BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ingeniería Química

Colegio De Ingeniería En Alimentos

"Transmisión e internalización de *Escherichia coli* en diferentes etapas de desarrollo de tejidos de espinaca (*Spinacia oleracea*)"

Tesis profesional

Para obtener el título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

Oscar Jiménez González

Director de tesis:

Asesora interna:

Dra. María Lorena Luna Guevara

Asesora externa:

Dra. Mónica Rosales Pérez

Puebla, Pue. Julio de 2015

BUAP

Oficio No. FIQ/AC/932/2014
Asunto: Registro de Tema de Tesis

C. OSCAR JIMÉNEZ GONZÁLEZ
PASANTE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS
PRESENTE:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Alimentos cuyo titulo es el siguiente:

"TRANSMISIÓN E INTERNALIZACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO DE TEJIDOS DE ESPINACA (*SPINACIA OLERACEA)*"

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	**ANTECEDENTES**
CAPÍTULO 2	**METODOLOGÍA**
CAPÍTULO 3	**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Directora de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara
Co-Directora de Tesis: Dra. Mónica Rosales Pérez

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**

Atentamente
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., 11 de septiembre del 2014

M.I.C. MA. GPE. TITA VAZQUEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARIA ACADÉMICA

C.c.p. Directora de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara
Co-Directora de Tesis: Dra. Mónica Rosales Pérez

Facultad de Ingeniería Química
Av. San Claudio s/N, Col. San Manuel, Ciudad Universitaria, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251

CTC03

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Ingeniería Química ( )
Ingeniería Ambiental ( )
Ingeniería en Alimentos (X)
Ingeniería en Materiales ( )
Ingeniería Agroindustrial ( )

Matricula: 200911425

Al C. Sustentante Oscar Jiménez González

De acuerdo a la **presentación y revisión** de la **tesis**:

"Transmisión e Internalización de la Escherichia Coli en diferentes etapas de desarrollo de tejidos de espinaca (spinacia oleracea)"

se aprueba la impresión y empastado de la misma.

Jurado de examen profesional:

		Firma
Presidente:	Dr Juan José Luna Guevara	
Secretario:	Dra. Maria Elena Ramos Cassellis	
Vocal:	Dra Maria Lorena Luna Guevara	

Fecha de examen: 10 de Julio de 2015

H. Puebla de Zaragoza a 30 de Junio de 2015.

Agradecimientos

A mis padres, maestros y amigos.

Agradezco a toda mi familia, sobre todo a mis padres, Mamá por todos los regaños y el apoyo que me ayudó para seguir estudiando y lograr mi objetivo, papá por todo el apoyo constante durante esta larga etapa, sin duda han sido mi más gran ejemplo durante toda la vida.

A mis amigos por ayudarme en esas horas interminables y no dejar que desertara, Julio gracias por todos los días que sin saber que hacer me ayudabas y te burlabas de mí, pero jamás me dejaste solo te agradeceré siempre, Gaby porque un verdadero amigo es quien te conoce y comprende y festeja contigo en tus logros y se burla per te acompaña en tus fracasos y Jordi por todo el bullying que nos demostramos pero siempre estas para escucharme, a ustedes gracias por sus risas y buenos momentos.

A mis asesoras de tesis Dra. Lorena Luna Guevara que además de maestra ha sido una amiga, por tantos años de trabajo, aprendizaje y además por permitirme se participe de tantos proyectos que definitivamente me ayudaron a llegar aquí, Dra. Mónica. Rosales Pérez, sin su ayuda y enseñanzas el camino hubiera sido más largo.

Al INECOL unidad de microscopía óptica avanzada-BIOMimic, en especial a la Dra. Greta Rosas Saito y el Dr. Luis Alberto Cruz Silva por el apoyo brindado.

Al instituto de fisiología en especial al biólogos José Luis Córdova de la Luz Laboratorio de microscopía del instituto de fisiología de la BUAP y al Dr. Cesar F. Pastelin Rojas perteneciente al departamento de biología y toxicología de la reproducción de ICUAP de la BUAP.

A todos los conejos usados, pues fue la peor parte de este trabajo.

A mi compañera de tesis Carolina Berenice Díaz González porque me hizo odiarla tantas veces y seguir siendo amigos.

ÍNDICE

Contenido

I.	Introducción	1
II.	Objetivos	5
i	Objetivo general	5
ii	Objetivos particulares	5
III.	Marco teórico	6
1	Capítulo 1 Generalidades	6
1.1	Importancia y datos de consumo	7
1.2	Beneficios según la etapa de crecimiento de la espinaca	9
1.2.1	Brote	9
1.2.2	Hoja	9
2	Capítulo 2 Factores de contaminación	11
2.1	Químicos	11
2.2	Físicos	13
2.3	Biológicos	14
2.3.1	*E. coli* en alimentos	15
2.3.2	Sobrevivencia de *E. coli* como factor de contaminación	16
2.3.3	Crecimiento de *E. coli* en hortalizas	17
3	Capítulo 3 Incidencia y brotes asociados al consumo de vegetales crudos	18
3.1	Brotes asociados al consumo de espinaca cruda	19
3.1.1	Brotes en México	20
3.2	*Escherichia coli*	20
3.2.1	Características generales	23
3.2.1.1	Composición de la pared celular de *E. coli*	24
3.2.1.2	Membrana Externa	24
3.2.1.3	Estructuras accesorias	25
3.2.2	*E. coli* enteropatogenica (EPEC)	26
3.2.3	*E. coli* enterotoxigénica (ETEC)	27
3.2.4	*E. coli* enterohemorrágica (EHEC)	27
3.3	Mecanismos de sobrevivencia de *E. coli*	27
3.3.1	Adherencia bacteriana en vegetales crudos	28
3.3.2	Adherencia de *E. coli* en vegetales crudos	29
3.3.2.1	Formación de biopelículas	30
3.3.3	Internalización de *E. coli*	32
IV.	Metodología	33
4.1	Etapa 1. Obtención del Microorganismo	34
4.1.1	Preparación del microorganismo	34

4.1.2 Resistencia de microorganismo 35
4.1.3 Preparación del inóculo 35
4.2 Etapa 2. Cultivo del material vegetal 36
4.2.1 Desinfección de las semillas 37
4.2.2 Esterilización del agua de riego y del sustrato 37
4.2.3 Siembra y condiciones de crecimiento 38
4.3 Etapa 3.Inoculación y pruebas microbiológicas 40
4.3.1 Inoculación del agua de riego y sustrato 40
4.3.2 Inoculación de la semilla 40
4.3.3 Recuento microbiano en los diferentes tejidos 41
4.4 Etapa 4. Microscopías para confirmar la adherencia e internalización 44
4.4.1 Detección de E. coli por microscopía electrónica de barrido (SEM) 44
4.4.2 Obtención de la muestra (tejido vegetal) 45
4.4.3 Microscopía electrónica de barrido 46
4.4.4 Obtención de los anticuerpos 47
4.4.5 Obtención del antisuero de *E. coli* 47
4.4.6 Inmunización de los conejos para la obtención de los anticuerpos 48
4.4.7 Recuperación del paquete celular 50
4.4.8 Microscopía inmunofluorescencia 51
4.4.9 Obtención de la muestra (tejido vegetal) 51
4.5 Etapa 5. Análisis estadístico 54
V. Resultados y discusión 55
5.1 Desarrollo vegetal 55
5.2 Comparación entre los dos métodos de recuperación de *E. coli* 57
5.3 Análisis de los recuentos de *E. coli* para M1 de acuerdo con el mecanismo de transmisión 61
5.4 Análisis de los recuentos de *E. coli* para M2 de acuerdo con el mecanismo de transmisión 65
5.5 Microscopías 69
5.5.1 Microscopía de epifluorescencia 69
5.5.2 Microscopía confocal 72
5.5.3 Microscopía electrónica de barrido 81
VI. Conclusiones y recomendaciones 88
VII. Bibliografía 90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Exportación en toneladas de espinaca en el mundo dividido por continente en el año 1999	8
Tabla 2	Crecimiento del volumen de importación de productos hortofrutícolas en EEUU. (2000-2006)	8
Tabla 3	Composición de la espinaca por cada 100 g de parte comestible cruda, %de CDR (cantidad diaria recomendada)	10
Tabla 4	Características de los patotipos de *E. coli* diarrogénica para el humano	22
Tabla 5	Relación entre los métodos de recuento y tipo de microscopías para confirmar el crecimiento de *E. coli*	44
Tabla 6	Diseño experimental	54
Tabla 7	Análisis estadístico ANOVA de los recuentos promedio de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) entre los métodos utilizados en los análisis microbiológicos	58
Tabla 8	Análisis estadístico ANOVA para evaluar el efecto del tiempo de recuperación de los recuentos en *E. coli* (Log_{10} UFC/g)	59
Tabla 9	Valores de los recuentos microbianos de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) considerando los tres mecanismos de transmisión y como método de recuento M1 (colonización superficial)	63
Tabla 10	Valores de los recuentos microbianos de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) considerando los tres mecanismos de transmisión y como método de recuento M2 (colonización superficial e internalización)	67
Tabla 11	Relación entre los métodos de recuento, mecanismos de sobrevivencia y tipo de microscopía para evaluar el crecimiento de *E. coli* a diferentes tiempos en y tipos de tejidos de espinaca	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Características físicas de la espinaca *Spinacia oleracea*	6
Figura 2	Incidencia de enterobacterias que se asocian a bacteriemia	21
Figura 3	Colonización intestinal de bacterias patógenas en humanos	23
Figura 4	Estructura del lipopolisacárido de membrana externa	24
Figura 5	Formación de la biopelícula	31
Figura 6	Internalización de bacterias en tejidos vegetales (a y b) raíces de espinaca después de 7 días de crecimiento inoculadas con *E. coli* O157:H7, (c) internalización de bacterias en tejidos de lechuga	32
Figura 7	Diagrama general de trabajo considerando las diferentes etapas de la metodología	33
Figura 8	Subdiagrama de la etapa 1 referente a la obtención del microorganismo	34

Figura 9	Pruebas básicas IMViC	35
Figura 10	Subdiagrama de la etapa 2 referente a los materiales para la siembra	36
Figura 11	Desinfección de semillas con solución de hipoclorito de sodio al 2.6% y enjuague de las mismas	37
Figura 12	Peat Moss musgo, del género *Sphagnum*	37
Figura 13	Colocación del sustrato (5g) en los almácigos	38
Figura 14	Almácigos para siembra de espinacas	38
Figura 15	Colocación y siembra de las semillas de espinacas en los almácigos	39
Figura 16	Subdiagrama de la etapa 3 referente a la inoculacion de los materiales para el cultivo de espinaca	40
Figura 17	Subdiagrama de la etapa 3 referente a las pruebas microbiológicas	41
Figura 18	Método de dilución seriada para el recuento en placa	42
Figura 19	Diluciones seriadas de las muestras	43
Figura 20	Siembra de diluciones en agar EMB con ácido nalidíxico	43
Figura 21	Recuento de *E. coli* en cajas agar eosina azul de metileno	43
Figura 22	Subdiagrama de la etapa 4 referente a la microscopía electrónica de barrido	44
Figura 23	Deshidratadora a punto crítico Quorum K850	45
Figura 24	Porta muestras para microscopio electrónico de barrido	45
Figura 25	Ionizadora de metales Quorum Q150R S	46
Figura 26	Microscopio electrónico de barrido QUANTA FEG 250	46
Figura 27	Subdiagrama de la etapa 4 referente a las microscopías por inmunofluorescencia, para el tratamiento de la muestra (continuación)	47
Figura 28	Centrífuga marca eppendorf, marca 5810 R para la obtención del antisuero de *E. coli*	48
Figura 29	Conejas New Zealand White lista para inmunización	49
Figura 30	Manejo de conejas New Zealand para inyectar a los conejos	49
Figura 31	Confirmación de estimulación de reacción inmunológica para la producción de anticuerpos	49
Figura 32	Obtención de la sangre de las conejas	50
Figura 33	Recolección de la sangre para obtención de suero inmune	50
Figura 34	Separación del coágulo de sangre del suero del conejo	50
Figura 35	Subdiagrama de la etapa 4 referente a la microscopía por inmunofluorescencia.	51
Figura 36	Cortes de los tejidos utilizando un micrótomo (MICROM HM 505 EVP) a 30 µm	52
Figura 37	Preparación de las muestras para su observación por epifluorescencia	53
Figura 38	Microscopio confocal marca Leica TCS SP8 acoplado a un microscopio invertido DMI 6000CS	53

Figura 39 Crecimiento de las plantas según los diferentes mecanismos de transmisión a) semilla inoculada, b) sustrato inoculado y c) agua inoculada 55
Figura 40 Crecimiento de las plantas para el control, semilla, agua y suelo desinfectado 57
Figura 41 Etapas de crecimiento de la espinaca a) 72 horas, b) 360 horas y c) 720 horas 57
Figura 42 Comparación del comportamiento de *E. coli* inoculada en agua suelo y semilla considerando dos métodos de recuento y recuperación: a) M1: recuento superficial b) M2 recuentos superficial y con internalización y c) comparación entre M1 y M2. Los valores promedio con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre los recuentos de *E. coli* 60
Figura 43 Crecimiento de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) en plantas de espinaca, las cuales provinieron de: a) Semilla, b) Suelo y c) Agua inoculados, considerando el método M1 para el recuento y recuperación 62
Figura 44 Crecimiento de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) en plantas de espinaca, las cuales provinieron de: a) Semilla, b) Suelo y c) Agua inoculados, considerando el método M2 para el recuento y recuperación 66
Figura 45 Corte transversal de tejido de tallo (30µm) tras haber sido inoculado el sustrato y con crecimiento de 720 horas, observado mediante microscopía de epifluorescencia a 40x y un filtro en rojo. EC; *E. coli* 70
Figura 46 Corte transversal de tejido de tallo (30µm) tras haber sido inoculado el sustrato y con crecimiento de 720 horas, observado mediante microscopía de epifluorescencia a 60x y un filtro en verde. EC; *E. coli* 70
Figura 47 Corte transversal de tejido de hoja (30µm) tras haber sido inoculada el agua y crecido durante 720 horas, mostrado mediante microscopio de epifluorescencia y observada con 60x y un filtro en rojo. EC; *E. coli* 71
Figura 48 Corte longitudinal de hoja (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada el agua de riego, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos. EC; *E. coli* 73
Figura 49 Corte transversal de raíz (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada el agua de riego, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos. EC; *E. coli* 74
Figura 50 Corte transversal de tallo (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada el agua de riego, microscopía confocal a 63x. A) Campo 74

verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos
Figura 51 Cortes transversal de raíz (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada la semilla, microscopía confocal a 63x A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos 76
Figura 52 Cortes longitudinal de hoja (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada la semilla, microscopía confocal a 63x A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos 77
Figura 53 Cortes transversal de tallo (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada la semilla, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos. EC; *E. coli* 77
Figura 54 Cortes longitudinal de hoja (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculado el suelo, microscopía confocal a 63x A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos 79
Figura 55 Cortes transversal de raíz (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculado el suelo, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos 79
Figura 56 Cortes transversal de tallo (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculado el suelo, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos 80
Figura 57 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 500µm 81
Figura 58 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 5µm. EC; *E. coli*. A; Adherencia, B; Biopelícula 82
Figura 59 Corte de tallo de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 500µm 82
Figura 60 Corte de tallo de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 5µm. EC; *E. coli*. A; Adherencia, B; Biopelícula 83
Figura 61 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 1mm. PR; Pelos radicales de la raíz 84

Figura 62 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 20µm. EC; *E. coli*. A; Adherencia, B; Biopelícula, PR; Pelos radicales de la raíz 85
Figura 63 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 50µm. EC; *E. coli*, A; Adherencia, Es; Estoma, B; Biopelícula 86
Figura 64 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 20µm. EC; *E. coli*, A; Adherencia, B; Biopelícula 86

I. Introducción.

Una alimentación saludable puede ayudar a prevenir ciertas enfermedades, por esa razón hoy en día se presta más atención a incluir en la dieta alimentos que además de tener un mayor valor nutritivo, aporten algunos compuestos bioactivos, vitaminas, alto contenido en fibra, etc, (Ponce de León *et al*., 2011).

De acuerdo con Gil *et al*., 2010., Van Duyn y Pivonka (2000), el consumo de una dieta rica en frutas y hortalizas previene al consumidor de numerosos padecimientos incluyendo el cáncer y cardiopatías coronarias. Entre los mecanismos que explican las propiedades de las frutas y los vegetales en la prevención del cáncer se basa en que estos alimentos son fuente de vitaminas y minerales, carotenoides y otros antioxidantes, incluyendo un gran número de fitoquímicos, como ditioltionas, flavonoides, glucosinalatos y compuestos relacionados.

Entre los tejidos vegetales que se consumen en mayor cantidad se encuentran los germinados o brotes, los cuales son alimentos que se caracterizan por contener un alto contenido de nutrientes el cual puede ser igual o mayor al de las hortalizas de tamaño normal, con la ventaja de ofrecer un sabor mucho más suave y delicado (Ponce de León, *et al*., 2013). De acuerdo con Bressani *et al*., (1984) la germinación se define como un proceso que incrementa la biodisponibilidad de nutrientes y la palatabilidad de ciertos alimentos. Durante la germinación, las semillas necesitan ciertas condiciones ambientales favorables, como la presencia de oxígeno, luz, temperatura y humedad que determinan el desarrollo del olor y el sabor de los germinados (Dávila *et al*., 2003 y Pamplona, 1999). Del mismo modo existe una tendencia por adquirir mini hortalizas, también conocidas como hortalizas “baby” o “enanas”, que constituyen un producto importante y saludable en las dietas alimenticias en los países en desarrollo y en países desarrollados de América del Norte y Europa Occidental, asimismo, el concepto de mini hortaliza se encuentra

ligado a las necesidades de un consumidor cada día más exigente en calidad. Lo que lleva a un cambio en el consumo orientado a la diversificación de especies y no tanto al incremento en el volumen.

