento en 225 ml de agua destilada estéril, y se trituró para homogeneizar. Se prepararon tres diluciones decimales con agua destilada estéril. Se agitaron y se transfirió 1 ml a tres tubos con 9 ml de caldo lauril triptosa, por cada dilución tres diluciones consecutivas. Este medio se utilizó como medio de enriquecimiento. Se incubaron a 35°C y se examinaron a las 24 h para observar la formación de gas. En caso de no haber presencia de gas se incubaron 24 h más.

Posteriormente se trasladó 1 ml de cada tubo a tubos que contenían 9 ml de caldo verde brillante, siguiendo lo mencionado anteriormente.

### **Prueba confirmativa**

Los tubos positivos se sembraron por estriado en agar L-EMB, se incubaron placas invertidas a 35°C por 24 h. Se seleccionaron dos colonias de cada placa con la morfología típica: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico, y se realizaron pruebas de morfología microscópica, así como pruebas bioquímicas.

Se realizó un frotis y se tiñó por Gram, y la presencia de bacilos cortos Gram negativos, indicaba la presencia del grupo coliforme.

### **Análisis bioquímico**

De las cepas aparentemente positivas, se tomó una asada y se sembró en caldo nutritivo para la realización de las pruebas API.

Los sistemas miniaturizados API son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratado o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar (Tabla 9)

([http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_SistemasAPI.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf)).

| <b>Prueba</b>         | <b>Reacción / Enzimas</b>                |
|-----------------------|--|
| <b>ONPG</b>           | Beta-galactosidasa                       |
| <b>ADH</b>            | Arginina deshidrolasa                    |
| <b>LDC</b>            | Lisina descarboxilasa                    |
| <b>ODC</b>            | Ornitina descarboxilasa                  |
| <b>CIT</b>            | Utilización del citrato                  |
| <b>H<sub>2</sub>S</b> | Producción de H <sub>2</sub> S           |
| <b>URE</b>            | Ureasa                                   |
| <b>TDA</b>            | Triptófano desaminasa                    |
| <b>IND</b>            | Producción de indol                      |
| <b>VP</b>             | Producción de acetoína (Voges-Proskauer) |
| <b>GEL</b>            | Gelatinasa                               |
| <b>GLU</b>            | Fermentación/oxidación de glucosa        |
| <b>MAN</b>            | Fermentación/oxidación de manitol        |
| <b>INO</b>            | Fermentación/oxidación de inositol       |
| <b>SOR</b>            | Fermentación/oxidación de sorbitol       |
| <b>RHA</b>            | Fermentación/oxidación de ramnosa        |
| <b>SAC</b>            | Fermentación/oxidación de sacarosa       |
| <b>MEL</b>            | Fermentación/oxidación de melobiosa      |
| <b>AMY</b>            | Fermentación/oxidación de amigdalina     |
| <b>ARA</b>            | Fermentación/oxidación de arabinosa      |
| <b>OX</b>             | Citocromo oxidasa                        |

**Tabla 9.** Pruebas Bioquímicas utilizadas para la identificación bacteriana en el KIT API.

A partir de una colonia aislada del microorganismo, se hizo una suspensión en 5 mL de agua estéril, para después llenar con esta suspensión los tubos de todos los pocillos, siendo llenados hasta la cúpula solo los que contenían las pruebas de CIT, VP y GEL.

Posteriormente se cubrieron con parafina las cúpulas de los pocillos ADN, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S para obtener anaerobiosis. La tira se puso en su propia cámara húmeda de incubación. En donde previamente se llenó de agua en los alvéolos

de la cámara con el fin de proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.

Se incubó a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se anotaron los resultados inmediatos. Algunos resultados requieren ser revelados como TDA, VP, Indol, Oxidasa (Tabla 10).

|                |  |
|----------------|--|
| <b>TDA</b>     | Añadir una gota de FeCl <sub>3</sub> 10%                                     |
| <b>VP</b>      | Añadir una gota de KOH al 40% y una gota de C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH |
| <b>Indol</b>   | Añadir una gota de reactivo de Kovacs  |
| <b>Oxidasa</b> | Añadir una gota del reactivo tetrafenilendiamina recién preparado.           |

**Tabla 10.** Pruebas bioquímicas que necesitan ser reveladas.

La lectura de los resultados se llevó a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con la siguiente tabla de lectura, y anotando el resultado como positivo y negativo (Tabla 11).

| <b>Prueba</b>         | <b>Reacción / Enzimas</b>      | <b>Negativo</b>       | <b>Positivo</b>        |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>ONPG</b>           | Beta-galactosidasa             | sin color             | amarillo               |
| <b>ADH</b>            | Arginina deshidrolasa          | amarillo              | rojo o naranja         |
| <b>LDC</b>            | Lisina descarboxilasa          | amarillo              | rojo o naranja         |
| <b>ODC</b>            | Ornitina descarboxilasa        | amarillo              | rojo o naranja         |
| <b>CIT</b>            | Utilización del citrato        | verde                 | azul oscuro o turquesa |
| <b>H<sub>2</sub>S</b> | Producción de H <sub>2</sub> S | sin precipitado negro | precipitado negro      |
| <b>URE</b>            | Ureasa                         | amarillo              | rojo o naranja         |
| <b>TDA</b>            | Triptófano desaminasa          | amarillo              | marrón-rojo            |

|            |  |              |                                  |
|------------|--|--------------|----------------------------------|
| <b>IND</b> | Producción de indol                      | amarillo     | color rosa o anillo<br>rosa-rojo |
| <b>VP</b>  | Producción de acetoina (Voges-Proskauer) | sin color    | rosa-rojo                        |
| <b>GEL</b> | Gelatinasa                               | sin difusión | difusión de<br>pigmento          |
| <b>GLU</b> | Fermentación/oxidación de<br>glucosa     | azul o verde | amarillo                         |
| <b>MAN</b> | Fermentación/oxidación de<br>manitol     | azul o verde | amarillo                         |
| <b>INO</b> | Fermentación/oxidación de<br>inositol    | azul o verde | amarillo                         |
| <b>SOR</b> | Fermentación/oxidación de<br>sorbitol    | azul o verde | amarillo                         |
| <b>RHA</b> | Fermentación/oxidación de<br>ramnosa     | azul o verde | amarillo                         |
| <b>SAC</b> | Fermentación/oxidación de<br>sacarosa    | azul o verde | amarillo                         |
| <b>MEL</b> | Fermentación/oxidación de<br>melobiosa   | azul o verde | amarillo                         |
| <b>AMY</b> | Fermentación/oxidación de<br>amigdalina  | azul o verde | amarillo                         |
| <b>ARA</b> | Fermentación/oxidación de<br>arabinosa   | azul o verde | amarillo                         |

**Tabla 11.** Identificación de pruebas bioquímicas en el KIT API.

Basados en los manuales de identificación de Bergey fue como se logró la identificación bacteriana (Figura 4 y 5).

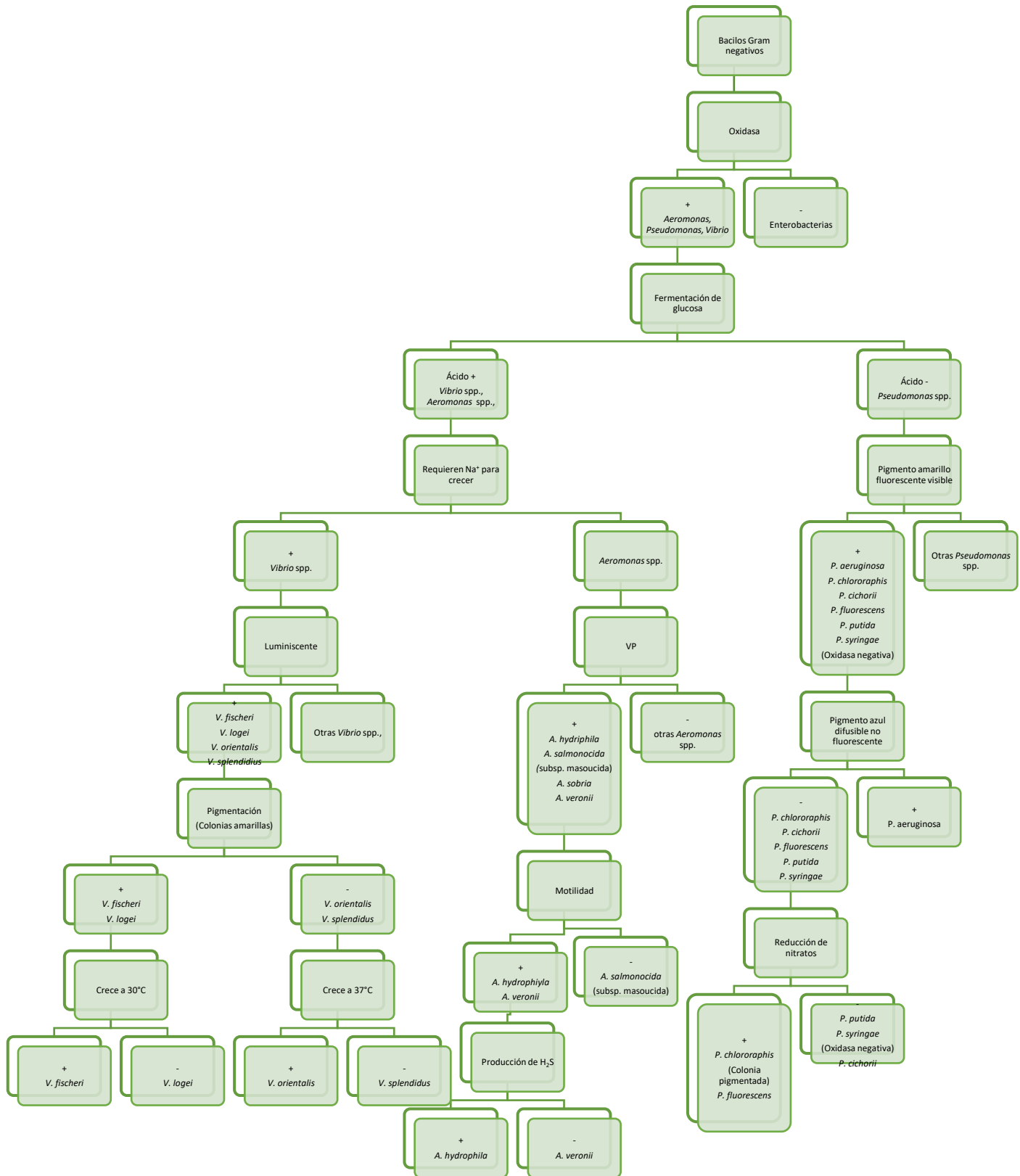


Figura 4. Esquema de identificación manual de Bergey para bacilos Gram negativos

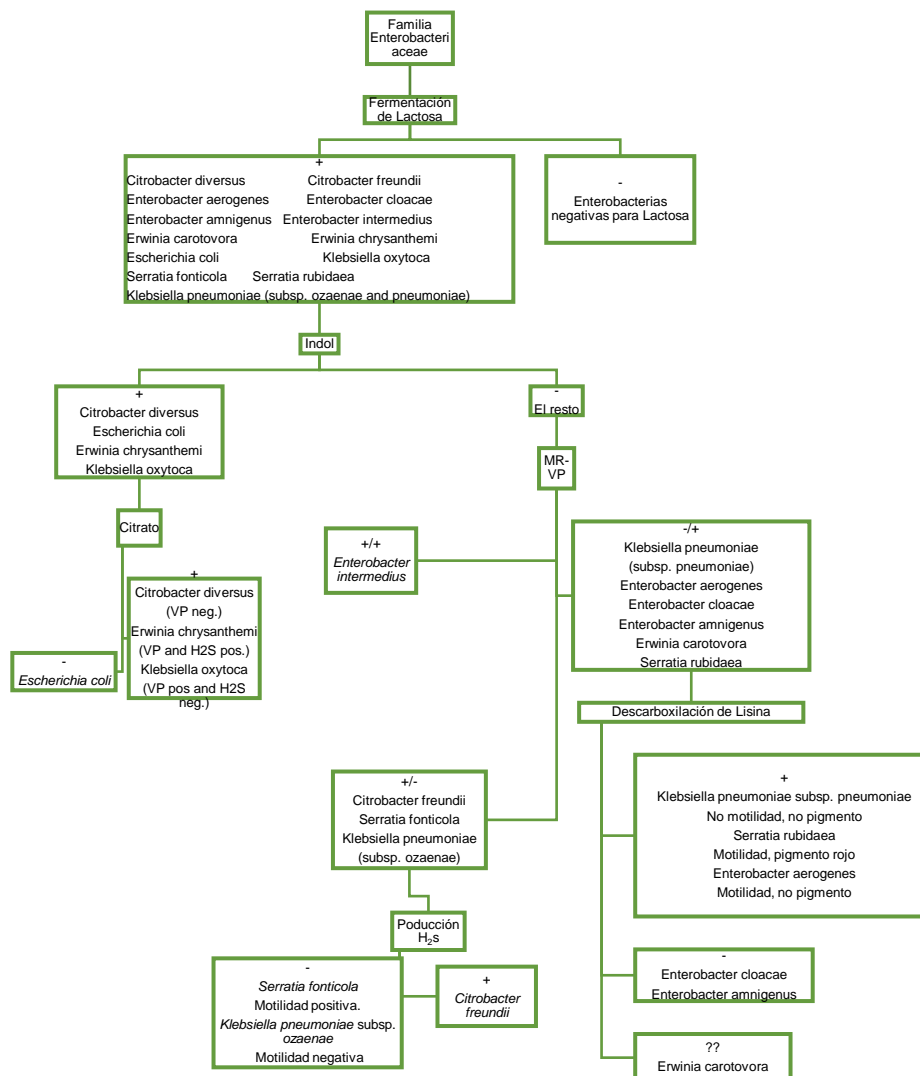


Figura 5 Esquema de Identificación de Enterobacterias (Manual de Bergey)

**Conservación y evaluación molecular de las cepas obtenidas.**

Se realizó la preservación de microorganismos en glicerol. Se basa en colocar las células para su almacenaje en congelación, con el mínimo daño posible por la cristalización del agua, ya que la formación de cristales angulares causa ruptura celular. El glicerol forma un entramado con los cristales de agua que protegen a las células sin alterar su estructura. Este método logra preservar microorganismos hasta por 6 meses.

Se colocaron 100 ml de agua destilada en 10 ml de glicerol y se homogenizó. Se esterilizó a 135 psi por 10 minutos. Se dejó enfriar y luego se añadieron 10 ml de la mezcla al medio que contenía los microorganismos aislados.

Se distribuyó la mezcla con ayuda de un asa metálica. Se tomaron 0.5 ml de la solución y se colocaron en tubos eppendorf estériles de 0.6 ml de capacidad. Finalmente se identificaron y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

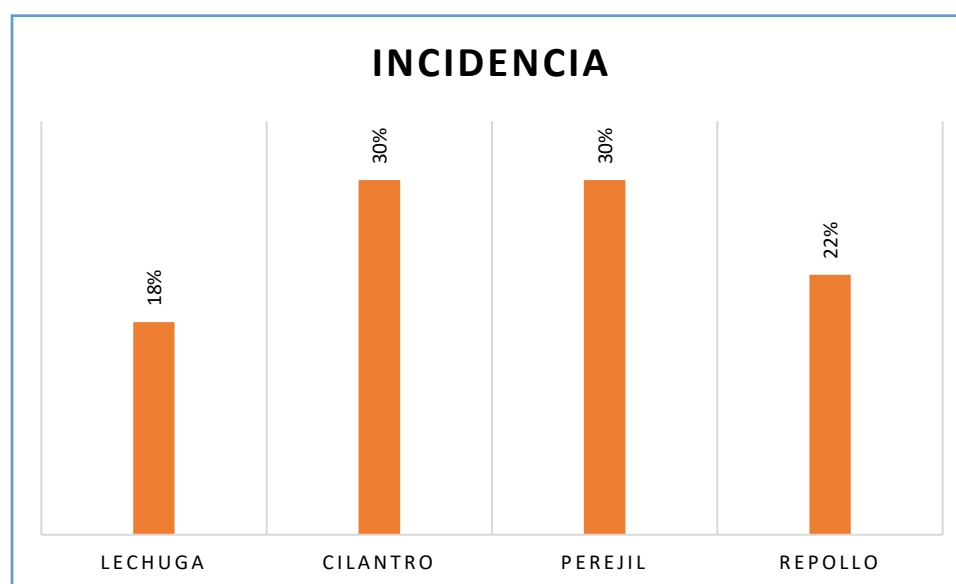
Posteriormente se mandaron al laboratorio MacroGen, para su estudio molecular.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis microbiológico.

El análisis realizado a los cuatro vegetales verdes (lechuga, cilantro, perejil y repollo) de los tres establecimientos de Saltillo, Coahuila, mostraron una elevada carga bacteriana.

En general el 64% de las muestras mostraron presencia de coliformes fecales. Siendo el cilantro y el perejil los que mostraron los más altos niveles con un 30% cada uno, seguido por el repollo con 22% y finalmente la lechuga con un 18% (Figura 4).