Dentro de los productos comerciales que han encontrado un lugar dentro del mercado, se encuentran los tomates cherry, las zanahorias o las lechugas, y las espinacas baby, estas últimas son un excelente recurso natural de vitaminas fibras y minerales, que en comparación con las carnes, aporta pocas calorías y no contiene grasas. Es también rica en fitonutrientes, especialmente el beta-caroteno y la luteína, convirtiéndola en un vegetal con propiedades antioxidantes que nos protegen del daño celular por ejemplo sus tallos son más ricos en fibra que las hojas. Todos estos tipos de hortalizas se cultivan utilizando las mismas prácticas agrícolas que las hortalizas tradicionales y requieren de un mayor control con el fin de poder obtener productos de excelente calidad.

Gran parte de los vegetales son consumidos crudos en ensaladas para conservar el sabor natural y preservar los nutrientes termolábiles. Particularmente los germinados son de los pocos alimentos que se consumen cuando se encuentran en las primeras etapas de desarrollo, debido a que estos presentan características propias de las hortalizas del ciclo vegetativo corto que van de tres a diez días según la especie y son cultivados bajo condiciones de manejo intensivo. Las espinacas baby son un alimento rico en enzimas aminoácidos y proteínas, clorofila, vitaminas, minerales y oligoelementos (Nestlé, 1997; Kirli *et al*., 1999).

Aunado a las diferentes propiedades nutricionales de los tejidos vegetales, estos productos son asociados con casos de enfermedades transmitidas en alimentos (ETAS), debido al proceso de cultivo (producción), cosecha y distribución pueden verse expuestos a una gran variedad de factores de contaminación suscitando preocupación entre los organismos de salud pública y los consumidores en cuanto

a su inocuidad (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). Entre los posibles riesgos van desde las prácticas agrícolas inadecuadas, falta de higiene en las fases de crecimiento hasta la venta al consumidor, empaques o venta inadecuada (Khurdiya, 1995). Ejemplos de casos relacionados con el consumo de vegetales crudos se han reportado a nivel mundial, se encuentra el caso reportado el 12 de octubre del 2006 por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y en el estado de California se detectó un brote de *Escherichia coli* O157:H7 proveniente de una finca de espinacas, dicho brote era proveniente de la materia fecal de ganado de dicha finca. Otro reporte fue comunicado por la Comisión europea RASFF (2011), quien confirmó la existencia de toxiinfecciones alimentarias en Francia asociadas al consumo de germinados frescos distribuidos desde el Reino Unido. Asimismo autoridades alemanas (COMM ESPRESSO, 2011) asociaron un brote de *E. coli* con el consumo de diferentes tipos de germinados producido en una granja de Hamburgo en Alemania.

Existen investigaciones que reportan que el periodo de germinación de las semillas de espinaca varía de 3 a 4 días y durante este periodo la semilla es más propensa a contaminación. Con referencia a Castro-Rosas y Escartín, 2000, se observó que *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi*, y *E. coli* O157:H7 se multiplican activamente en las primeras horas de germinación de la semilla y no después de que el germinado presenta 24 horas de crecimiento.

El riesgo de contaminación por microorganismos patógenos en germinados no se limita únicamente a su presencia en el alimento, sino que reside en función de la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y proliferar en la tierra y sobre las verduras (Fernández, 2000). Del mismo modo, cualquier factor que prolongue la sobrevivencia o incremente los niveles del patógeno en el germinado, aumenta el riesgo para el consumidor.

De acuerdo con Fernández (2000), los factores como humedad, temperatura, tipo de suelo, flora competitiva, luz solar, entre otros, tienen gran impacto en el comportamiento microbiano.

Otros reportes indican que existe un incremento en los brotes de gastroenteritis asociados con *Salmonella entérica* y *E. coli*, mismos que son considerados los principales contaminantes de frutas, hortalizas y semillas. *Salmonella entérica* incluida *sv. Typhimurium* 14028 y *E. coli,* fueron encontrados en tomates, lechugas alfalfa, cilantro, con poblaciones mayores a 10^5-10^7 UFC/g (Dong, *et al*., 2003 y Noel, *et al*., 2010). Del mismo modo se han reportado múltiples brotes de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 asociados con brotes de semillas. Particularmente en el 2006, un brote asociado con el consumo de espinaca pre-empacada ocurrió en 26 estados de EUA, dando como resultado 183 enfermos confirmados y 3 muertos (Centers for Disease Control and Prevention, 2006; Grant *et al*., 2008, Wendel *et al*, 2009).

Por lo tanto, es importante tomar en cuenta el comportamiento de los microorganismos patógenos asociados al consumo de vegetales crudos incluyendo germinados y hortalizas miniaturas, con la finalidad de tener un mejor control de las enfermedades que provocan.

Por lo cual se realizó el presente trabajo para evaluar el efecto que tiene la inoculación de *E. coli* directamente en la semilla de espinaca, en el agua de riego y en el suelo de cultivo, para determinar cuál de estos factores afectan el crecimiento de las plantas de espinaca durante las primeras etapas de desarrollo. Además, se determinó en qué etapa de crecimiento de la planta existe internalización de la bacteria, comparándolo con los recuentos que pueden presentarse adheridos a la superficie de la planta.

II. Objetivos

i. Objetivo general.

Estudiar el comportamiento de *E. coli* inoculada mediante diferentes mecanismos de transmisión en agua de riego, sustrato y semilla durante el desarrollo del cultivo de espinaca. Asimismo se evaluarán los mecanismos de sobrevivencia de *E. coli* (internalización o adherencia) en diferentes estadios de crecimiento como brote, tallo y plántula.

ii. Objetivos particulares.

- Establecer las condiciones de crecimiento de la planta de espinaca hasta la obtención de hojas verdaderas.
- Evaluar el desarrollo de *E. coli* inoculada en agua de riego, sustrato y semilla durante las diferentes etapas de crecimiento en el cultivo de espinaca.
- Confirmar la capacidad de internalización de *E. coli* en diferentes tejidos como brote, tallo y hoja mediante microscopía de inmunofluorescencia.
- Confirmar la capacidad de adherencia de *E. coli* en diferentes tejidos como brote, tallo y hoja mediante microscopía electrónica de barrido.

III. Marco teórico.

CAPÍTULO 1

1. Generalidades

La espinaca (*Spinacia oleracea* L.) es un vegetal anual, rico en compuestos que promueven la salud incluyendo algunas vitaminas (vitamina C y A), fibra dietética, minerales y especialmente hierro (Toledo *et al*., 2003).

En relación con la descripción botánica este vegetal es considerado una planta de crecimiento lento, consiste en un pequeño tallo alrededor del cual crece un manojo de hojas sacciformes, lisas (Casseres, 1980), presenta un peciolo largo, limbo de color verde medio, algo abullonado que llega alcanzar 30 cm de longitud y otros tantos en base triangular alto apuntado, con extremidad redondeada, algunas de sus características se muestran en la figura 1 (Kader, 2007).

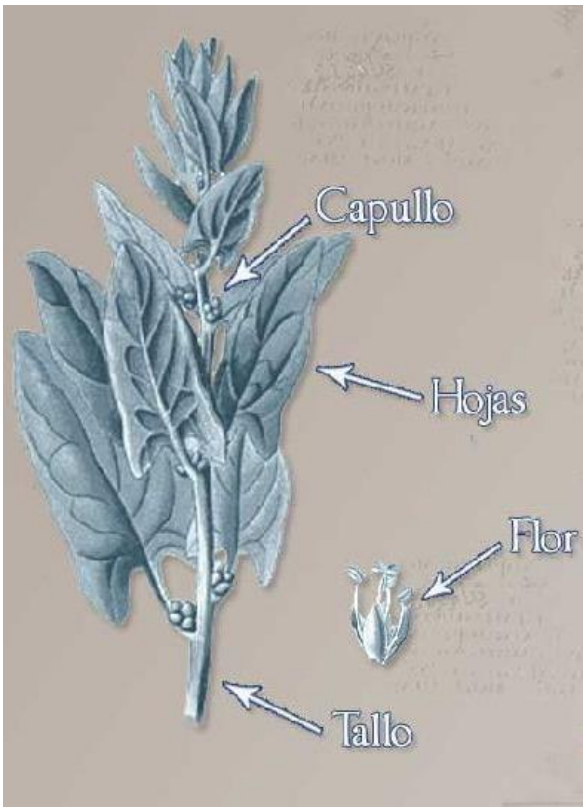

Figura. 1 Características físicas de la espinaca *Spinacia oleracea*.

Asimismo la espinaca tiene una tasa de respiración relativamente alta al igual que el nivel de pérdida de agua lo cual propicia que sea más propensa a la descomposición por el crecimiento microbiano (Hodges y Forney, 2003; Conte *et al*., 2008), y pérdida de nutrientes (Bergquist *et al*., 2006; Pandrangi y Laaborde, 2004); de ahí que se recomiende un tratamiento de preenfriamiento después de la cosecha y almacenamiento en condiciones con temperatura alrededor de 7.5°C y humedad relativa mayor a 90%, pudiendo incrementar significativamente la vida útil del tejido de 10 a 14 días (Kader, 2002; SAGARPA, 2008).

Reportes indican que la variedad de hoja lisa se comercializa congelada o enlatada y su consumo está más extendido que en el caso de la variedad rizada. Esta última suele comercializarse en forma fresca porque resiste muy bien el transporte y está adaptada para crecer en invierno (Eroski, 2014), normalmente se cosechan a las 6 o 7 semanas de crecimiento. Uno de los problemas más serios con la espinaca es que tiende a marchitarse o producir un pedúnculo floral el cual destruye el valor de la planta (Casseres, 1980; Halfacre, 1984).

1.1 Importancia y datos de consumo

La espinaca es un cultivo importante en muchos países, cuya germinación puede llevarse a cielo abierto en vez de condiciones controladas, sin embargo los plantíos se vuelven más propensos a enfermedades (Muslim *et al*., 2003; Horinouchi *et al*., 2010).

Reportes recientes por el Economic Research Service, (2010), consideran que se ha impulsado el consumo de espinaca fresca y como consecuencia la producción de este vegetal se ha incrementado notablemente propiciando un ingreso de 61.1 millones de libras en 1970 a 623.9 millones de libras para el 2009. Los datos de la publicación FAO del año 2000 indican que la producción mundial es de 7, 755,161

toneladas de espinaca y está distribuida por continentes como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1 Exportación en toneladas de espinaca en el mundo dividido por continente en el año 1999.

Continente	Toneladas
África	85,000
Asia	6,872,577
Europa	512,675
América norte y central	266,890
Oceanía	7,200
Sudamérica	10,819
Total	7,755,161

Fuente: FAOSTAT Database Results (2000) (http://www.fao.org)

Por otra parte cabe resaltar que el volumen de importación de hortalizas frescas en EU fue del 13.8% en el año 2000 ya que tuvo un incremento aproximado de 17% en 2004. En estos años el volumen de importación de hortalizas de hoja verde también aumentó notablemente, siendo México el principal exportador de espinaca como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2 Crecimiento del volumen de importación de productos hortofrutícolas en EEUU. (2000-2006).

Hortalizas	Cambios en el volumen importado 2000 – 2005 (%)	Principal país exportador	Consumo per cápita
Espinacas	314	México	2.3
Lechuga	303	México	20.3
Champiñones	62	Canadá	2.6
Cebolla	51	México/ Perú	21.2
Espárragos	48	Perú	1.2
Pimiento morrón	60	México	6.6
Jitomate	36	México	20.6
Brócoli	28	México	5.6
Pepino	28	México	6.5

Fuente: http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/ers/89011/Table072.xls

En México esta hortaliza se cultiva principalmente en tierras de riego, en un total de trece estados. De acuerdo con datos del SIAP los principales estados productores son: Puebla con 428 hectáreas de superficie cosechada, lo que da una producción anual de 3,768 toneladas, le sigue Baja California con 181 hectáreas y 1,510 toneladas anuales, el Distrito Federal con 125 hectáreas y 1,141 toneladas, Coahuila con 122 hectáreas y la producción anual con 4,510 toneladas (Tecnoagro, 2010).

1.2 Beneficios según la etapa de crecimiento de la espinaca

1.2.1. Brote

Recientemente los productos frescos germinados han ganado popularidad con los consumidores en años recientes (Xiao *et al*., 2012). Las verduras recién cortadas o de crecimiento temprano empacadas, son productos alimenticios populares, ya que son convenientes, saludables y listos para comer. Estos son un ingrediente popular en diferentes platillos y recientemente, han tomado gran popularidad en varias culturas (Wigmore, 1986). Además de ser considerado un producto vegetal barato y fácil de cultivar, los germinados son conocidos por proporcionar altas concentraciones de vitaminas, minerales, enzimas y aminoácidos (Meyerowitz, 1999 a, b). Debido a la creciente demanda de los consumidores, la industria de estos productos se ha expandido rápidamente (Chua *et al*., 2008; Kim *et al*., 2005). Los germinados o espinacas baby son plantas tiernas cotiledóneas, con hojas desarrolladas completamente cuando el primer par de hojas verdaderas emergen completamente o parcialmente. Comparados con hojas más maduras lo germinados tienen un color más atractivo, sabor intenso y textura tierna (Xiao *et al*., 2012).

1.2.2. Hoja

Es un vegetal rico que contiene varios nutrientes, como carotenoides, vitaminas, ácido fólico y hierro. Varias funciones biológicas basadas en estos nutrientes han sido reportadas, luteína, una no-provitamina A carotenoide, ha sido, por ejemplo,

fuertemente implicado como agente protector contra la degeneración muscular (Johnson, 2000; Riso, *et al*., 2004). Asimismo hay fracciones de glucopéptidos que han reportado efectos sobre la actividad de la DNA polimerasa en mamíferos y la proliferación de células de cáncer (Kuriyama *et al*., 2005). Mientras que Pamplona, (2003) reporta que la espinaca es un vegetal cuya composición nutrimental es relevante por su elevado contenido de proteínas (2,86%) y reducido composición en hidratos de carbono (0.8%) y grasa (0.35%) aportando solamente 22 calorías por cada 100g (Tabla 3).

Tabla 3 Composición de la espinaca por cada 100 g de parte comestible cruda, %de CDR (cantidad diaria recomendada) cubierta por 100g de este alimento.

Composición	Cantidad
Energía	22,0 kcal
Proteínas	2.86 g
Hidrato de carbono	0.800 g
Fibra	2.70 g
Vitamina A	672 µg ER
Vitamina B1	0.078 mg
Vitamina B2	0.189 mg
Niacina	1.37 mg EN
Vitamina B6	0.195 mg
Folato	194 µg
Vitamina B12	-
Vitamina C	28.1 mg
Vitamina E	1.89 mg EαT
Calcio	99.0 mg
Fosforo	49.0 mg
Magnesio	79.0 mg
Hierro	2.71 mg
Potasio	558 mg
Zinc	0.530 mg
Grasa total	0.350 g
Grasa saturada	0.056 g
Colesterol	-
Sodio	79.0 mg

Fuente; (Pamplona, 2003).

Capítulo 2

2. Factores de contaminación.

Los contaminantes son sustancias extrañas dispuestas en el ambiente a causa de las actividades realizadas por el hombre, ya sea en la industria o el hogar. A través de los parámetros ecológicos de aire, agua y suelo, los contaminantes pueden depositarse en vegetales y animales y en consecuencia en los alimentos derivados de estos (Schmidt-Hebbel, 1986).

Particularmente las frutas y verduras pueden encontrarse expuestas a contaminación por microorganismos patógenos antes, durante, y después de su cosecha. En la pre-cosecha las plantas pueden contaminarse en el campo a través del uso del agua de riego contaminada, como las aguas negras o parcialmente tratadas, agua reciclada, así como mediante el uso de estiércol animal para la fertilización (Ibekwe, *et al*., 2010; Gagliardi y Karns, 2002; Wachtel, *et al*., 2002). En la post-cosecha destacan la maquinaria y equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos (Beuchat, 1996).

2.1. Químicos.

Este tipo de contaminación se da por la presencia de determinados sustancias químicas o tóxicas en los alimentos, que pueden resultar nocivos a corto, mediano o largo plazo. Existen diferentes tipos de contaminantes donde destacan los tóxicos ambientales y agrícolas (ELIKA, revisado en 2014).

Los contaminantes tóxicos ambientales pueden contenerse en los alimentos como consecuencia de las malas prácticas de agrícolas. Dentro de estos contaminantes se encuentran los metales que pueden acumularse en los cultivos, ya sea a través

de su absorción por el agua de riego contaminada, por la tierra a través de las raíces o por la deposición en el follaje de partículas aéreo transportadoras (Liva *et al*., 2013).

En el suelo, los metales pesados, pueden estar presentes en forma de iones libres o disponibles, compuestos de sales metálicas solubles o bien, compuestos insolubles o parcialmente solubles en forma de óxidos, carbonatos e hidróxidos (Pineda, 2004), dentro de los metales pesados, los denominados oligoelementos pueden servir como micronutrientes para los cultivos, ya que son requeridos en pequeñas cantidades y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital, donde pasado cierto umbral se vuelven tóxicos como el B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Fe, Se y Zn y el metaloide As. También hay metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva aparejada disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos, elementos tales como el Cd, Hg, Pb, Sb, Bi, Sn, Tl (García y Dorronsoro, 2005). Cuando el contenido de metales pesados en el suelo alcanzan niveles que rebasan los límites máximos permitidos causan efectos inmediatos como inhibición del crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, y un disturbio funcional en otros componentes del ambiente así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo, conocido como polución de suelos (Martín, 2000).