**Figura 6.** Incidencia de coliformes totales en 4 vegetales verdes.

De los tres establecimientos analizados, el denominado B, fue el que mostró mayor incidencia de estos microorganismos, ya que el 75% de las muestras superaron el límite establecido por la NOM-210-SSA1-2014. Ya que para este tipo de bacterias el límite permitido debe ser menor a 10 NMP/g (Tabla 12, 13 y 14) (RTCA, 2009).



| Vegetal  | Lugar A<br>NMP/g | Lugar B<br>NMP/g | Lugar C<br>NMP/g |
|----------|------------------|------------------|------------------|
| Lechuga  | 6                | 28               | <3               |
| Cilantro | >1100            | 93               | 14               |
| Perejil  | 1100             | 14               | 3                |
| Repollo  | >1100            | 7.3              | 9.1              |

**Tabla 12.** Resultados del primer muestreo realizado en Junio del 2015.

| Vegetal  | Lugar A<br>NMP/g | Lugar B<br>NMP/g | Lugar C<br>NMP/g |
|----------|------------------|------------------|------------------|
| Lechuga  | <3               | <3               | 16               |
| Cilantro | 28               | 28               | 42               |
| Perejil  | 75               | >1100            | <3               |
| Repollo  | <3               | 210              | 460              |

**Tabla 13.** Resultados del segundo muestreo realizado en Julio del 2015.

| Vegetal  | Lugar A<br>NMP/g | Lugar B<br>NMP/g | Lugar C<br>NMP/g |
|----------|------------------|------------------|------------------|
| Lechuga  | 14               | <3               | 23               |
| Cilantro | 3.6              | >1100            | <3               |
| Perejil  | 23               | 150              | 93               |
| Repollo  | 3.6              | >1100            | 93               |

**Tabla 14.** Resultados del tercer muestreo realizado en Agosto del 2015.

Al momento de realizar el aislamiento bacteriano en medio EMB se obtuvieron colonias típicas de *Klebsiella* spp. Estas presentaban coloración rosada con aspecto mucoso, por lo que con respecto a la ficha técnica del medio se presume que esta bacteria es *Klebsiella* spp.