La capacidad de las plantas para bioacumular metales y otros posibles contaminantes varía según la especie vegetal y la naturaleza de los contaminantes. Los metales pesados pueden ser absorbidos por las plantas dependiendo de su disponibilidad en el suelo y de los mecanismos de selectividad propios de cada especie, variedad y genotipo (Mor y Ceylan, 2008; Liva *et al*., 2000).

Por último los contaminantes agrícolas pueden estar presentes debido al uso de plaguicidas sintéticos para diversos fines, (agricultura, ganadería, etc.), por lo cual se han contaminado casi todos los sustratos del ambiente biótico y abiótico; esto ha ocurrido a causa de la fácil dispersión de estos compuestos y, principalmente, por la gran persistencia de muchos de ellos en el medio ambiente (Albert y Rendón-Von Osten, 1988). Dicha contaminación de los ecosistemas ha originado problemas muy graves como el de la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos. Con respecto a los vegetales, los plaguicidas pueden incorporarse por medio de las raíces al ser absorbidas junto con los nutrientes que necesitan como vía de alimento, o a través del agua y aire como medios de translocación y dependiendo de su movilidad en dichos medios (Lucho *et al*., 2005)

En general este tipo de contaminación puede darse de manera accidental durante etapas como el transporte, el almacenamiento o elaboración de los mismos por los manipuladores, al permitirse el contacto de alimentos con sustancias tóxicas como plaguicidas, combustibles, lubricantes, pinturas, detergentes, desinfectantes u otros.

2.2. Físicos.

Se considera contaminación física del alimento, a cualquier objeto presente en el mismo y que no deba encontrarse allí, y sea susceptible de causar daño o enfermedad a quien lo consuma (OIRSA, 2000). Específicamente las frutas y hortalizas, pueden contaminarse de manera natural con el polvo y tierra durante el proceso de cosecha, manejo y almacenamiento, de igual forma por los trabajadores que no llevan a cabo de manera adecuada las buenas prácticas de manufactura. Asimismo durante el proceso de lavado y procesamiento de los alimentos es posible que se dejen caer cabello, uñas, o accesorios personales (aretes, pulseras, anillos, etc) o durante el transporte y distribución pueden contaminarse con materiales

extraños como lo son espinas, cristales, trozos de madera, astillas, entre otros (Díaz-Sobac y Vernon-Carter, 1990).

La principal causa de este tipo de contaminación se debe a la falta de buenas prácticas de higiene y del lugar en donde se almacenan los alimentos, así como por mala manipulación del material con el que se trabaja.

2.3. Biológicos.

Frutas frescas y vegetales, incluyendo componentes de la planta como hojas, raíces, bulbos y tubérculos, tienen diferentes morfologías y funciones metabólicas por consecuencia proveen diversos nichos ecológicos para microorganismos (Brackett, 1999; Burnett y Beuchat, 2000; Ponce, Roura, del Valle, y Fritz, 2002).

La contaminación biológica se produce por seres vivos, tanto microscópicos como no microscópicos. Los riesgos particulares que presentan este tipo de contaminación son que una vez que los microorganismos han contaminado el alimento, tienen la capacidad de crecer en él, y que pueden presentar un riesgo para la salud del consumidor cuando se trata de microorganismos patógenos, ya que no alteran de manera visible el alimento (Rodríguez, *et al*., 2005). Se ha demostrado que este tipo de contaminación ocurre por lo general en el campo, principalmente por el riego de los cultivos con aguas negras o con estiércol de animales de sangre caliente utilizados para fertilizar la tierra de cultivo (Bryan, 1977; Lund, 1992).

La presencia y número de microorganismos difiere, dependiendo del tipo de producto, las prácticas agrícolas, el área geográfica de producción, y las condiciones ambientales post-cosecha, cosecha, transporte, procesamiento, y la

manipulación de los productos puede influir en gran medida en la microbiota presente en los vegetales (Ahvenainen, 1996; Olaimat y Holley, 2012).

Entre los vegetales a partir de los cuales han sido aislados patógenos se mencionan: achicoria, espárrago, brotes de soja y alfalfa, brócoli, repollo, coliflor, lechuga, zanahoria, espinaca, setas, tomates, pepinos, etc. (Díaz y Vernon, 1999). Según León (2007), entre los principales patógenos humanos aislados a partir de estos vegetales se encuentran: *Aeromonas spp (A. hydrophila)* (Mittelman, 1998), *Cryptosporidium spp, Cyclospora cayetanensis,* ETEC, *E. coli* O157:H7 (EHEC) (Schuhegger, 2006).

2.3.1. *E. coli* en alimentos.

A pesar de la creciente importancia de los productos frescos como vehículo de agentes patógenos humanos, actualmente existe un limitado conocimiento acerca de dónde se produce la contaminación en la cadena de suministros o sobre el mecanismo por el cual los agentes patógenos humanos colonizan y sobreviven en las frutas y verduras. Uno de los microorganismos más importantes y que se utiliza como indicador de alimentos contaminados es *E. coli* (Michanie, 2003).

Las vías de transmisión más comunes para *E. coli* son el agua, en productos cárnicos y lácteos, así como en frutas y hortalizas mal lavadas, o bien, lavadas con agua contaminada (Castañeda, 2000). La presencia de *E. coli* se ha convertido en la actualidad, en una de las bacterias enteropatógena de mayor preocupación en la industria alimentaria, debido a que se le ha catalogado como uno de los principales agentes causantes de epidemias por contaminación de alimentos, provocando en el humano, severo trastornos gastrointestinales, principalmente en niños y ancianos (Fena, 1996).

2.3.2. Sobrevivencia de *E. coli* como factor biológico de contaminación.

La filósfera se caracteriza por una serie de condiciones ambientales extremas y con frecuencia fluctuantes, combinados con características fisicoquímicas, a las cuales los microorganismos desarrollan adaptaciones que les permiten crecer en estos hábitats. Los patógenos humanos normalmente no se consideran como parte de la población microbiana de la filósfera pero es evidente que pueden encontrarse.

Muchos estudios se han realizado sobre el comportamiento y la sobrevivencia de los patógenos humanos en las plantas. La mayoría se han centrado en *E. coli* (sobre todo *E. coli* O157:H7) y *Salmonella*, rociado o aplicado directamente sobre el follaje de las plantas por una serie de técnicas o aplicada sobre semillas, raíces o en el suelo, cuando se aplica directamente sobre el follaje, tanto *E. coli* como *Salmonella* pueden sobrevivir en perejil en el campo alrededor de 177 y 231 días respectivamente (Islam *et al*., 2004). Rociar las plantas de lechuga con agua contaminada con *E. coli* O157:H7 (Solomon *et al*, 2003) resultó en la recuperación del agente patógeno en el follaje después de 30 días. El riego de superficie y riego por aspersión con suspensiones de *E*. *coli* O157:H7 también permitió la recuperación del patógeno en tejidos de lechuga.

En un solo estudio, seis patógenos humanos incluyendo bacterias y virus fueron encontrados, los cuales pueden sobrevivir durante 14 días en la filósfera de melón, lechuga y pimiento en condiciones de ambiente controlado (Stine *et al*., 2005), lo que demuestra que los patógenos humanos pueden sobrevivir en importantes cultivos durante períodos comercialmente relevantes.

2.3.3. Crecimiento de *E. coli* en hortalizas.

Hasta el día de hoy, diversos estudios e investigaciones sobre *E. coli* en hortalizas como modelo de contaminación accidental de agua, suelo, o actividades humanas no higiénicas, se ha concentrado ante todo en el análisis de riesgo de los cultivos documentados como fuentes de epidemias. En lechuga u otras hortalizas y frutas, como pepino, melón, sandía, alfalfa y rábano se han reportado que existe una alta posibilidad de sobrevivencia y crecimiento, siempre y cuando existan las condiciones de temperaturas apropiadas. Estas condiciones de temperaturas no son raras en la cadena de distribución convencional y de manejo en el servicio de alimentos y puede existir mayor posibilidad en lugares de venta directa al consumidor (Adbul-Raouf, *et al*., 1993).

En los últimos años, la *E. coli* O157: H7 se ha aislado cada vez con mayor frecuencia a partir de los productos frescos, incluyendo brotes de soya, melones, manzanas y lechuga (Ackers, *et al*., 1998; Hillborn, *et al*., 1999). Los mecanismos por los cuales el agente patógeno se presenta en la planta de lechuga no se conocen completamente, sin embargo, una hipótesis afirma que la planta se contamina cuando se cultiva en campos fertilizados con estiércol tratado inadecuadamente, riego con aguas contaminadas (Beuchat, 1999).

Capítulo 3

3. Incidencia y brotes asociados al consumo de vegetales crudos

Como ingrediente importante en una dieta saludable se encuentran los vegetales, ya que su consumo previene y protege de numerosas enfermedades como el cáncer y problemas cardiovasculares. Sin embargo el consumo de frutas y vegetales de vegetales de hoja verde son consumidos en crudo (Berger, *et al*., 2010).

De igual manera el consumo de germinados crudos ha resultado cada vez más popular entre los consumidores conscientes de su salud (Xiao *et al*., 2012), por lo cual estos pueden estar contaminados por bacterias entéricas, virus y parasitarios, resultando ser un vehículo para la transmisión de estos agentes (Amoah, *et al.,* 2007). Asimismo varios brotes de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157 han sido asociados con semillas germinadas (Mahon *et al*., 1997; Michino *et al*., 1999; Taormina *et al*.,1999; Van Beneden *et al*., 1999; Breuer *et al*., 2001; Honish y Nguyen, 2001; Mohle-Boetani *et al*., 2001; Proctor *et al*., 2001; Stratton *et al*., 2001; Center for Disease Control and Prevention, 2002; van Duynhoven *et al*., 2002; Winthrop *et al*., 2003; Ferguson *et al*., 2005; Emberland *et al*., 2007; Erickson y Doyle, 2007; Werner *et al*., 2007).

De acuerdo con el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (Center of Disease Control and Prevention) CDC, los vegetales contribuyeron a nivel mundial durante el periodo de 1973 a 1987 con el 5% de las enfermedades trasmisibles por alimentos (ETAs) (Center of Disease Control, 1988). Asimismo, desde 1973 a 2009 se han reportado a nivel mundial más de 40 brotes de enfermedades asociadas al consumo de germinados crudos (Waje *et al*., 2009). Otro reporte significativo durante el 2010 iniciando en Arizona, se relaciona con el brote multiestatal causado por el consumo de lechugas romanas contaminadas con *Escherichia coli* O145 provocando 34 casos de enfermedades (Anónimo, 2010). Mientras que en Europa reportes recientes asocian al serotipo O104:H4 de *Escherichia coli* presente en

brotes o germinados de fenogreco causando 50 muertes y más de 4,000 hospitalizaciones en 16 países (WHO, 2011). En este mismo año en California, lechugas romanas contaminadas con *Escherichia coli* O157:H7 crecidas en este estado, fueron las responsables de causar un brote multiestatal con 60 infecciones (Anónimo, 2012).

Las fuentes de contaminación de los vegetales pueden darse durante la producción, recolección, transporte y preparación o durante el procesamiento. Normalmente las fuentes de contaminación animal son usualmente heces, ya sean en el agua o en el suelo (Slifko, Smith, y Rose, 2000).

El nivel de contaminación depende de diversos factores los cuales incluyen, entre otros, el uso de agua sin tratar y suministros de aguas contaminadas con aguas residuales para el riego, condiciones antihigiénicas durante la pos-cosecha y o bien condiciones inadecuadas durante la preparación de los alimentos en establecimientos o en casa (Beuchat, 2002; Simoes *et al*., 2001). Entre los agentes patógenos involucrados se encuentran principalmente *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Bacillus cereus* (Fett, 2006).

3.1 Brotes asociados al consumo de espinaca cruda

Particularmente los brotes asociados con alimentos contaminados por *Escherichia coli* son un problema grave, específicamente en Estados Unidos, se estima que anualmente ocurren más de 73,000 casos de infección y 61 muertes cada año (Seto, Soller, y Colford, 2007). El CDC (2006 a, b), reportó dos brotes de enfermedades por *Escherichia coli* enterohemorrágica asociados a espinacas baby empacadas y lechuga picada, cobro 3 vidas y 254 personas enfermas. En septiembre 13 del 2006, funcionarios de la CDC fueron alertados por epidemiólogos en Wisconsin y Oregón que la espinaca fresca era la principal sospechosa de pequeños brotes de

Escherichia coli O157:H7. En esa misma fecha en Nuevo México se reporta un brote por consumo de espinacas frescas, para el 26 de septiembre un total de 183 personas infectadas con brotes de *Escherichia coli* O157:H7 fueron comunicadas por la CDC, provenientes de 26 estados diferentes en Estados Unidos (CDC, 2006).

3.1.1 Brotes en México

Cravioto *et al*., (1985) reportan que en México el principal agente etiológico de diarrea es *E. coli*, tres grupos de patógenos de *Escherichia coli* son endémicos: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) (Fernández, 2000).

Otro trabajo publicado, reportó el 28% de aislamiento para EPEC y 13% para ETEC en un estudio de casos y controles, en la Ciudad de México (Valdespino, 1994). En 1990 se encontró que ETEC causa la diarrea del viajero en todo el mundo y es endémica de nuestro medio (Guerrant, 1990). Y un año después se aisló la cepa EHEC en 17% de un grupo de niños que vivían en una comunidad rural (Benítez *et al*., 1991).

3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es la especie predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo en muchas especies de animales y se elimina por las heces, es un bacilo Gram negativo que se aísla con mayor frecuencia en pacientes con septicemia (figura 2). Varios de los patogrupos de *Escherichia coli* pueden resultar no patogénicos sin embargo varios pueden causar infecciones en el tracto urinario, otras pueden causar la muerte por diarrea y aumentar el número en la mortalidad infantil, en la Tabla 4 se describen las características de algunos patogrupos de *Escherichia coli.*

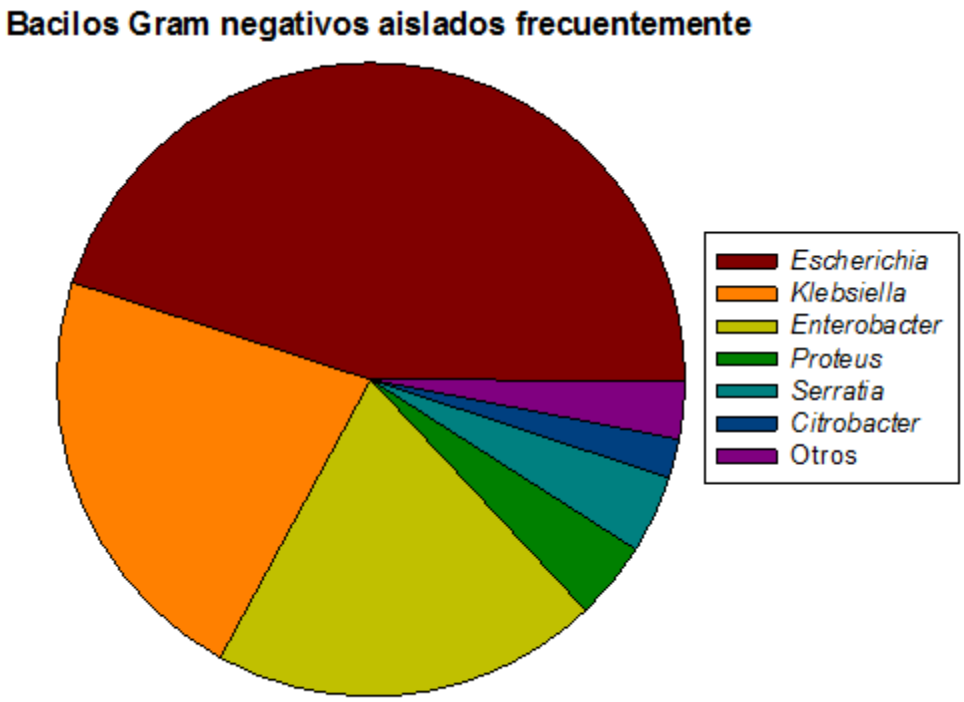

Figura. 2 Incidencia de enterobacterias que se asocian a bacteriemia. (Barnes-Jewish Hospital, St. Louis.)

Podemos encontrar a *E. coli* en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal. Las cepas patógenas pueden producir importantes infecciones entéricas (diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteremias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, e infecciones respiratorias y de heridas) en seres humanos y animales (Martínez, 2007). El grupo de los EHEC/VTEC/STEC, es un grupo de cepas de *E. coli* capaces de producir toxinas, muy similares a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. En este grupo se han descrito dos tipos de toxinas: la toxina Shiga 1 (Stx1) o verotoxina 1 (VT1), que difiere de la verdadera toxina Shiga en uno a siete aminoácidos y la toxina Shiga 2 (Stx2) o verotoxina 2 (VT2), que comparte un 60% de homología con Stx1. A pesar de estas diferencias con la verdadera toxina Shiga (Stx) se consideran que todas las toxinas Stx1 y Stx2 pertenecen a la familia de las toxinas Shiga, de ahí la denominación de

E. coli productoras de toxinas Shiga (STEC). Las toxinas Stx activas pueden detectarse utilizando el test de toxicidad en células Vero, por lo que también se denomina a este grupo como *E. coli* verotoxigenicos o productores de verotoxinas (VTEC) (Martínez, 2012).

Tabla 4 Características de los patotipos de *E. coli* diarrogénica para el humano.

	Patotipos				
	EPEC	ETEC	EIEC	EHEC	EAEC
Edad afectada.	Lactantes	Mayores de cinco años	Todas las edades	Todas las edades	Todas las edades
Tipo de diarrea.	Secretora	Secretora	Inflamatoria	Inflamatoria	Persistente y aguda
Serotipos o serogrupos	O26:H11 O55:H6 O86:H34 O111:H2 O114:H O127:H9	O6:H11 O8:H9 O11:H27 O20:NM O25:H42 O78:H11	O28ac:H11 O29:NM O112ac:NM O124:H30	O26:H11 O45:H2 O111:H8 O121:H19 O157:H7	O44:H18 O55 O111 O125 O126 O128
Factor de virulencia	Adherencia localizada Adherencia íntima Esfacelamiento	Enterotoxinas ST y/o LT Factores antigénicos de colonización	Invasividad	Citotoxinas similares a shiga	Adherencia agregativa Toxinas Pet y Pic Sideróforos
Distribución geográfica	Niños menores de 2 años Distribución mundial	Mundial	Países en vías de desarrollo	Mundial	Mundial
Codificación de virulencia	Plásmidos de 60 mDa Genes *aea*	Plásmidos de 60 mDa	Plásmidos de 130 mDa	Fagos	Plásmidos de 60 mDa

(Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM)

3.2.1. Características generales

Las células de *Escherichia coli* presentan forma de bacilo, alrededor de 3 micrómetros de largo y alrededor de 1 micrómetros de diámetro. *E. coli* es una bacteria no termodúrica, susceptible a la congelación y descongelación, desecación y acidez excesiva (FDA, 1998).

Conforme las células van creciendo, tienden alargarse en un medio nutritivo y se dividen en el centro. El proceso de duplicación celular le lleva aproximadamente, 20 minutos, la célula tiene una pared de tres capas delgadas (Membrana citoplasmática, pared celular y membrana externa) que encierra un número relativamente homogéneo de otros organelos. Además *E. coli* contiene ciertos, filamentos delgados y rectos llamados pili, los cuales son capaces de adherirse a sustratos específicos, y filamentos más gruesos largos y helicoidales, llamados flagelos que hace capaz a la bacteria pueda desplazarse como se muestra en la figura 3.

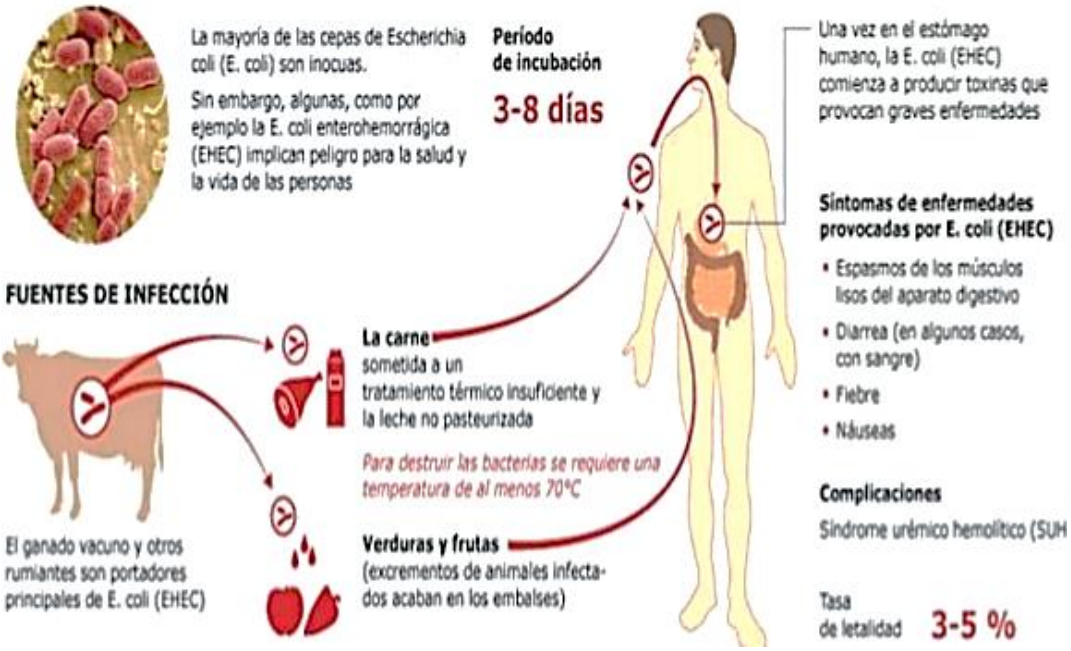

Figura. 3 Colonización intestinal de bacterias patógenas en humanos.

3.2.1.1. Composición de la pared celular de *E. coli.*

En las células bacterianas, la pared de peptidoglicano es la estructura que determina la morfología y protege a la bacteria de la lisis osmótica. En bacterias Gram negativas es el sitio de anclaje de la membrana externa (Ruiz, 2008). En los últimos años, se demostró que la morfología celular juega un rol importante en la regulación de funciones bacterianas como son la adhesión, movilidad, dispersión, diferenciación polar, depredación y diferenciación celular (Young, 2006).

3.2.1.2. Membrana Externa.

La membrana externa de tipo bicapa proteo-lipídica de *E. coli* está conformada por más de un millón de moléculas de lipopolisacáridos (LPS), formados por tres dominios covalentemente unidos: 1) lípido A, endotoxina; 2) core, región bisagra, oligosacáridos fosforilados no repetitivos; 3) antígeno O, polímeros de oligosacáridos inmuogénicos repetidos (1-40 unidades) (Scheutz y Strockbine, 2005) en la figura 4 se muestra un ejemplo de la estructura externa celular.

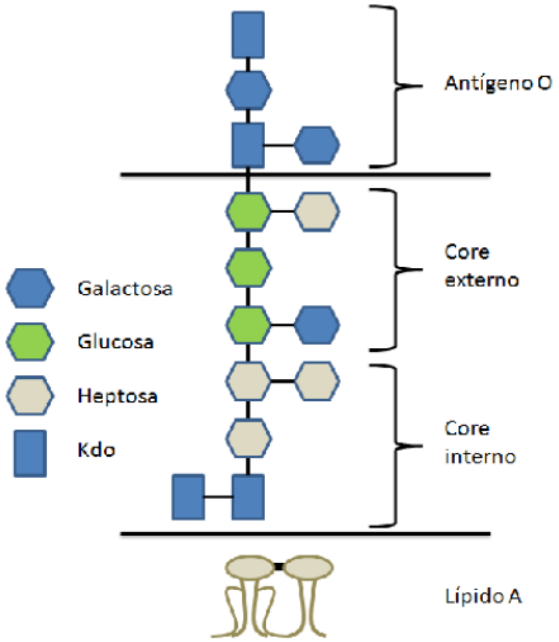

Figura. 4 Estructura del lipopolisacárido de membrana externa.

3.2.1.3. Estructuras accesorias.

Las cepas de *E. coli* móviles, normalmente poseen entre 5 y 10 flagelos por célula, distribuidos al azar alrededor de la superficie (flagelación perítrica). El filamento flagear mide alrededor de 0.02 µm de diámetro y puede alcanzar más de 0.20 µm de longitud. Consiste en subunidades de una única proteína, flagelina, la cual está codificada en el gen fliC (Sheutz y Strockbine, 2005).

Las fimbrias son estructuras filamentosas largas compuestas por cientos de copias de una subunidad mayor, denominada fimbrilina, *E. coli* puede expresar simultáneamente más de 200 copias del filamento, lo que representa esta acción como el mayor gasto de energía. La función primaria de las fimbrias que es la adhesión, esta medida por un componente menor llamado adhesina la cual puede estar localizada en el extremo del filamento y en algunos sitios a lo largo del mismo. Ayudando a la adhesividad a los tejidos hospedadores y a los compuestos circundantes, es una de las características más importantes de *E. coli* la cual se ve reflejada en el elevado número de tipos de adhesinas y sus altos niveles de expresión sobre la superficie bacteriana. La capacidad de adhesión es determinante, en el proceso de colonización bacteriana y ayuda a *E. coli* a resistir los mecanismos de defensa del hospedador.

Los inconvenientes en definir un tipo de fimbria, proceden principalmente de las variaciones inmunológicas, dentro y a través de las mismas, así como de las variaciones en las secuencias menores de la subunidad adhesina. Mientras que las variaciones serológicas de las fimbrias, están determinadas por la estructura de la subunidad mayor llamada fimbrilina, una pequeña variación en la secuencia de la subunidad menor (adhesina), puede ocasionar profundos efectos en la adhesión; por lo tanto, la identidad serológica y la función biológica pueden variar independientemente (Westerlund-Wikström y Korhonen, 2005).

La construcción de las fimbrias requiere el plegamiento coordinado, secreción y montaje ordenado de múltiples subunidades proteicas. En *E. coli* las fimbrias pueden ensamblarse por diversas vías, incluyendo la de las chaperonas (la más frecuente entre cepas patógenas) y la de ensamblaje de pili tipo IV (Sauer *et al*., 2000).

Aunque la mayoría de las adhesinas están compuestas por varias subunidades que posteriormente se ensamblan, otras están compuestas por una única proteína de membrana externa. Estas incluyen adhesinas de la familia autotransporte e intimina y cada una juega roles muy diferentes en la patogénesis bacteriana (Le Bouguénec, 2005).

Cualquiera que sea el patotipo de *E. coli*, la habilidad de adherencia a las células epiteliales es un factor esencial en el proceso de colonización de las células hospedadoras y en el futuro desarrollo del proceso infeccioso (Le Bouguénes, 2005).

3.2.2. *E. coli* enteropatogenica (EPEC)

Cepas de EPEC causantes de diarrea, no producen la toxina shiga, en adultos sanos, la diarrea causada por EPEC puede ser iniciada por una dosis de 10^8 a 10^{10} UFC, aunque es probable que se necesite una dosis menor para niños (Donnenberg *et al*., 1998). EPEC es una de las mayores causas de diarrea en el mundo, con brotes poco frecuentes en los países desarrollados (Nataro y Kaper, 1998).

3.2.3. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

En su mayor parte, *E. coli* representa el tipo más común de *E. coli* diarreogénica en países en desarrollo donde los patógenos son endémicos. Los niños pequeños que viven en las regiones endémicas tienen más probabilidades que los adultos de infectarse con ETEC y desarrollan una enfermedad grave, pues se ha demostrado que la inmunidad aumenta con la edad. Estudios han demostrado que ETEC ataca con mayor frecuencia a niños menos de 3 años de edad así como a hombres más que a mujeres. En México, por ejemplo, ETEC fue reportado por causar diarrea en un 37.5% de 32 niños menores de 2 años (Manning, 2010).

3.2.4. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Diferentes serotipos de EHEC se han relacionado con la etiología de la diarrea esporádica en adultos, en brotes asociados a la ingesta de alimentos contaminados, causando colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica. Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países con climas templados como los Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Argentina, Alemania y Japón (Eslava, 2014). Dentro de este serotipo se incluye a *E. coli* O157:H7, la cual ha sido una causa importante en brotes de enfermedades causadas por agua y alimentos en varios países desarrollados.

3.3. Mecanismos de sobrevivencia de *E. coli*

A diferencia de otros miembros de las enterobacterias asociadas a plantas, *E. coli* no produce enzimas capaces de degradar los polímeros de la pared celular de las plantas y su genoma no codifican homólogos de pectinasas y hemicelulasa (Abbott, 2007; Rodionov, 2004). Por lo tanto puede proliferar dentro de los tejidos de la planta sin degradar su estructura (Kyle, 2010).

3.3.1. Adherencia bacteriana en vegetales crudos

Los microorganismos residentes en la superficie de hojas de verduras se encuentran sujetos a condiciones estresantes que comprometen su viabilidad, por ejemplo, cambios en la humedad relativa, luz ultravioleta, entre otras. La capacidad para superar esas adversidades contribuye a establecer la diferencia entre una bacteria patógena a la planta o no (Wilson *et al*., 1999). Específicamente los reportes vinculados con semillas o germinados contaminados demuestran que las etapas en las cuales pueden presentar contaminación son durante la cosecha, empacado y distribución (Andrews *et al*., 1982). Asimismo en base a evidencias epidemiológicas, así como el aislamiento directo en las semillas utilizadas para la germinación se han encontrado que pueden ser una de las fuentes más comunes de estos patógenos (Fett, 2006).

Las bacterias y otros microrganismos tienen una tendencia natural a adherirse a las superficies como un mecanismo de sobrevivencia. Después de la etapa inicial de la colonización bacteriana a la superficie, las células pueden formar una biopelícula que consta de microorganismos inmovilizados en una variedad de compuestos poliméricos, generalmente conocido como polímeros extracelulares (Aruajo *et al.,* 2010). Otros factores que repercuten en la adherencia de las bacterias en el alimento son los flagelos (Meadows, 1971). Los flagelos desempeñan un papel en la adhesión bacteriana y la colonización, debido a que las bacterias deben tocar la superficie para rápida fijación (Butler, *et al*., 1979; Dickson y Rosenberg, 1990; Herald y Zottola, 1988; Husmark y Ronner, 1990). La unción de las bacterias a las superficies se ha reportado que puede ser un proceso de dos fases. En la primera fase, las células se asocian con la superficie a través de la solución, generando una sorción reversible, y en la segunda fase, después de transcurrido un lapso de tiempo la sorción se vuelve irreversible mediante el desarrollo de polímeros viscosos (Firstenberg-Eden *et al*., 1979). Mientras que Reina *et al*., (2002) observó la adhesión a las superficies de pepino fresco en suspensiones acuosas, demostrando

que la adherencia dependía del tiempo de incubación, las especies y de la concentración de inóculo y la temperatura.

3.3.2. Adherencia de *E. coli* en vegetales crudos

La adherencia a la superficie de las hortalizas es un requisito previo para la colonización y la posterior transmisión de patógenos a través de las partes comestibles de las plantas. De hecho, una vez realizada la adherencia, es muy difícil eliminar los patógenos de frutas y verduras contaminadas por lavado (Beuchat y Scouten, 2002).

Entre los mecanismos relacionados con la adherencia de *E. coli* O157 y otros patógenos se encuentra la formación de biopelículas bacterianas, las cuales se forman cuando se encuentran en medios nutricionalmente deficientes (agua, suelo y superficies inertes) (Sanz *et al*., 1998). De acuerdo con Rangel (2005), los biopelículas son comunidades bacterias que viven adheridas a superficies mediante fimbrias y exopolisacáridos producidos por las mismas bacterias. Se ha encontrado que *E. coli* O157 y *Salmonella* entérica serovar Typhimurium se unen a los tejidos por mecanismos alternativos, específicamente en *E. coli* se encuentran implicados el sistema de agregación tipo III, flagelos y fimbria curli, junto con la celulosa, siendo los componentes mayoritarios de la matriz extracelular de la biopelícula (Ryu y Beuchat, 2005). La transcripción de la unidad proteica de curli (CsgA) está regulada por el Csg D y por un regulador metabólico general (Crl) (Van Houd y Michiels, 2005). Distintos fenotipos de curli han sido identificados en los patotipos de *E. coli* enteropatógeno (EPEC) y *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) (Brokrans *et al*., 2005).

E. coli O157:H7 es capaz de expresar múltiples adhesinas fimbriales y no fimbriales que no tienen un rol específico en la patogenicidad, pero pueden estar involucrados en la adhesión de superficies (Torres, 2005). Por ejemplo, puede expresar fimbrias

curli delgadas, las cuales son raramente reportadas en *E. coli* O157:H7 comparados con otras cepas patógenas de *E. coli* (Uhlich, 2001). Se ha reportado que la matriz proteica extracelular eucariótica ayuda a mejorar la formación del biopelícula de *E. coli* O157:H7 en superficies inertes (Cookson, 2002). La formación de la biopelícula puede incrementar la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 y dar como resultado una protección contra muchas condiciones ambientales.

3.3.2.1 Formación de biopelículas

Las biopelículas que se encuentran en la naturaleza consisten en comunidades de microorganismo primarios viables y no viables protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) polianiónicas fijadas a la superficie (Chmielewski, 2003). Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas con un porcentaje de agua entre 85 y 95%. Las EPS protegen a los microorganismos que hacen parte de la biopelicula contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes (Carpentier y Cerf, 1993).

Dependiendo del tipo de células involucradas en la biopelícula, las colonias pueden estar formadas por 10-25% de células y 75-90% de matriz EPS (Garret, *et al*., 2008). Los requisitos para el crecimiento de la biopelícula son la presencia de microorganismos y el sustrato; si alguno de estos no se encuentra disponible, la biopelícula no se formará.

El proceso de formación de las biopelículas inicia con la adherencia de células a la superficie formando colonias, con la producción de EPS y una subsecuente maduración de la biopelícula como se muestra en la figura 5.