La segunda bacteria aislada presentaba coloración verde metálica característica de la enterobacteria *Escherichia coli*.

Posteriormente se realizó una tinción de Gram, en donde se encontró la presencia de bacilos cortos Gram negativos, lo cual indica que el grupo coliforme estaba presente.

### Análisis bioquímico.

De acuerdo al manual de bacteriología de Bergey, las cepas denominadas A y C corresponde a *Klebsiella spp.*, y la cepa B corresponde a *E. coli* (Figura 7).

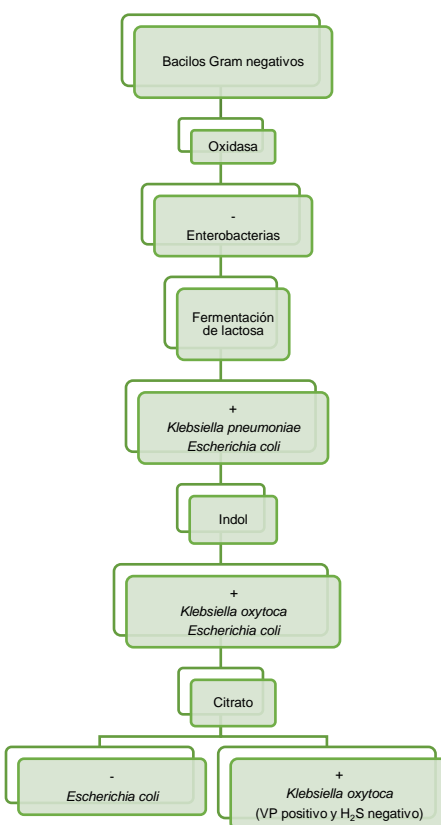


Figura 7 Resultados de las pruebas bioquímicas según el manual de Bergey

*Escherichia coli* está presente en vegetales verdes como cilantro, perejil y lechuga, y la mayoría de las veces es consumido sin un proceso previo de desinfección, por lo que se vuelve un riesgo potencial (Nochebuena, 2013).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Pérez en el 2009, ya que en la evaluación las muestras demostraban una elevada carga bacteriana, siendo el cilantro el que mayor concentración presentó.

La presencia de coliformes ha sido reportada por un sinnúmero de autores como Monge *et al.* (1996), Acevedo *et al.* (2001), Arias y Antillon (2000). Estos autores evaluaron la calidad microbiana de frutas y vegetales frescos mostrando niveles elevados. El 71% de las muestras se mostraban superando los límites establecidos.

De igual manera los resultados obtenidos concuerdan por lo reportado por Papavassiliou *et al.*, 1967 y Garcia-Villanova *et al.*, 1987. Ya que determinaron la presencia de patógenos y coliformes en este tipo de alimentos.

La posible fuente de contaminación es muy variada ya que puede ser desde su cultivo, hasta su comercialización como lo indica Rosa *et al.*, 1984, siendo la temperatura de almacenamiento un factor determinante para la propagación de estas bacterias (Gelreich y Bordner, 1971; Nichols *et al.*, 1971; Konowalchuk y Speirs, 1975).

Se ha reportado la resistencia a morir de *E. coli*, ya que puede sobrevivir por más de un año en pilas de heces de vacas expuestas a condiciones ambientales, por lo que se considera que el estiércol es una fuente primaria de contaminación (Wang *et al.*, 1996; Kudva *et al.*, 1998).

### **Análisis molecular.**

Las secuencias enviadas por MacroGen correspondientes a secuenciación con iniciadores con blanco en el gen 16s rDNA fueron editadas de acuerdo a la calidad de los electroferogramas y ensambladas empleando el software BioEdit Sequence Alignment Editor© (Hall, T. A. 1999). Estas secuencias fueron analizadas con el algoritmo BLASTN 2.3.1+ (Morgulis *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2000).

El alineamiento de la secuencia correspondiente al aislado denominado con la letra A sugiere que se trata de *Raoultella ornithinolytica* (antes *Klebsiella ornithinolytica*, Drancourt *et al.*, 2001) ya que presentó similitud de 99% con en 99% de su extensión (1373 n, fig. 1) con un eValue de 0.0. El alineamiento de la secuencia correspondiente al aislado denominado con la letra B sugiere que se trata de *Klebsiella oxytoca* ya que presentó similitud de 99% con en 100% de su

extensión (1350 n, fig. 2) con un eValue de 0.0. El alineamiento de la secuencia correspondiente al aislado denominado con la letra C sugiere que se trata de *Raoultella ornithinolytica* (antes *Klebsiella ornithinolytica*, Drancourt *et al.*, 2001) ya que presentó similitud de 100% con en 99% de su extensión (1379 n, fig. 3) con un eValue de 0.0. Cabe mencionar que para identificar molecularmente a una cepa bacteriana es recomendable emplear varios genes, sin embargo, la información con la que se cuenta es suficiente para sugerir al menos un género bacteriano, y para descartar que se trate de *E. coli*.

*Raoultella ornithinolytica* es un bacilo anaeróbico facultativo gram negativo, pertenece a la familia Enterobacteriaceae y se encuentra normalmente en ambientes acuáticos, peces e insectos. Fue secuenciado por Drancourt en el 2001.

Con respecto a las propiedades bioquímicas y mecanismos de patogenicidad, *R. ornithinolytica* es muy similar al género *Klebsiella* spp (Wauters *et al.*, 2004). Las propiedades bioquímicas más importantes de esta especie son: Indol positivo, citrato positivo, ONGP positivo, lisina descarboxilada negativa, fenilalanina deaminasa negativa y se diferencia con respecto a las cepas de *Klebsiella* spp., por su actividad ornítica descarboxilada positiva. (Park *et al.*, 2011). Una de sus características más notables es la producción de histamina a partir de histidina, lo que se ha asociado a intoxicación alimenticia por ingesta de peces contaminados (Kanki *et al.*, 2002), con síntomas como presencia de erupciones cutáneas, diarrea, ruboración, sudoración y vómitos (Sueifan *et al.*, 2016).

Los reportes de infecciones causadas a seres humanos por *Raoultella ornithinolytica* son infrecuentes, posiblemente por falta de diagnóstico certero, y en la mayor parte de los casos son infecciones intrahospitalarias asociadas a procedimientos invasivos (Seng *et al.*, 2016). Es importante mencionar también la alta resistencia a antibióticos que presenta esta especie (Zheng *et al.*, 2015)

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados moleculares existe la ausencia de cepas *Escherichia coli* en los cuatro vegetales evaluados de tres establecimientos de la ciudad de Saltillo. Sin embargo muestran presencia de enterobacterias como *Klebsiella oxytoca* y *Raoultella ornithinolytica*.