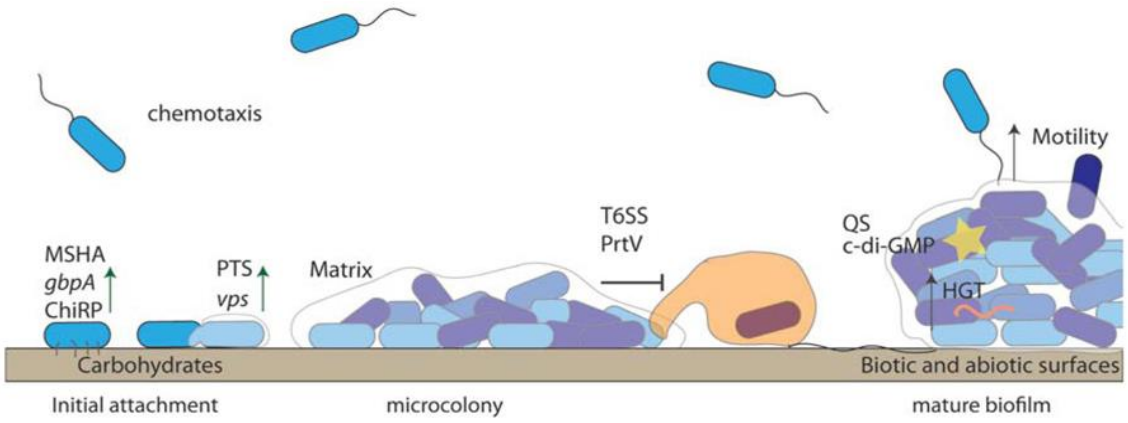

Figura. 5 Mecanismo de formación y maduración de la biopelícula por bacterias adheridas en la superficie.

El mecanismo de adhesión al sustrato puede ser activo o pasivo dependiendo de la motilidad de las células. Una adhesión pasiva se da por la gravedad, difusión y dinámica del fluido. En una adhesión activa la superficie de la célula bacteriana facilita el proceso. Los flagelos, permiten la movilidad de las células hasta el sitio específico de adhesión y los pili, proteínas de adhesión, cápsulas y carga de las superficies, facilitan el proceso de agregación y adhesión (Chmielewski, 2003).

En la segunda fase, un número de células adsorbidas reversiblemente, permanecen inmovilizadas y se adsorben irreversiblemente por los apéndices de la bacteria (flagelos, pili y fimbrias), el contacto de los apéndices estimula las reacciones químicas de oxidación e hidratación, permitiendo la formación de enlaces con la superficie (Stephens, 2002), y habilitan la asociación irreversible con la superficie. Este tipo de uniones toman entre 20 minutos hasta cuatro horas para formarse, a una temperatura de 20ºC (Chmielewsk, 2003), pero son tan fuertes que impiden la remoción de estas colonias ya formadas.

1.3.3. Internalización de *E. coli*

La internalización es el fenómeno mediante el cual las raíces de las plantas absorben microorganismos y los transportan hacia las hojas y tallos aéreos (Figura 6). Algunos estudios realizados en laboratorio y cámaras de crecimiento indican que las hortalizas de hoja pueden absorber *E. coli* y de esta manera contaminarla y ser consumidas por el ser humano (Koike *et al*., 2014). Asimismo se han descrito casos de internalización de *E. coli* O157 en tomates (Ibarra-Sánchez *et al*., 2004). La presencia de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica viable se ha encontrado en tejidos internos de brotes de rábano y estomas procedentes de semillas experimentalmente contaminadas con la bacteria (Itoh *et al*., 1998).

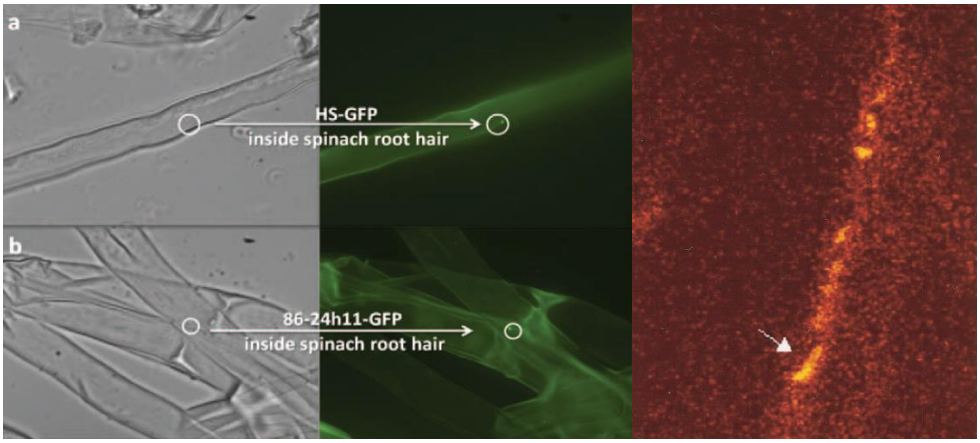

Figura. 6 Internalización de bacterias en tejidos vegetales (a y b) raíces de espinaca después de 7 días de crecimiento inoculadas con *E. coli* O157:H7, (c) internalización de bacterias en tejidos de lechuga.

IV. Metodología

Se presenta un diagrama general de trabajo (figura 7) dividido por etapas en las cuales se hace una descripción general y breve del trabajo.

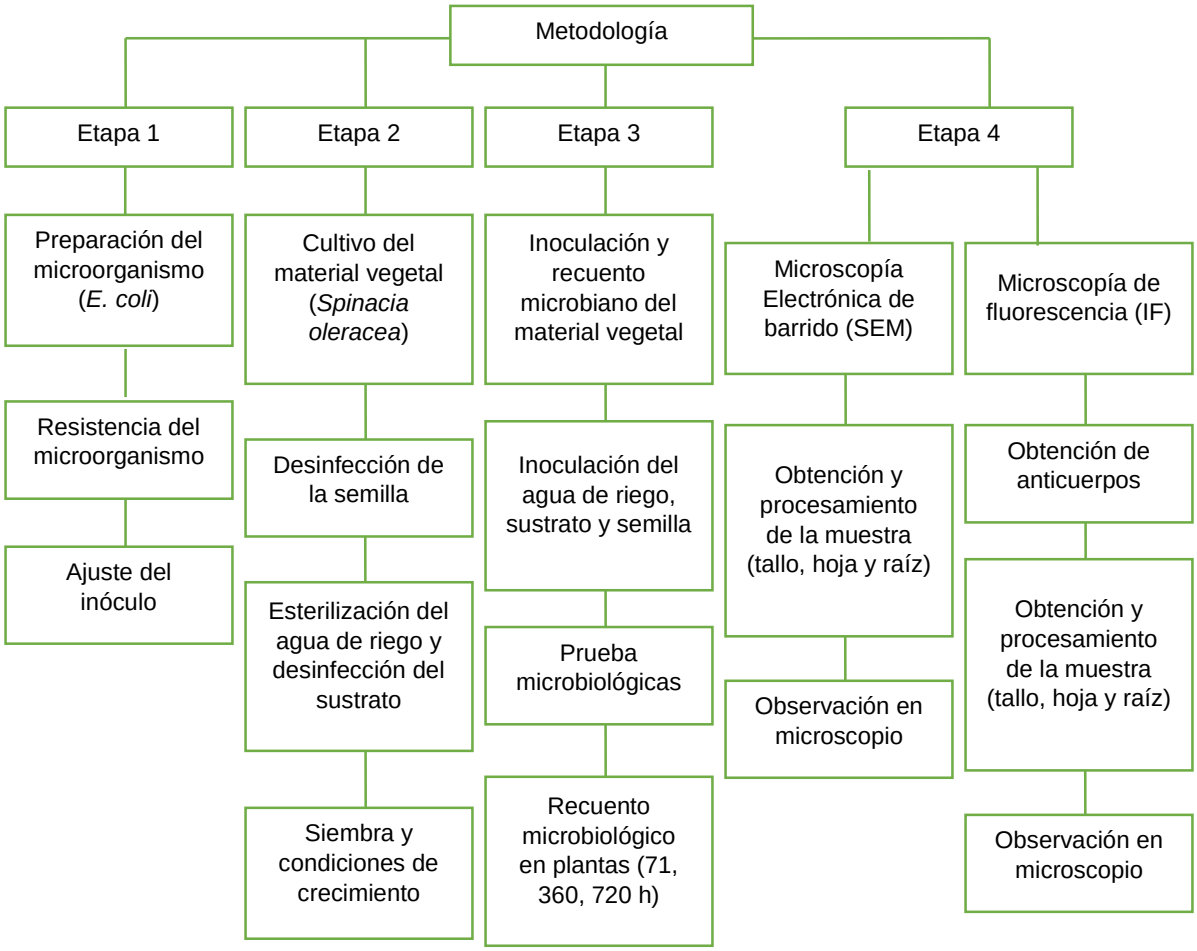

Figura. 7 Diagrama general de trabajo considerando las diferentes etapas de la metodología.

4.1 Etapa 1. Obtención del Microorganismo.

Durante la etapa 1 se realizaron todos los tratamientos que correspondían al uso de *E. coli* donde se explican las condiciones de incubación de la bacteria además de todos los tratamientos a los cuales se mantuvo para su uso (figura 8).

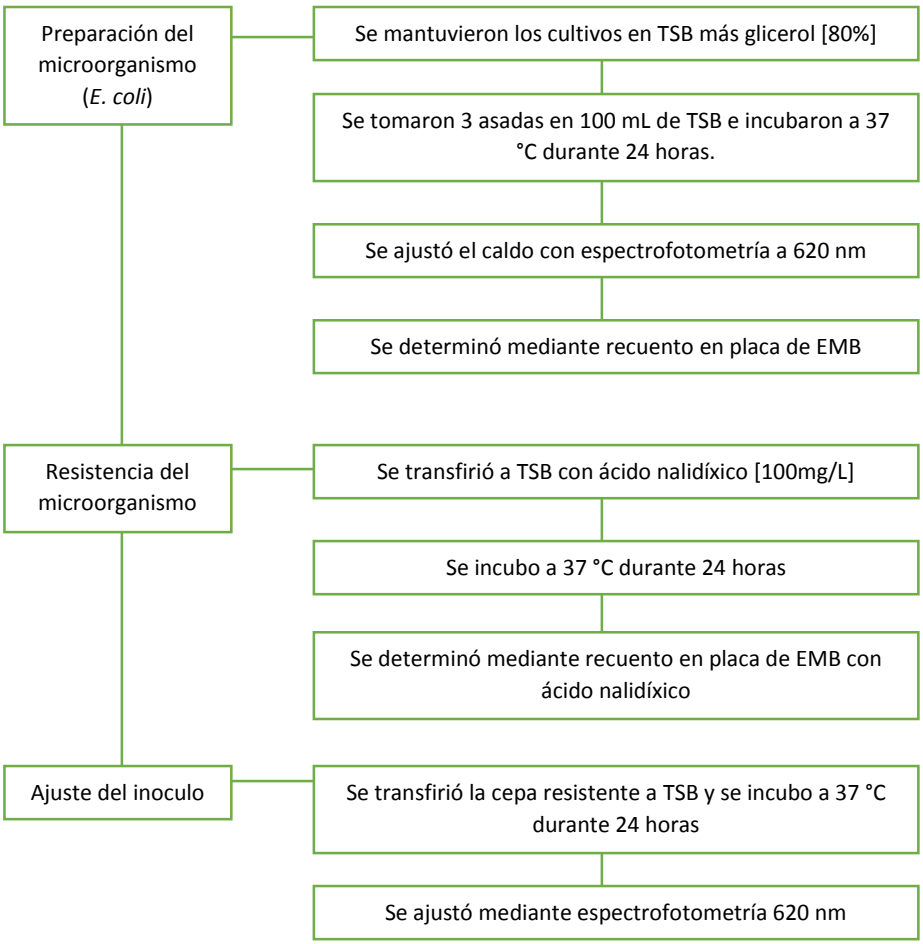

Figura. 8 Subdiagrama de la etapa 1 referente a la obtención del microorganismo. Donde TSB corresponde a Caldo soya Tripticaseína.

4.1.1 Preparación del microorganismo.

La cepa de *E. coli* patogrupo enterotoxigénica (ETEC), usada en este estudio fue aislada previamente en suelos de invernaderos y frutos de tomate (Luna-Guevara *et al*., 2012). Los cultivos se mantuvieron a -80°C en Caldo de Soya Tripticaseína (TSB, BD Bioxon) y glicerol al 80%. Fueron transferidas tres asadas sucesivas en

100 mL de TSB incubados a 37 °C en intervalos de 24 horas; los cultivos se ajustaron a una densidad óptica (OD1.1) a 620 nm con una población aproximada de 10^7 UFC/mL. Las poblaciones del inóculo fueron determinadas por recuento en placa en Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB, BD Bioxon).

Las placas fueron incubadas a 37° C por 24 horas previo al recuento de las colonias y confirmadas por pruebas bioquímicas básicas IMViC figura 9 (Prueba de indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato).

Figura. 9 Pruebas bioquímicas básicas IMViC.

4.1.2 Resistencia de microorganismo.

El inóculo fue transferido a un caldo nutritivo de soya Tripticaseína suplementado con ácido nalidíxico (100 mg/L), mismo que se dejó incubar a 37 °C por 24 horas las cepas fueron conservadas a -80°C (Iturriaga, 2006).

4.1.3 Preparación del inóculo.

Para la preparación del inóculo se transfirió la cepa en el caldo nutritivo de Soya Tripticaseína (TSB) el cual fue incubado a 37 °C en agitación constante, durante 24 horas. El ajuste del caldo se realizó mediante espectrofotometría, donde se midió la absorbancia del caldo inoculado a 620 nm para tomar de este los mililitros

necesarios para realizar un ajuste con una absorbancia de 1.1 el cual es equivalente a 10^7 UFC/mL (Guo *et al*., 2001).

4.2 Etapa 2. Cultivo del Material Vegetal

Durante la etapa 2 se realizó el crecimiento de la semilla y se consideraron las condiciones ambientales para garantizar la uniformidad del cultivo (figura 10).

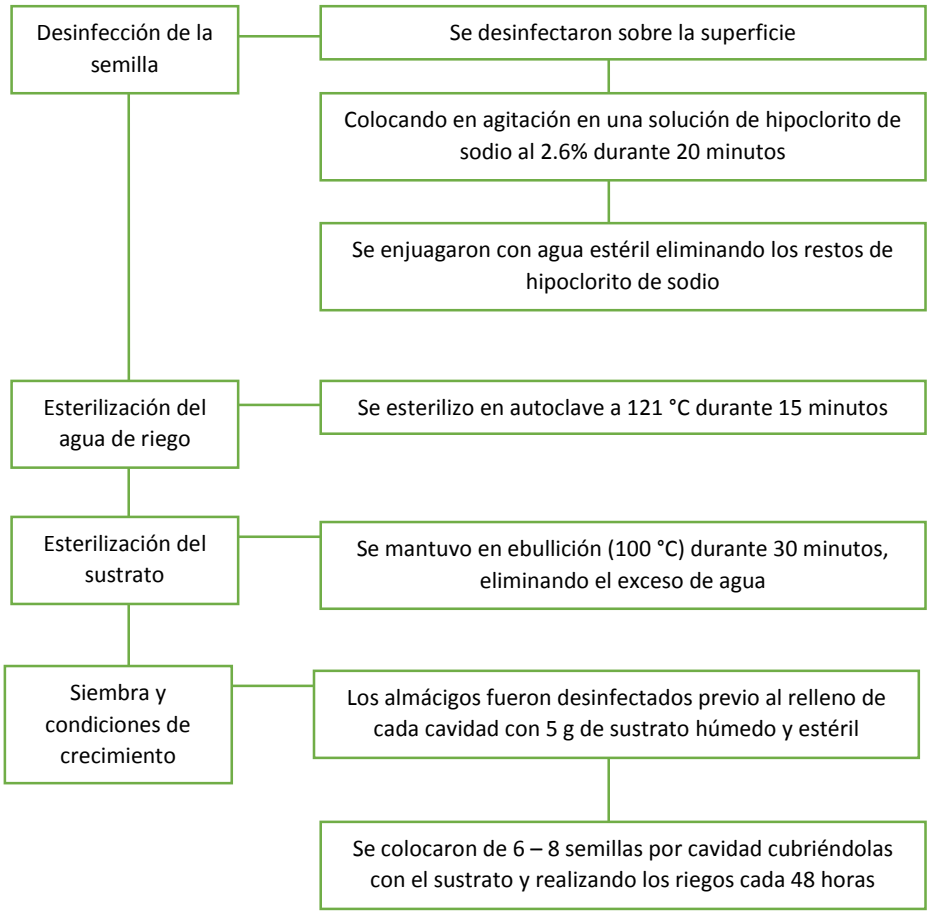

Figura. 10 Subdiagrama de la etapa 2 referente a los materiales para la siembra.

4.2.1 Desinfección de las semillas.

Se desinfectaron las semillas sobre su superficie manteniendo en agitación durante 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2.6% como se muestra en la figura 11. Las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar exceso de agentes desinfectantes (Torres, 2005).

Figura. 11 Desinfección de semillas con solución de hipoclorito de sodio al 2.6% y enjuague de las mismas

4.2.2 Esterilización del agua de riego y del sustrato.

El agua se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos en frascos de vidrio almacenados para su posterior uso. Asimismo el sustrato (PeatMoss musgo, *Sphagnum* figura 12) se desinfectó en agua en ebullición durante 30 minutos (Garcia, 2011).

Figura. 12 Peat Moss musgo, del género *Sphagnum*

4.2.3 Siembra y condiciones de crecimiento.

Para la siembra se utilizaron almácigos con medidas de 66.4cm de largo x 33.5cm de ancho x 6.7cm de alto y un número de cavidades de 200 el cual fue llenado con 5 g de sustrato como se muestra en las figuras 13 y 14. Depositaron entre 6 y 8 semillas controlando el nivel del almacigo y no se afectara la uniformidad de la germinación. Asimismo, las semillas fueron sembradas realizando presión suave sobre el sustrato previamente húmedo, para expulsar el exceso de aire que pudiese haber quedado alrededor de la semilla y aumentar el contacto de la misma con el sustrato como se muestra en las figura 15.

Figura. 13 Colocación del sustrato (5g) de sustrato en los almácigos.

Figura. 14 Almácigos para siembra de espinacas.

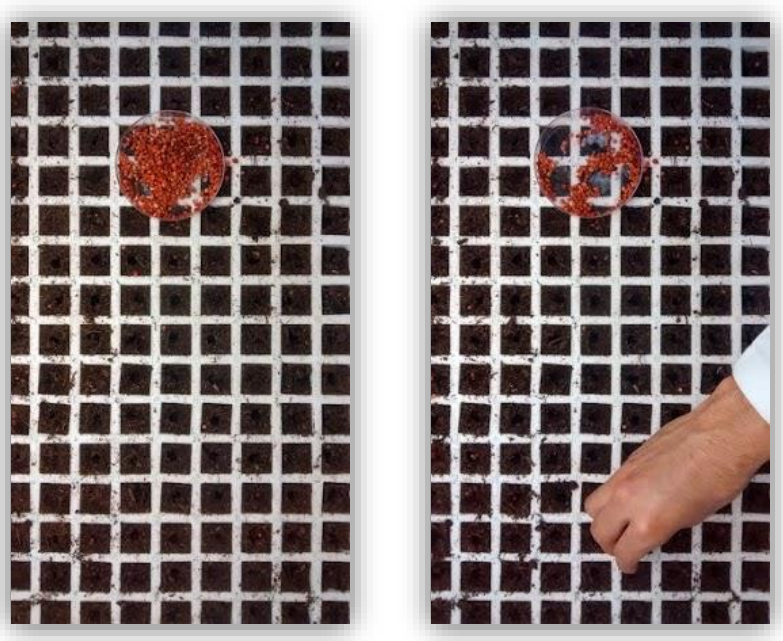

Figura. 15 Colocación y siembra de las semillas de espinacas en los almácigos.

4.3 Etapa 3.Inoculación y pruebas microbiológicas.

Durante la etapa 3 se establecieron todas las condiciones de inoculación, la concentración de inóculo, el método de inoculación, así como los diferentes tiempos de incubación (figura 16).

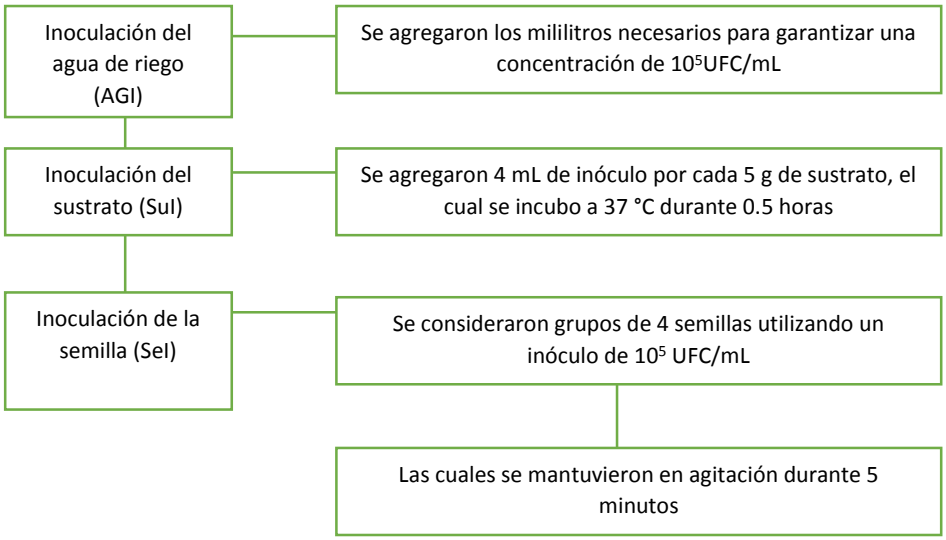

Figura. 16 Subdiagrama de la etapa 3 referente a la inoculacion de los materiales para el cultivo de espinaca.

4.3.1 Inoculación del agua de riego y sustrato.

Para la inoculación del agua (AgI) y sustrato (SuI) se utilizó un cultivo bacteriano correspondiente a una concentración de 10^5 UFC/mL (Barac, 2004). Particularmente para la inoculación del sustrato se procedió con la metodología propuesta por Rattray (1990), la cual consiste en agregar 5g de sustrato por cada 4 mL de inóculo, mezclar e incubar a 37°C por 0.5 horas.

4.3.2 Inoculación de la semilla.

Las semillas (SeI) se colocaron en placas de estériles en grupos de 4, con 5mL de agua destilada estéril para continuar con su inoculación en concentraciones cercanas a las $5x10^5$ UFC/mL. La inoculación de la semilla se realizó utilizando la

metodología de Torres (2005) con algunas adecuaciones agitación durante 5 minutos.

4.3.3 Recuento microbiano en los diferentes tejidos.

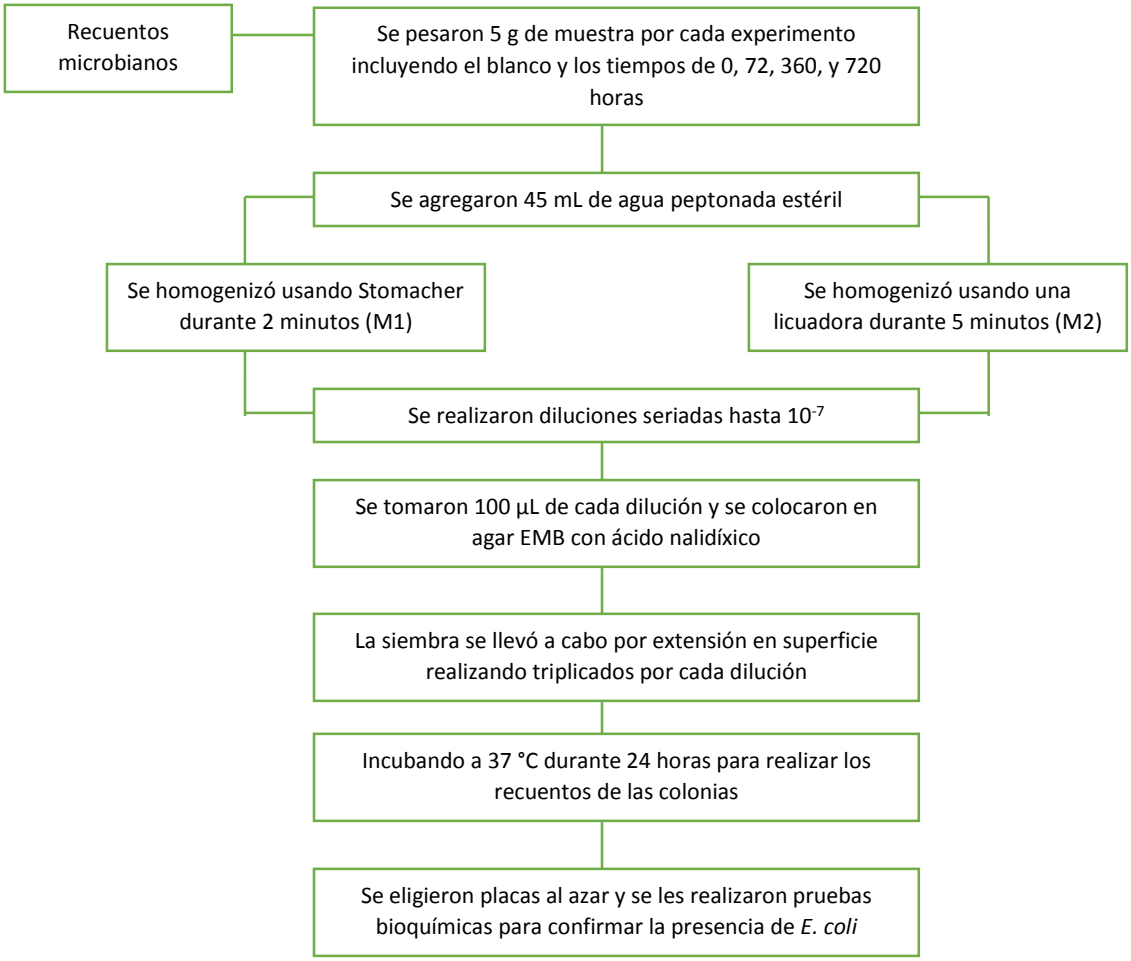

Figura. 17 Subdiagrama de la etapa 3 referente a las pruebas microbiológicas.

Como se muestra en la figura 17 se realizaron recuentos microbianos en tejidos vegetales como semilla (O horas), brotes o germinados (72horas), un recuento intermedio (360 horas) y hoja verdadera (720 horas). Se utilizaron 5 gramos de tejido a los cuales se agregó 45 mL de agua peptonada estéril y se homogenizaron por 2 minutos en un Stomacher, para el método de recuento y recuperación superficial (M1). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de cada muestra

en 9 mL de peptona y la siembra se llevó a cabo por extensión en superficie en el medio Agar Eosina de Metileno (EMB) con antibiótico (ácido nalidíxico) en una relación 1:10, agregando 100 µL de la muestra sobre la superficie del agar figura 18.

Para los recuentos en superficie y homogenización (M2) se tomaron 5 gramos de cada muestra brote (72 horas) un recuento intermedio (360 horas) y hoja verdadera (720 horas) y se licuaron en peptona durante 5 minutos hasta realizar la homogenización. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en 9 mL de peptona y la siembra se realizó en el medio Agar Eosina de Metileno con antibiótico (ácido nalidíxico) siguiendo el mismo procedimiento que en M1 (figuras 19 y 20).

Tras haber realizado la siembra por extensión en superficie las placas de EMB se incubaron en condiciones de 37°C durante 24 horas, y se realizaron los recuentos de las colonias en la superficie para cada una de las diluciones como se muestra en la figura 21, además se tomaron colonias al azar para realizar pruebas bioquímicas.

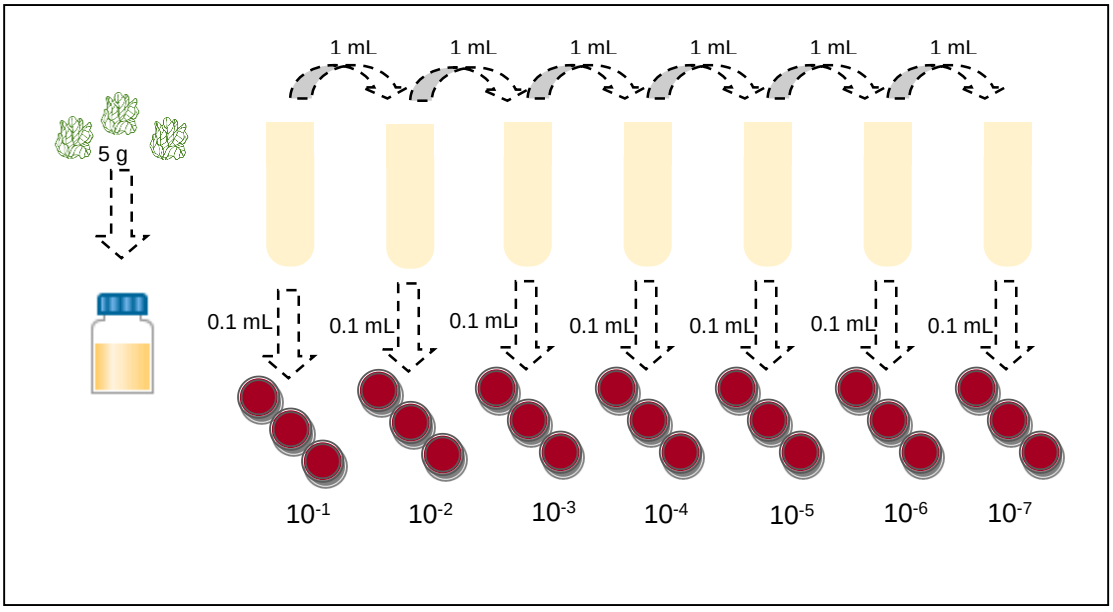

Figura. 18 Método de dilución seriada para el recuento en placa.

Figura. 19 Diluciones seriadas de las muestras.

Figura. 20 Siembra de diluciones en agar EMB con ácido nalidíxico.

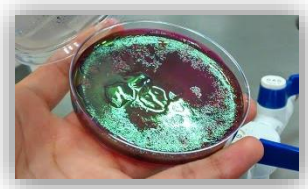

Figura. 21 Recuento de *E. coli* en cajas agar eosina azul de metileno.

4.4 Etapa 4. Microscopías para confirmar la adherencia e internalización.

Se realizaron dos tipos de microscopías, inmunofluorescencia con la que se pretendió observar el efecto de la internalización de *E. coli* en los diferentes de los tejidos de la planta y microscopía electrónica de barrido para confirmar la adherencia.

Tabla 5 Relación entre los métodos de recuento y tipo de microscopía para confirmar el crecimiento de *E. coli.*

Microscopía	Método de recuento y recuperación	Mecanismo de sobrevivencia
IF	M2	Internalización
SEM	M1	Adherencia
CF	M2	Internalización

IF; inmunofluorescencia, SEM; Scan Electronic Microscopy (Microscopía electrónica de barrido), CF; confocal, M1 (Método de recuento y recuperación superficial), M2 (Método de recuento y recuperación superficial y homogenización).

4.4.1 Detección de *E. coli* por Microscopía electrónica de barrido (SEM).

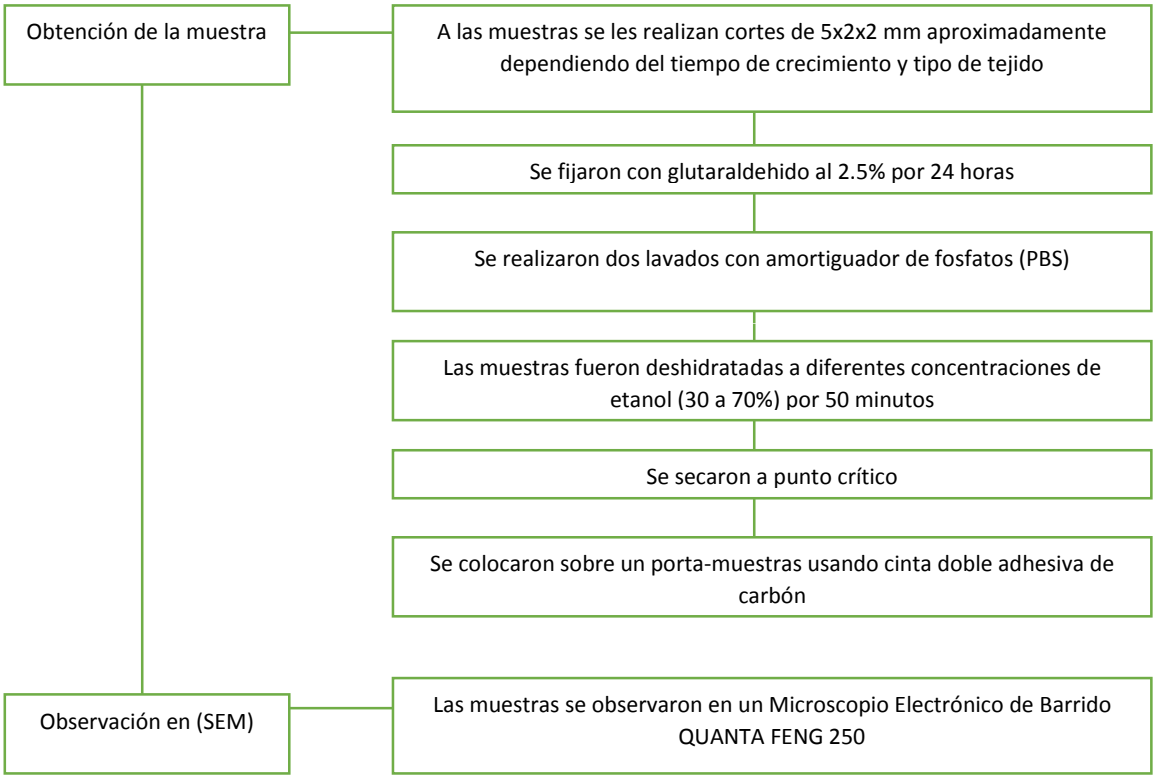

Figura. 22 Subdiagrama de la etapa 4 referente a las microscopías electrónicas de barrido.

4.4.2 Obtención de la muestra (tejido vegetal).

Las muestras se prepararon para la microscopía electrónica de barrido de acuerdo con lo establecido por Iturriaga *et al*. (2007) y algunas modificaciones según (Thompson *et al*., 2006). Las tejidos se cortaron en un tamaño de aproximadamente de 5x2x1 mm dependiendo del tiempo y tipo de tejido (raíz, tallo y hoja), estas se fijaron con glutaraldehido al 2.5% por 24h. Posteriormente se realizaron dos lavados seriados de cinco minutos con amortiguador de fosfatos (PBS), para poder deshidratar las muestras con diferentes concentraciones de etanol (30 a 70%) durante 50 min.

El secado de los tejidos se realizó a punto crítico en una secadora marca Quorum K850 (figura 23), después del secado los tejidos se colocaron y orientaron sobre un porta-muestras usando una cinta doble adhesiva de carbón (Figura 24) y se recubrieron con oro durante 4 min en una ionizadora de metales (Figura 25).