Los resultados microbiológicos nos indican la presencia de *Escherichia coli* en las muestras evaluadas, esto según las características morfológicas y bioquímicas, por lo que no podemos descartar del todo que alguna cepa de *Escherichia coli* se encuentre presente.

Por lo anteriormente mencionado existe una alta incidencia de enterobacterias como *Escherichia coli*, por lo que se recomendaría continuar con análisis moleculares específicos para cepas de este microorganismo.

Este problema fitosanitario se puede atribuir a malas prácticas de manufactura como puede ser la falta de seguridad al tratar estos productos.

Otra posible causa de contaminación puede ser la mala calidad de agua de riego, que puede ser que no se encuentre bien tratada y por lo tanto contamina a los vegetales desde su cultivo.

Este análisis presenta hallazgos importantes para la industria de la inocuidad alimentaria y de patología vegetal, ya que estos microorganismos no se asocian a alimentos; como por ejemplo *Raoultella ornithinolytica* que se ha reportado aislada de productos de la pesca.

## REFERENCIAS

- A.P.H.A. American Public Health Association. 1992. Standar methods for the examination of water and wastewater. American Water Works Association, Water Environment Federation. 18a. ed. Washington, D.C. pp. 9-48.
- Acevedo L, Mendoza C, Oyón R. Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus sp.*(2001) Y hongos en ensaladas para perros calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. ALAN.; 51(4): 12- 22.
- AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria). Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 2003. P. 27-30.
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., & Harwood, V. J. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. En: Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71, N° 6, p. 3041-3048. DOI: 10.1128/aem.71.6.3041-3048.
- Andrews, W. H., P. B. Mislivec, C. R. Wilson, V. R. Bruce, P. L. Poelma, R. Gibson, M. W. Trucksess, and K. Young. 1982. Microbial hazards associated with bean sprouting. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65:241–248.
- Arce G, Ávalos M., Giusti S, Miranda G, Tuhay N, Merino L. Consumo de vegetales crudos en la ciudad de Corrientes en relación con las enfermedades transmitidas por alimentos. Rev de Postgrado de la VI Cátedra de Medicina. 2002; 115: 10-1.
- Arias M, Antillón F. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. Rev Biomed. 2000; 11(2): 113-22.
- ARZU, O.; *et al.* Evaluación de riesgo microbiológico en superficies inertes y vivas de manipuladores en áreas de producción de un supermercado del nordeste argentino. En: *UNNE*. 2000. Vol. 17, p. 6-10.
- Asaduzzman, M., Sultana, S. y Arfan, A.M. 2010. Combined effect of Munch materials and organic manure on the growth and yield of lettuce. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci., (5): 5004-508.
- ASERCA. 2000. Lechuga. En: Claridades Agropecuarias No. SAGARPA, México. Consultada 12/09/2012.

- Badaway, A.S., Gerba, C.P., Kelly, L.M. 1985. "Survival of rotavirus SA-11 on vegetables", *Food Microbiol.*, 2: 199-20.
- Barak, J. D., and Schroeder, B. K. 2012. Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:241-266.
- Berang, M.E., R.E. Brachett, y L.R. Beuchat. 1989. "Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere," *J. Food Prot.*, 52: 702-705.
- Besser RE, Lett SM, Weber JT, et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 1993;269:2217–20.
- Beuchat L. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit, World Health Organization. Series: Report WHO/FSF/FOS/98.2 1998. En: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/surface.decon.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface.decon.pdf). Acceso: el 28 de octubre de 2008.
- Beuchat LR, Ryu JH. 1997 Produce handling and processing practices. *Emerg Infect Dis.*; 3(4): 1-13.
- Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4:413–423.
- Beuchat, L.R. 1996. "Pathogenic microorganisms associated with fresh produce," *J. Food Prot.*, 59: 204-216.
- Blumenthal UJ, Mara DD, Peasey A, Ruiz-Palacios G, Stott R. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: Recommendations for revising WHO guidelines. *Bull World Health Organ.* 2000; 78(9): 1104-16.
- Bobadilla, S.E.E., Rivera, H.G.,L. y Del Moral, B.L.E. 2010. Factores de competitividad del cultivo de lechuga en Santa María Jajalpa, Estado de México. *Análisis Económico.* No. 59. Vol. XXV. pp. 144-154.
- Brandl, M. T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:367-392. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143359

- Brandl, M. T., and R. E. Mandrell. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3614–3621.
- Bryan, F. L. 1977. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. *J. Food Prot.* 60:567-578
- Buck J, Walcott R, Beuchat L. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Online. *Plant Health Progress*. En: <http://www.plantmanagementnetwork.org/php/public.asp>. Acceso: 5 de mayo de 2008.
- Carrera R. 2010. Evaluación del efecto de la aplicación foliar de dos fosfonatos en la prevención de enfermedades en el cultivo de cilantro *Cilantro Coriandrum sativum* L. en el cantón Riobamba provincia de Chimborazo. Tesis de grado para ingeniero agrónomo. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 14 p.
- Castro Del Campo, Nohelia, Chaidez Quiroz, Cristobal, Rubio Carrasco, Werner. 2004. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Rev Cubana de Salud Pública*, vol. 30, no. 1, p. 0-0. ISSN 0864-3466.
- Castro-Rosas, J., and E. F. Escartin. 2000. Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. *J. Food Sci.* 65:162–165.
- CDC. 2010. Surveillance for foodborne disease outbreaks: United States. 2007. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59:973-1008.
- Cecchini T. (1978). *Enciclopedia de las Hierbas y de las Plantas Medicinales*. Barcelona, EP: Editorial de Vecchi. S.A.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 55:1045-1046.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of