Figura. 23 Deshidratadora a punto crítico Quorum K850

Figura. 24 Porta muestras para microscopio electrónico de barrido

Figura. 25 Ionizadora de metales Quorum Q150R S

4.4.3 Microscopía electrónica de barrido.

Las muestras resultantes se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido con un radio de operación de 3 a 15 Kv.skipe QUANTA FEG 250 (figura 26).

Figura. 26 Microscopio electrónico de barrido QUANTA FEG 250

4.4.4 Obtención de los anticuerpos.

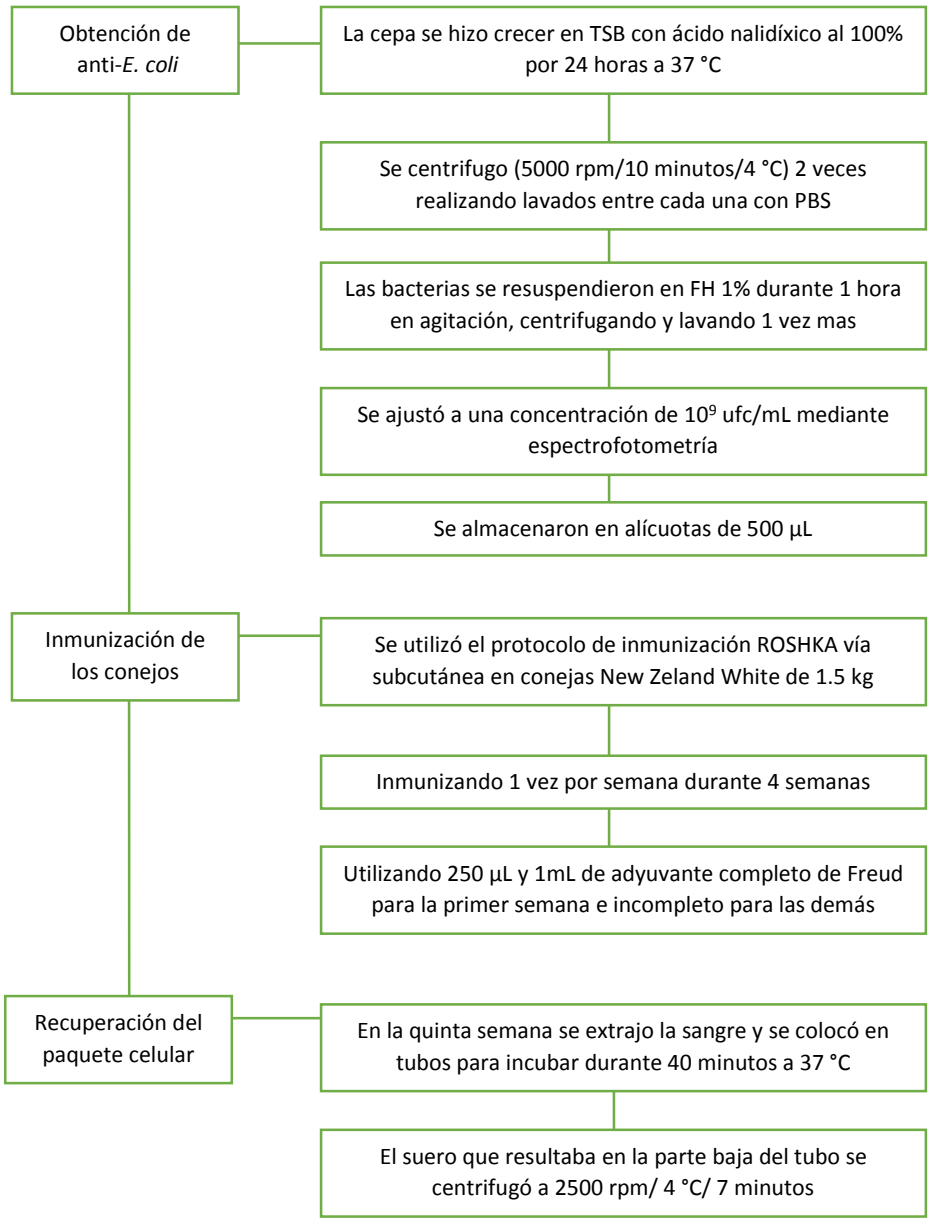

Figura. 27 Subdiagrama de la etapa 4 referente a las microscopías por inmunofluorescencia, para el tratamiento de la muestra (continuación).

4.4.5 Obtención del antisuero de *E. coli.*

La cepa del inoculo fue aislada de suelos en invernaderos, y se hizo crecer en un caldo de soya Tripticaseína (TSA) por 24 horas a 37°C agregando ácido nalidíxico

como antibiótico para asegurar que solo las bacterias resistentes a una concentración al 100% sean las sobrevivientes (Guo *et al*., 2001). La bacteria se lavó dos veces con PBS (buffer fosfato al 0.1 M, pH 7.2) centrifugando a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C entre cada lavado como se muestra en la figura 28. Las bacterias lavadas fueron resuspendidas en formaldehido al 1% durante 1 hora en agitación (Shepard, 1970), las cuales se centrifugaron una vez más en las mismas condiciones y se finalizó realizando un último lavado con PBS. Se realizó un ajuste llegando a una concentración de 10^9UFC/ml mediante espectrofotometría, utilizando el sedimento de bacterias resultante del último lavado en PBS, se almacenó en alícuotas de 500 µL en refrigeración.

Figura. 28 Centrífuga marca eppendorf, marca 5810 R para la obtención del antisuero de *E. coli*

4.4.6 Inmunización de los conejos para la obtención de los anticuerpos.

Se utilizó un protocolo de inmunización de ROSHKA, por vía subcutánea figuras 30 y 31, en conejas New Zealand White de 1 y medio kilogramos figura 29, las cuales fueron inmunizadas una vez por semana durante 4 semanas, con una suspensión de bacterias con 250 µL y 1 mL de adyuvante completo de Freud para la primer semana y adyuvante incompleto para la siguientes tres semanas.

Figura. 29 Conejas New Zealand White lista para iniciar la inmunización.

Figura. 30 Manejo de conejas New Zealand para inmunización.

Figura. 31 Confirmación de estimulación de reacción inmunológica para la producción de anticuerpos.

4.4.7 Recuperación del paquete celular.

Después de haber transcurrido las 5 semanas desde la primera inmunización, se extrajo la sangre de las conejas figura 32 y se colocó en tubos, los cuales se dejaron incubar a 37°C durante 40 minutos como se observa en la figura 33.

Figura. 32 Obtención de la sangre de las conejas.

Figura. 33 Recolección de la sangre para obtención de suero inmune.

Tras lo cual se despegó el coágulo de sangre de las paredes del tubo y se realizó la extracción del suero figura 34, el cual se centrifugo durante 7 minutos a 4 °C a 2500 rpm removiendo el sedimento. Además se realizó una prueba de aglutinación para cada conejo con el fin de determinar la especificidad del anticuerpo frente a la bacteria usada (Ball, 1974).

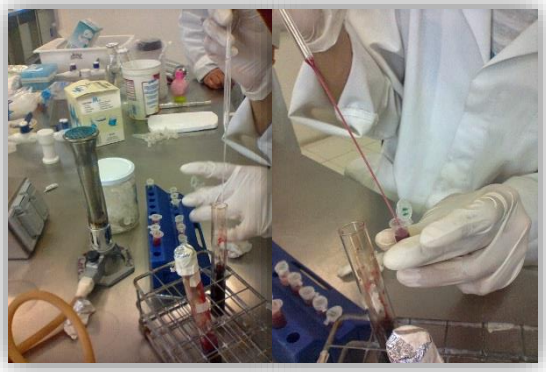

Figura. 34 Separación del coágulo de sangre del suero del conejo.

4.4.8 Microscopía por inmunofluorescencia.

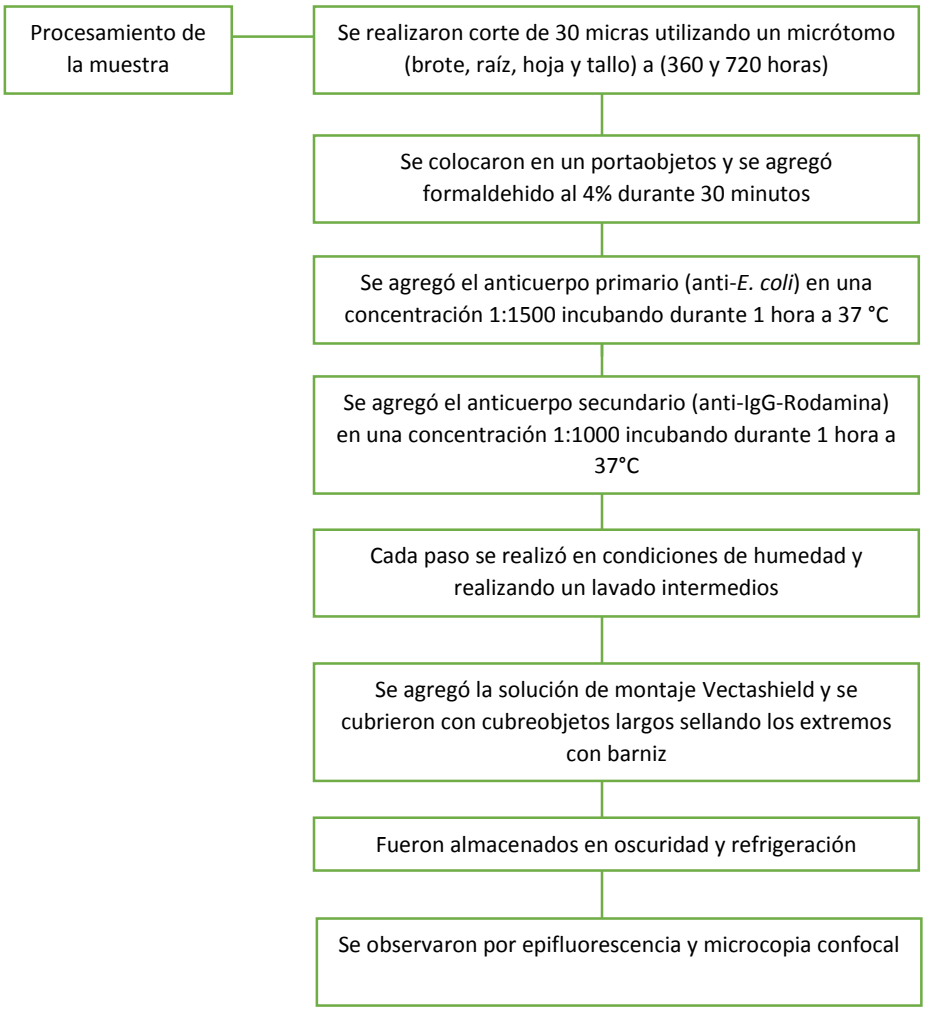

Figura. 35 Subdiagrama de la etapa 4 referente a la microscopía por inmunofluorescencia.

4.4.9 Obtención de la muestra (tejido vegetal).

Se realizaron cortes de 30µm de los diferentes tejidos de la planta (brote, raíz, hoja y tallo) para los diferentes tiempos (72 horas, 360 horas y 720 horas), haciendo un corte de la raíz, brote y tallo de la parte interna y en forma longitudinal. Particularmente para la hoja se consideraron cortes transversales, ambos utilizando un micrótomo (MICROM HM 505 EVP) como se observa en la figura 36.

Figura. 36 Cortes de los tejidos utilizando un micrótomo (MICROM HM 505 EVP) a 30 µm

Los cortes se colocaron sobre un portaobjetos figura 37, al cual se agregó formaldehído al 4% durante 30 minutos, las muestras se lavaron con PBS al 1x, después se colocó el anticuerpo primario especifico (anti-*E. coli* 1:1500) y se dejó incubar durante 1 hora a 37 °C en una atmosfera húmeda, al terminar se realizó un lavado con PBS, para poder agregar el anticuerpo secundario marcado (anti-IgG-Rodamina 1:1000) este fue incubado a 37°C durante 1 hora, al finalizar se realizó un último lavado con PBS y dejando escurrir el exceso de la solución. Para finalizar se agregó una gota de solución de montaje (Vectashield®) antes de cubrirlo con cubreobjetos largos, los cuales fueron sellados con barniz en los extremos y se mantuvieron en condiciones de obscuridad y refrigeración hasta su observación.

Las muestras fijadas se observaron en un microscopio de epifluorescencia con los filtros en verde que permitía la luminiscencia en color rojo y en campo claro con los diferentes objetivos (40x, 60x, 100x) y posteriormente las observaciones se confirmaron en un microscopio confocal marca Leica modelo TCS SP8 acoplado a un microscopio invertido DMI 6000CS (figura 38)

Figura. 37 Preparación de las muestras para su observación por epifluorescencia.

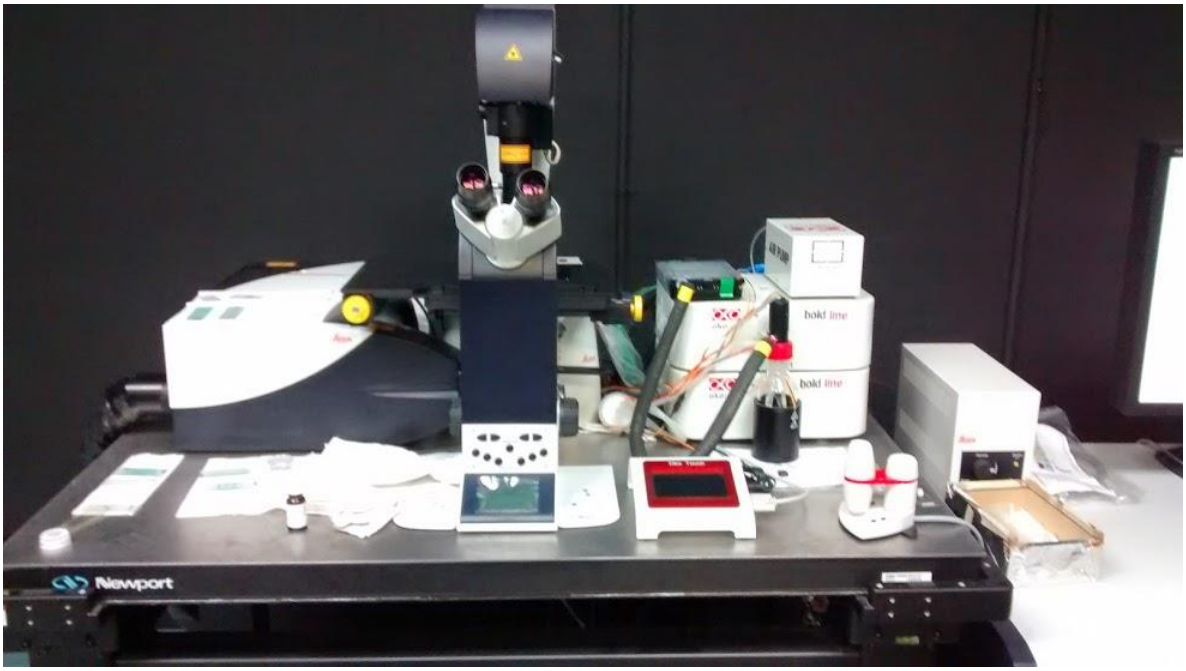

Figura. 38 Microscopio confocal marca Leica TCS SP8 acoplado a un microscopio invertido DMI 6000CS.

4.5 Etapa 5 Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, analizando el efecto de los mecanismos de transmisión, los método de recuento y recuperación y el tiempo sobre la variable de respuesta sobre los recuentos microbianos (tabla 6), utilizando un análisis tipo ANOVA (α= 0.05) y análisis de comparación de medias, mediante pruebas de Tukey, para determinar si presentó una diferencia significativa entre los recuentos del microorganismo. El software utilizado fue statistix versión 10 (Statistix 2015).

Tabla 6. Diseño experimental

Tipo de variable		
Variable independiente		Variable dependiente
Mecanismos de transmisión	Suelo inoculad (SuI)	Recuentos microbianos
	Semilla inoculada (SeI)	
	Agua inoculada (AgI)	
Método de recuento y recuperación	Superficial (M1)	
	Superficial y homogenización (M2)	
Tiempo	0 horas	
	72 horas	
	360 horas	
	720 horas	

V Resultados y discusión

5.1 Desarrollo vegetal.

En relación con el crecimiento de la planta se observó que si bien los cultivos fueron expuestos a las mismas condiciones ambientales (humedad relativa, radiación fotosintética y temperatura), fue posible observar en aquellas plantas provenientes de sustratos y agua inoculados un incremento en la talla y en la aparición de la primera hoja verdadera en los cultivos en comparación con el cultivo control (Figuras 39 y 40).

Figura. 39 Crecimiento de las plantas según los diferentes mecanismos de transmisión a) semilla inoculada, b) sustrato inoculado y c) agua inoculada.

Figura. 40 Crecimiento de las plantas para el control, semilla, agua y suelo desinfectado.

Estudios realizados por Kroupitski *et al*., (2009) encontraron que la temperatura y la incidencia de luz son factores determinantes para la sobrevivencia de patógenos en las plantas. La temperatura afecta al metabolismo y la producción de energía y por consecuencia se ve afectada la motilidad bacteriana. Mientras que una mayor incidencia de luz produce que los estomas de las plantas se abran más durante la fotosíntesis y la producción de sacarosa aumente, dando pie a una internalización más efectiva de microorganismos como *Salmonella* y *E. coli.* En este mismo estudio se observó una mayor tasa de internalización y de adherencia a temperaturas entre 25 y 37°C.