- fresh spinach. united States, September 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006; 55(38): 1045-46. 11.
- Centro de estudios y control de contaminantes (CESCCO). Calidad microbiológica en productos hortícolas. 2000. En: <http://www.cescco.gob.hm/informes/calidad%20microbiologica%20de%20productos%20horticolas.pdf>. Acceso: el 27 de septiembre de 2008.
- Chung, Y. C., Y. S. Kim, A. Shadchehr, A. Garrido, I. L. Macgregor, and M. H. Sleisenger. 1979. Protein digestion and absorption in human small intestine. *Gastroenterology* 76:1415–1421.
- Cieslak PR, Barrett TJ, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 infection breaks of *E. coli* O157:H7 infections from a manured garden. *Lancet* 1993;342:367.
- Cooley, M. B., Chao, D., and Mandrell, R. E. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce; environmental investigations in the Salinas region of pre-harvest contamination. (Abstr.) *Phytopathology* 97:S138.
- Del Angel, M.B. 1991. Evaluación de Dos Variedades de Cilantro (*Corenandrum sativum* L.) Diferentes Dosis de Fertilización Nitrogenada en la Región de Derramadero, Municipio de Saltillo, Coahuila. Tesis Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
- Díaz R, Salas J, González H, Martínez de Carrillo M. 1995. Producción de hortalizas. Maracay, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara, 206 pp.
- Díaz SR. y Vernon CJ. 1999. Inocuidad Microbiológica de Frutas Frescas y Mínimamente Procesadas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2:133-136
- Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S. y Cabezudo, M.D. 2002. *Effect of different drying methos on the volatile components of parsley (Petroselinum crispum L.)*. *European Food Research and Technology*. 215, 227-230.
- Doyle, M. P. 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12:289–302.
- Doyle, M. P., and Erickson, M. C. (2012). Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *Int. J. Food Microbiol.* 152:54-74.

- Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:925–32.
- Drancourt, M; Bollet, C; Carta, A. y Rousselier, P. **2001**. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(**Pt 3**): 925-32.
- Dreux, N., C. Albagnac, F. Carlin, C. E. Morris, and C. Nguyen-The. 2007. Fate of *Listeria* spp. on parsley leaves grown in laboratory and field cultures. *J. Appl. Microbiol.* 103:1821–1827.
- Environment Agency. *The Microbiology of Drinking Water. Part 1 – Water Quality and Public Health. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*, Bristol, 2002.
- Erwin WH. 1985. *Identification of Enterobacteriaceae*. 4th. Edition, Elsevier. P. 85-89.
- European Commission. Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. En: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.htm). Acceso: el 20 de Octubre de 2008.
- FAO. 2011. Estadísticas de producción de lechuga y achicoria. Faostat.
- FAOSTAT. 2012. Estadística Agrícola mundial. <http://www.faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault>.
- FDA, 1999. Rosa Linda Santos, Investigador, U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Food and Drug Administration (Nogales, Arizona).
- Félix-Fuentes A, Campas-Baypoli N & Meza-Montenegro M. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México. *Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias*. Vol. 6. No. 3. 2005
- Fernández, E E. 1981. *Microbiología Sanitaria Agua y Alimentos*. Vol. 1. Editado por la Universidad de Guadalajara, México. p. 649-648, 652-655, 665-669, 671-673, 683, 686, 704-705, 754-755, 766-769, 774, 795-798, 804-805, 210-215, 330-331.
- Fernández, E. E. 1981. *Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos*. Universidad de Guadalajara, México. Pp. 209-349.

- Fernández, E. E. 2001. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Fernández, E.E. (1981). Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara, México. Pp. 209-349
- Fernández, EE. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Editado por la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. p. 25-27, 69-71, 274-278, 450, 564-567.
- Ficha técnica del cilantro (2016). Consultada el día 25 de Agosto de 2016. Disponible en línea: <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/perejil.pdf>
- Ficha técnica del cilantro (2016). Consultada el día 25 de Agosto. Disponible en línea: <https://www.buenasalud.net/2010/11/22/propiedades-del-cilantro.html>
- Ficha técnica del perejil (2016). Consultada el día 31 de Agosto de 2016. Disponible en línea: <http://www.frutas-hortalizas.com/Hortalizas/Origen-produccion-Perejil.html>.
- Ficha técnica del repollo. Consultada el día 31 de Agosto de 2016. Disponible en línea: [http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/repollo\\_tc\\_m7-315482.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/repollo_tc_m7-315482.pdf).
- Ficha técnica sistemas miniaturizados API. Consultada el día 25 de Octubre de 2016. Disponible en línea: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_SistemasAPI.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf)
- Firoz, Z.A., Alam, M.S. y Udding, S.A. 2009. Effect of sowing time and spacing on lettuce seed production in Hilly Region. Bangladesh J. Agril. Res. 34 (3):531-536.
- Fletcher, J., Leach, J. E., Eversole, K., and Tauxe, R. (2013). Human pathogens on plants: Designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology* 103:306-315.
- Fletcher, J., Leach, J. E., Eversole, K., and Tauxe, R. 2013. Human pathogens on plants: Designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology* 103:306-315.
- Flórez, A. C.; *et al.* Factores relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes de cinco ciudades de Colombia. En: *Infectio*. 2008. Vol. 12, p. 255-266.

- Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological analytical manual online [página de internet]. Maryland: fDA; 2002. [fecha de acceso: julio 2008] Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
- Gandhi, M., S. Golding, S. Yaron, and K. R. Matthews. 2001. Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella* Stanley to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts. *J. Food Prot.* 64:1891–1898.
- García-Gómez R, Chávez-Espinosa J, Mejía-Chávez A, Durán-de-Bazúa C. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.* 2002; 44(1): 24-30.
- García-Gómez R, Chávez-Espinosa J, Mejía-Chávez A, Durán-de-Bazúa C. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.* 2002; 44(1): 24-30.
- García-Villanova, R.B., R.V. (1987). Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. *Int. J. Food. Microbiol.* 285-291
- Geldreich, E. E., and Bordner, R.-H. 1970. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review. *J. Milk Food Technol.* 34:184-195.
- Giese J. Microbial testing of produce-laboratory. *Food Technol.* 2003; 57: 70-3.
- Gould, W. A. 1973. Micro-contamination of horticultural products. *HortScience* 8:116-119.
- Granval N, Graviola JC. 1991. Manual de producción de semillas hortícolas. Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Agropecuaria La Consulta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 82 pp
- Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol REV* 1991; 13:60-68.
- Hall, T. A. **1999**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41(41): 95-98.

- Haller L., Pote J., Loizeau J-L., Wildi W. Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. *Ecol. Indic.* 2009, 9: 540-547.
- Hara-Kudo, Y., H. Konuma, M. Iwaki, F. Kasuga, Y. Sugita-Konishi, Y. Ito, and S. Kumagai. 1997. Potential hazard of radish sprouts as a vehicle of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 60:1125–1127.
- Hedberg CW, MacDonald KI, Osterholm MT. Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. *Clin Infect Dis.* 1994; 18: 671-82.
- Hedrick, U.P. 1972. *Sturtevant's Edible plant of the world.* Eredit. Dever Publications. Inc. New York.
- Hernández C, Aguilera M.G. & Castro G. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* Vol.31. No. 4. 2011
- Heuer, H., Schmitt, H., and Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(3):236-243. doi:10.1016/j.mib.2011.04.009
- Heuer, H., Schmitt, H., and Smalla, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(3):236-243. doi:10.1016/j.mib.2011.04.009
- Hilborn, E. D., Mermin, J. H., Mshar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M. A., Farrar, J. A., Glynn, M. K., and Slutsker, L. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch. Intern. Med.* 159(15):1758-1764.
- Hilborn, E. D., Mermin, J. H., Mshar, P. A., Hadler, J. L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M. A., Farrar, J. A., Glynn, M. K., and Slutsker, L. (1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1998 a. *Microorganisms of Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities.* Aspen Publishers, Inc. Galthersburg, Maryland. USA.

- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. *Listeria monocytogenes*. Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic and Professional Aspen Publishers, Inc. Galtersburg, Maryland. U.S.A.
- Inami, G. B., and S. E. Moler. 1999. Detection and isolation of *Salmonella* from naturally contaminated alfalfa seeds following an outbreak investigation. J. Food Prot. 62:662–664.
- Infoagro (2016). Consultada el día 5 de Septiembre de 2015. Disponible en línea: <http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm>.
- Institute of Food Technologists. 2001. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh cut produce. Food and Drug Administration, Washington, D.C. [Online.] [http://www.cfsan.fda.gov/\\_comm/ift3-toc.html](http://www.cfsan.fda.gov/_comm/ift3-toc.html).
- IRIARTE R., M. M. Interpretación de resultados de análisis microbiológicos en alimentos: James M. 2003. Microbiología Moderna de los Alimentos, ed. Acribia, cuarta edición, España. P. 123-124, 366-369, 481-494.
- Janick, J., 1986. Horticultural Science. 4 ed. W.H Freeman and Co, San Francisco. CA. 746 p.
- Jaques, H.C y Hernández, M.J.L. 2005. Valoración productiva de lechuga hidropónica con la técnica de película de nutrientes (nft). Transferencia de tecnología, Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Reynosa, Tamaulipas. Vol. 3 No. 1. pp. 11-16.
- Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos. Editorial Acribia S.A: Zaragoza (España). 2002, 4 edición, 615 pp.
- Kanki, M; Yoda, T; Tsukamoto, T. y Shibata, T. **2002**. *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. Appl. Environ. Microbiol. 68:3462-3466.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. En: Nat Rev Micro. 2004. Vol. 2, N° 2, p. 123 - 140.
- Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1989; 2:15-38

- Keene W. E.; E. Sazie; J. Kok; D. H. Rice; D. D. Hancock; V. K. Balan; T. Zhao and M. P. Doyle (1997). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *J. Am. Med. Assoc.* 277 (15):1229-1231.
- Konowalchuk, J. J., and J.I. Speirs (1975). Survival of Enteric Virus of Fresh Vegetables. *J. Milk and Food Technol.* 38. 469-472.
- Kudva I. T.; K. Blanch and C. J. Hovde (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1547-1552.
- Lecea E. Recuento de coliformes en productos lácteos. Buenas prácticas para el uso de Placas Petrifilm. 2009.
- Lynch, M. F., and Tauxe, R. V. (2009). Salmonellosis: Nontyphoidal. Chapter 32 in: *Bacterial Infections of Humans*, 4th ed. P. S. Brachman and E. Abrutyn, eds. Springer, New York.
- Lynch, M. F., Tauxe, R. V., and Hedberg, C. W. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol. Infect.* 137:307-315.
- Lynch, M. F., Tauxe, R. V., and Hedberg, C. W. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiol. Infect.* 137(3):307-315. doi:10.1017/ S0950268808001969
- Maroto B.J. 1989 *Horticultura (Herbacea especial)*. Ediciones Mundiprensa. Madrid, España 566 p.
- Matthews, K. R. 2009. Leafy vegetables. Pages 165-189 in: *The Produce Contamination Problem: Causes and Solutions*. G. M. Sapers, E. B. Solomon, and K. R. Matthews, eds. Elsevier Inc., Burlington, VT.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625.
- Méndez E., 2006. Frecuencia y comportamiento de Coliformes termotolerantes, *E. coli* y grupos patógenos de *E. coli*, en ensaladas de verduras crudas listas para su consumo obtenidas en restaurantes. Tesis de licenciatura en Química de

- Alimentos. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Meng, J., M. P. Doyle, T. Zhao, and S. Zhao. 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, p. 193–213. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), Food microbiology: fundamentals and frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Monge R, Chinchilla M, Reyes L. (1996). Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. Rev Biol Trop. 44: 369-75.
- Morgan GM, Newman C, Palmer SR, et al. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. Epidemiol Infect 1988;101:83–91.
- Morgulis, A; Coulouris, G; Raytselis, Y; Madden, T. L; Agarwala, R y Schäffer A. A. **2008**. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. Bioinformatics. 24:1757-1764.
- Na, S. H., K. Miyanaga, H. Unno, and Y. Tanji. 2006. The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment. Appl. Microbiol. Biotechnol.
- Neri, F. 1975. Sanos y Jóvenes con plantas Medicinales. Edit. De Vecchi, S.A. Barcelona, España.
- Nichols, A. A., P. A. Davies, K. P. King, E.J. Winter, and F.L.C. Blackwall (1971). Contamination of Lettuce Irrigated with Sewage Effluent. J. Horti. Sci. 46:425-433.
- Nochebuena Pelcastre Xóchitl (2013). Presencia de *Escherichia coli* 0157:H7 en alimentos y demostración mediante biología celular de algunos factores de virulencia
- Noguera Y., 2005. Frecuencia de *Salmonella*, *E. coli* y Organismos coliformes en ensaladas listas para su consumo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



- Nutrición vegetal (2016). Consultada el día 31 de Agosto de 2016. Disponible en línea: <http://www.yara.com.co/crop-nutrition/crops/brassicas/informacion-esencial/produccion-mundial/>.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). Guías para la calidad de agua potable. Vol. 3. 1988.
- Oregon Health Division. Yet another outbreak of hemorrhagic colitis—Corvallis. Albany, OR: OHD, 1993:42.
- Osorio J, Lobo M. 1983. Hortalizas. Manual de asistencia técnica No. 28. Instituto Colombiano Agropecuario.
- PAHO/INPPAZ. (1996) Foodborne disease outbreaks and cases reported in 1996 to the Regional Information System for the Epidemiological Surveillance of Foodborne Diseases.
- Pajares C. Impacto de la actividad humana y agropecuaria en la calidad sanitaria del agua del río Porcón (Cajamarca). [Tesis de Maestría]. Cajamarca: Escuela de Post Grado, Universidad Nacional de Cajamarca; 2004.
- Papavassiliou, J., S. Tzannetis, H. Leka and G. Michopoulos (1967). Coliaerogenes Bacteria on Plants. J. Appl. Bacteriol. 30: 219-223.
- Park JS, Hong KH, Lee HJ, Choi SH, Song SH, Song KH, et al. Evaluation of three phenotypic identification systems for clinical isolates of *Raoultella ornithinolytica*. J Med Microbiol. 2011;60:492–9.
- Parke, J.L., and Gurian-Sherman, D. (2001) Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Ann Rev Phytopathol* 39: 225–258.
- Paruch A., Mahlum T. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators*. 2012, 23: 140-142.
- Planes de atributos. En: Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. 2006. Vol. 37, p. 35-42.
- Potter ME, Motarjemi Y, Käferstein FK. Emerging foodborne disease. World Health, January-February. 1997: 16-

- Rao, E. V. S. P., Munnu singh, Narayama M. R., Rao B. R. R. 1983. Fertilizer Studies in (Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Hort. Abstr. (53) 4: 2852.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Heigerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Harrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681–685.
- Roberts, D., Hooper, W. y Greenwood, M. 2000. Microbiología práctica de los alimentos. Ed. Acribia S.A.. España. P. 79-81.
- Rosa, I., A. Baéz, and M. Coutiño (1984). Bacteriological quality of crops irrigated with waster water in the Xochimilco plots, Mexico City, Mexico. Appl. Environm. Microbiol. 47(5):1074-1079
- Rubeglio E, Tesone S. *Escherichia coli* O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. Arch Argent Pediatr 2007; 105(3): 193-94
- Ryder, E.J. 1998. Lettuce, Endive and Chicory. CABI Publishing Company. USA. p. 79.
- Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. The microbiological examinations of ready-to eat organic vegetables from retail establishments. LACOTS/PHIS Coordinated Liaison group studies. PHLS environmental surveillance unit. Junio 2001.
- Savageau, M. A. 1974. Genetic regulatory mechanisms and the ecological niche of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:2453–2455.
- Savageau, M. A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. Am. Nat. 122:732–744.
- Seng, P., Boushab, B., Romain, F., Gouriet F., Bruder, N., Martin, C., Paganelli, F., Bernit E., Treut, Y., Thomas, P., Papazian, L., Raoult, D. y Stein, A. 2016. Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. Int J Infect Dis. 45:65-71.
- Simon, J.; Chadwick, A. & Craker, L. 1984. Pars-ley. Family: Apiaceae (Umbelliferae), *Petro-selinum crispum* (Mil.) Nyman ex A.W. Hill. The Scientific literature on select herbs, and aromatic and medicinal plants of the tempera-ture zone. Archon Books. 1:2.

- Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., and Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67(10):2342-2353.
- Solano, O. 2010. Estudio económico y perfil de los productores orgánicos en Puerto Rico, 2007. Tesis de Maestría en Economía Agrícola. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. 128 páginas.
- Steinkamp, G., Wiedemann, B., Rietschel, E., Krahl, A., Giehlen, J., Barmeier, H., and Ratjen, F. (2005) Prospective evaluation of emerging bacteria in cystis fibrosis. *J Cyst Fibros* 4: 41–48.
- Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. *Vol. 71, N° 6*, p. 3041-3048. DOI: 10.1128/aem.71.6.3041-3048.
- Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea - and death. *Ann Intern Med* 1992;117:812–9.
- Talley, J. L., Wayadande, A. C., Wasala, L. P., Gerry, A. C., Fletcher, J., DeSilva, U., and Gilliland, S. E. 2009. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach Vol. 103, No. 4, 2013 315
- Talley, J. L., Wayadande, A. C., Wasala, L. P., Gerry, A. C., Fletcher, J., DeSilva, U., and Gilliland, S. E. (2009). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach Vol. 103, No. 4, 2013 315 leaves by house flies (Diptera: Muscidae). *J. Food Prot.* 72:1547-1552.
- Talley, J. L., Wayadande, A. C., Wasala, L. P., Gerry, A. C., Fletcher, J., DeSilva, U., and Gilliland, S. E. (2009). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach Vol. 103, No. 4, 2013 315 leaves by house flies (Diptera: Muscidae). *J. Food Prot.* 72:1547-1552.
- The World of food Science. Resumen de la situación científica. Enfermedades transmitidas por alimentos. En:

- <http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1001315>. Acceso: el 5 de noviembre de 2008.
- University of Maryland. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: Manual de Formación para Instructores. 2002. En: [http://www.jifsan.umd.edu/pdfs/gaps\\_español/secci-n-v.pdf](http://www.jifsan.umd.edu/pdfs/gaps_español/secci-n-v.pdf). Acceso: el 22 de octubre de 2008.
- Vincent, J.L., Bihari, D.J., Suter, P.M., Bruining, H.A., White, J., Nicolas-Chanoin, M.H., *et al.* (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 274: 639–644.
- Wang G.; T. Zhao and M. P. Doyle (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7): 2567-2570.
- Wang, G., and M. P. Doyle. 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J. Food Prot.* 61:662–667.
- Warner J., 2002. Mexican-style restaurant sauces may contain *E. coli*, Skipping the Sauce May Avoid Montezuma's Revenge. Reviewed by Smith M. Medical News. WebMD
- Warriner, K., and Namvar, A. 2010. The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:131-136.
- Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Delme'e M. Histidine decarboxylase in Enterobacteriaceae revisited. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5923–4.
- Webb, T. A. y Mundt, J. O. 1978. Molds on vegetables at time of harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 655-658.
- Whitaker T, Ryder EJ. 1964. La lechuga y su producción. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, Servicio de Investigaciones Agrícolas, Centro Region-al de Ayuda Técnica, Agencia para el Desarrollo Internacional, México, 53 pp.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. y Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1-2):203-14.

Zheng, B., Zhang, J., Ji, J., Fang, Y., Shen, P., Ying, C., Li, L. **2015**. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* Coproducing IMP-4 and KPC-2 Carbapenemases in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(11): 7086–7089.