Otros estudios demostraron que la forma y el estadio de crecimiento de las hojas son factores determinantes para la adherencia, ya que hojas más viejas y rugosas presentaron poblaciones microbianas más altas que las hojas jóvenes sobre la superficie, ya que estas facilitan su adherencia en los espacios y las protegen del estrés y medio ambiente.

Los enteropatógenos normalmente no se consideran parte de la población microbiana de la filósfera, pero es evidente que pueden estar asociados con brotes de enfermedades trasmitidas por alimentos. Estudios que se han realizado sobre el comportamiento y la sobrevivencia de los patógenos humanos en plantas y la mayoría se han centrado en *E. coli* (particularmente en el patogrupo *E. coli* O157:H7) y *Salmonella,* transmitidos o aplicados directamente sobre el follaje de las plantas, semillas, raíces o en el suelo.

5.2 Comparación entre los dos métodos de recuperación de *E. coli.*

En esta sección se abordaron los resultados obtenidos de la población de *E. coli* considerando dos métodos de recuento y recuperación microbiana en tejidos de espinaca (Método 1: Superficial **M1** y Método 2 Superficial y Homogenización **M2**) tomando en cuenta diferentes mecanismos de transmisión: Sustrato inoculado (SuI), Agua inoculada (AgI) y Semilla inoculada (SeI). Lo anterior con la finalidad de relacionar los recuentos microbianos y los posibles mecanismos de sobrevivencia de *E. coli* a nivel superficial o de internalización en tejidos como raíz, tallo y hoja verdadera, considerando como periodos de crecimiento 72, 360 y 720 horas (Figura 41).

Figura. 41 Etapas de crecimiento de la espinaca a) 72 horas, b) 360 horas y c) 720 horas.

En la tabla 7 se comparan los resultados obtenidos de los recuentos con M1 y M2 mediante un análisis tipo ANOVA y de acuerdo con el valor de $P< 0.05$ se pudo observar un efecto significativo por el método de recuento y recuperación de *E. coli*, independientemente del tipo de mecanismo de transmisión y tiempo de recuento. Este efecto puede atribuirse a que en M2, la homogenización de los tejidos favoreció el recuento total de *E. coli* a nivel de internalización y superficial, mientras que M1 consistió en el enjuague superficial de las plantas con la posibilidad de que sólo la

población bacteriana analizada correspondiera aquella que permaneció adherida al tejido vegetal.

Tabla 7. Análisis estadístico tipo ANOVA de los recuentos promedio de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) obtenidos con los métodos utilizados en los análisis microbiológicos.

Métodos	Log ufc/g	P value
M 1	7.6698	<0.05
M 2	8.3005	

Se utilizó un inóculo inicial de 10^5 UFC/mL de *E. coli* ETEC.

La diferencia significativa entre cada uno de los métodos muestra a su vez que el efecto de la internalización de *E. coli* aumenta los valores de Log_{10} UFC/g en M2. Esta tendencia coincide con diversos estudios que reportan la relevancia de la internalización en patógenos transmitidos por los alimentos. De acuerdo con Klerks *et al*., (2007) mencionan que la internalización por agentes patógenos en tejidos vegetales particularmente a nivel de raíz, es más frecuente en sistemas donde la competencia con otras bacterias sea menor, dando lugar a que los patógenos tengan ventajas fisiológicas de colonización en comparación con la microflora presente. De acuerdo con el análisis ANOVA para evaluar del efecto que tenían los tiempos de recuento independientemente del mecanismo de transmisión (tabla 8), se presentó diferencia significativa entre los recuentos ($P<0.05$), siendo en el tiempo con 72 horas donde se observó un incremento en la población microbiana con más de 1 Log, partiendo de un recuento de 7.44 Log_{10} UFC/g (tiempo 0) a 8.9366 Log_{10} UFC/g. De acuerdo con el reporte de Pu *et al*., (2009), mencionan que la transmisión de *E. coli* en tejidos de espinaca puede darse a partir del suelo y depende del estadio de crecimiento de la planta, confirmando que el cultivo es más susceptible a contaminación dentro de las 2 y 5 semanas, tiempos que coinciden con los encontrados en este estudio.

Tabla 8. Análisis estadístico ANOVA para evaluar el efecto del tiempo de recuperación de los recuentos en *E. coli* (Log_{10} UFC/g).

Tiempos (h)	Log ufc/g	P value
(0 horas)	7.6388	<0.05
(72 horas)	8.9366	
(360 horas)	7.7419	
(720 horas)	7.6234	

Se utilizó un inóculo inicial de 10^5 UFC/mL de *E. coli* ETEC.

En la figura 42 se puede observar que no se presentaron diferencias entre los mecanismos de transmisión (SeI, SuI, AgI) dentro de un mismo método de recuperación M1 y M2 (figuras 42a y 42b), sin embargo se observó diferencia cuando fueron comparados todos los mecanismos de ambos métodos (figura 42c). Siendo mayores los valores de M2 dando como resultado que el efecto de la internalización puede llegar a ser un gran problema para el consumo de vegetales crudos, debido a que, si las bacterias se internalizan son más difíciles de eliminar mediante los métodos de desinfección usados comúnmente.

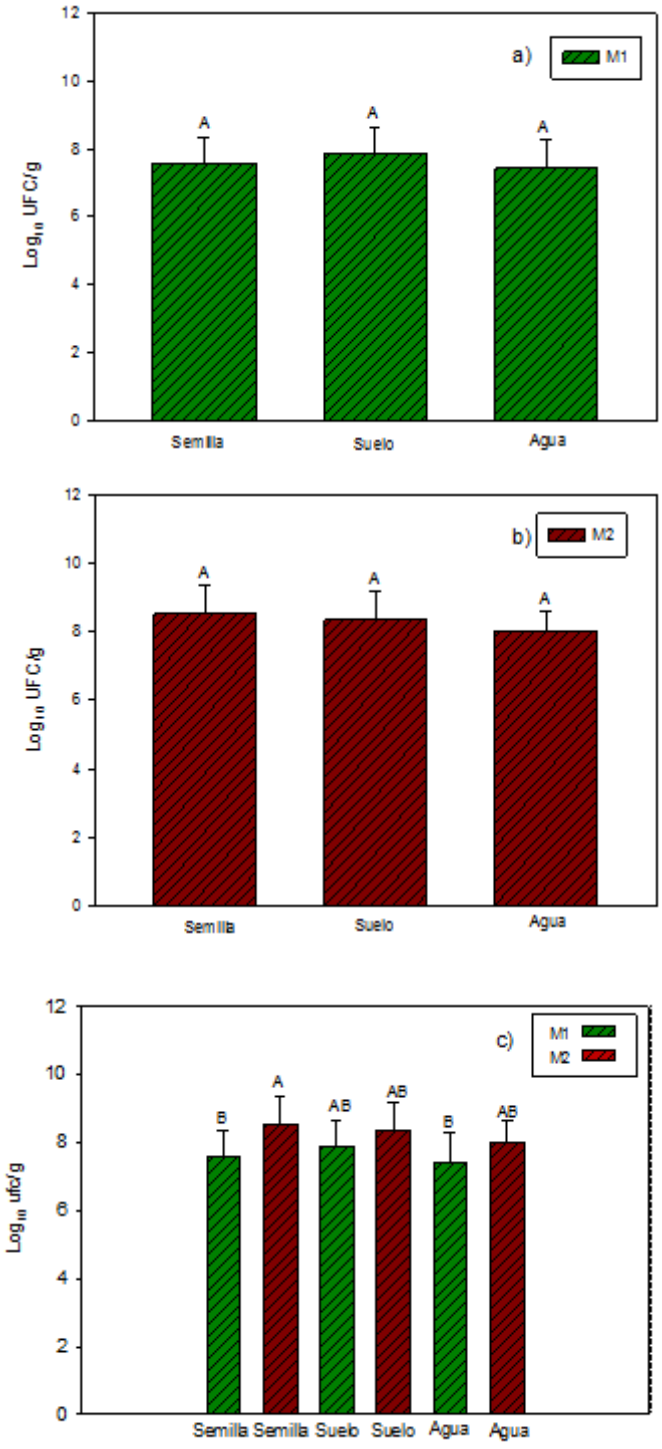

Figura. 42 Comparación del comportamiento de *E. coli* inoculada en agua suelo y semilla considerando dos métodos de recuento y recuperación: a) M1: recuento superficial, b) M2 recuentos superficial y con internalización y c) comparación entre M1 y M2. Los valores promedio con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre los recuentos de *E. coli.*

5.3 Análisis de los recuentos de *E. coli* para M1 de acuerdo con el mecanismo de transmisión.

Particularmente las frutas y verduras pueden encontrarse expuestas a contaminación por microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha. En la pre-cosecha las plantas pueden contaminarse en el campo a través del uso del agua de riego contaminada, como las aguas negras o parcialmente tratadas, agua reciclada, así como mediante el uso de estiércol para la fertilización (Ibekwe, et al., 2010; Gagliardi y Karns, 2002; Wachtel, et al., 2002). En la post-cosecha destacan la maquinaria y equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo y los vehículos (Beuchat, 1996).

En este estudio se hizo hincapié en la contaminación de *E. coli* durante la etapa de pre cosecha de espinaca, particularmente se consideró con M1 observar el efecto de la adherencia en tejidos de espinaca incluyendo raíz, tallo y hoja.

Dichos tejidos fueron expuestos a los diferentes mecanismos de trasmisión SeI, AgI y SuI con una población inicial de 7.44 Log_{10} UFC/g (figuras 43a a 43c) Específicamente se presentó un incremento de aproximadamente 2 Log_{10} UFC/g en la población de *E. coli* particularmente en las plantas que provinieron de semilla y suelo inoculados (figuras 43a y 43b) a las 72 horas de crecimiento.

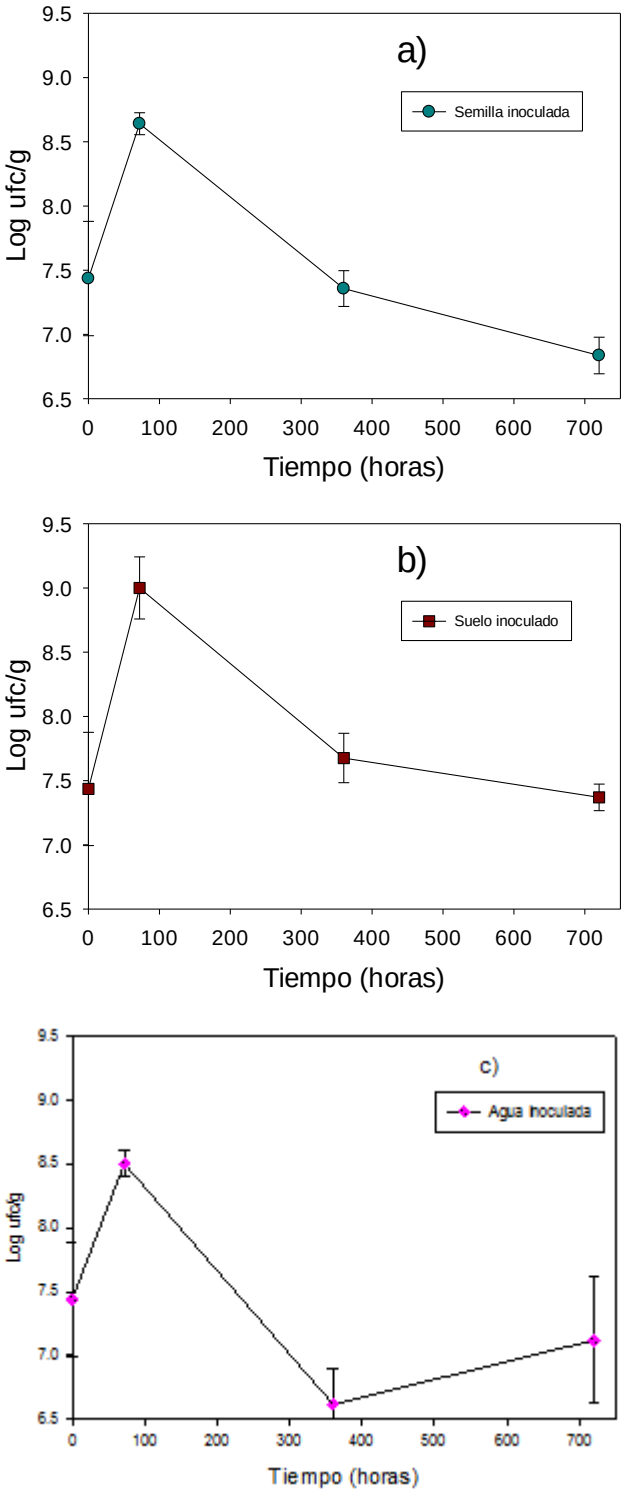

Figura. 43 Crecimiento de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) en plantas de espinaca, las cuales provinieron de: a) Semilla, b) Suelo y c) Agua inoculados, considerando el método M1 para el recuento y recuperación.

En la tabla 9 se muestran los valores del crecimiento de *E. coli* en Log_{10} UFC/g hasta los 28 días (720 horas), inoculada en semilla, suelo y agua; estos tiempos de sobrevivencia con *E. coli* coincide con lo reportado por Nicholson *et al.* (2005).

De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA se observó un efecto significativo ($P<0.05$) para los tres mecanismos de transmisión y en cada uno tiempos de análisis y se identificó que los recuentos más altos correspondieron a plantas provenientes de suelo inoculado (figura 43b). Asimismo de acuerdo con el análisis de comparación de medias Tukey se presentaron diferencias significativas entre todos los mecanismos de transmisión y dentro de un mismo tiempo (tabla 9). Para los días 360 y 720 la tendencia se mantuvo, teniendo mayor crecimiento en el tratamiento para suelo inoculado lo cual comprueba los resultados obtenidos por Mitra *et al.,* (2009).

Tabla 9. Valores de los recuentos microbianos de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) considerando los tres mecanismos de transmisión y como método de recuento M1 (colonización superficial).

Tratamiento Mecanismos de transmisión	Tiempo (horas)+		
	72	360	720
Suelo inoculado	9.00±0.241[a]	7.68±0.192[a]	7.37±0.103[a]
Agua inoculada	8.50±0.102[b]	6.62±0.275[b]	7.12±0.493[a]
Semilla inoculada	8.64±0.085[ab]	7.36±0.139[a]	6.84±0.142[a]

*Los valores resultantes para el tiempo cero fueron de 7.44 Log_{10} UFC/g,
+Valores en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes.
ł DS, desviación estándar.

En estudios realizados por Islam *et al.,* (2004 a, b), demostraron la sobrevivencia de *E.coli* y *Salmonella* durante 177 y 231 días, inoculados directamente sobre tejidos de perejil. Mientras que Solomon *et al.,* (2003) demostraron en plantas de lechuga con agua inoculada con *E. coli* O157:H7, la sobrevivencia durante 30 días. En otro estudio similar demostraron que la sobrevivencia de *E. coli* en tejidos de hoja de lechuga se ve afectada cuando el tipo de riego utilizado corresponde a goteo por aspersión.

De acuerdo con lo reportado por Araujo *et al*., (2010) bacterias tales como *S. enteritidis* y otros microorganismos tienden adherirse sobre superficies de vegetales incluyendo hojas, lo anterior como un mecanismo de sobrevivencia. Lo anterior podría explicar en este estudio la sobrevivencia de *E. coli* en espinaca con los diferentes medios de transmisión, además de que las condiciones utilizadas resultaron favorables para su crecimiento y formación de micropelículas. Este tipo de estructuras tienen como etapa inicial la colonización bacteriana en la superficie, las células de microorganismos inmovilizados en una variedad de compuestos poliméricos, generalmente referidos como polímeros extracelulares, dando lugar a la sobrevivencia de bacterias en las hortalizas incluyendo hojas verdes.

5.4 Análisis de los recuentos de *E. coli* para M2 de acuerdo con el mecanismo de transmisión.

Frutas y hortalizas frescas, incluyendo hojas, raíces, bulbos y tubérculos, tienen diferentes morfologías y funciones metabólicas y consecuentemente proveen diversos nichos ecológicos para microorganismos (Brackett, 1999; Burnett y Beuchat, 2000; Ponce, Roura del Valle y Fritz, 2002).

Los riesgos particulares que presentan este tipo de contaminación son que una vez que los microorganismos han contaminado el alimento, tienen la capacidad de crecer en él, y que pueden presentar un riesgo para la salud del consumidor cuando se trata de microorganismos patógenos, ya que no alteran de manera visible el alimento (Rodríguez, et al., 2005).

Para las pruebas de recuento y recuperación por medio de M2 y observar el efecto de adherencia e internalización de *E. coli,* se analizó la planta completa de espinaca incluyendo los tejidos de raíz, tallo y hoja. Dichos tejidos fueron expuestos a los diferentes mecanismos de trasmisión (SeI, AgI, SuI) con una población inicial de 7.44 Log_{10} UFC/g (figuras 44a a 44c) este valor se relaciona con lo reportado por Manan *et al*., quienes mencionan que la única limitante para la internalización de *E. coli* depende de los niveles de población inicial en los cuales crece la planta.

Como se puede observar en las figuras 44a y 44b, se presentó un incremento en la población de *E. coli* particularmente en las plantas provenientes de semilla y suelo inoculados de aproximadamente 1.5 Log_{10} UFC/g. Asimismo para el tiempo 3 (360 horas) la población microbiana se redujo y se mantuvo casi constante como se muestra en las plantas provenientes de suelo y semilla inoculados (figuras 44a y 44c).

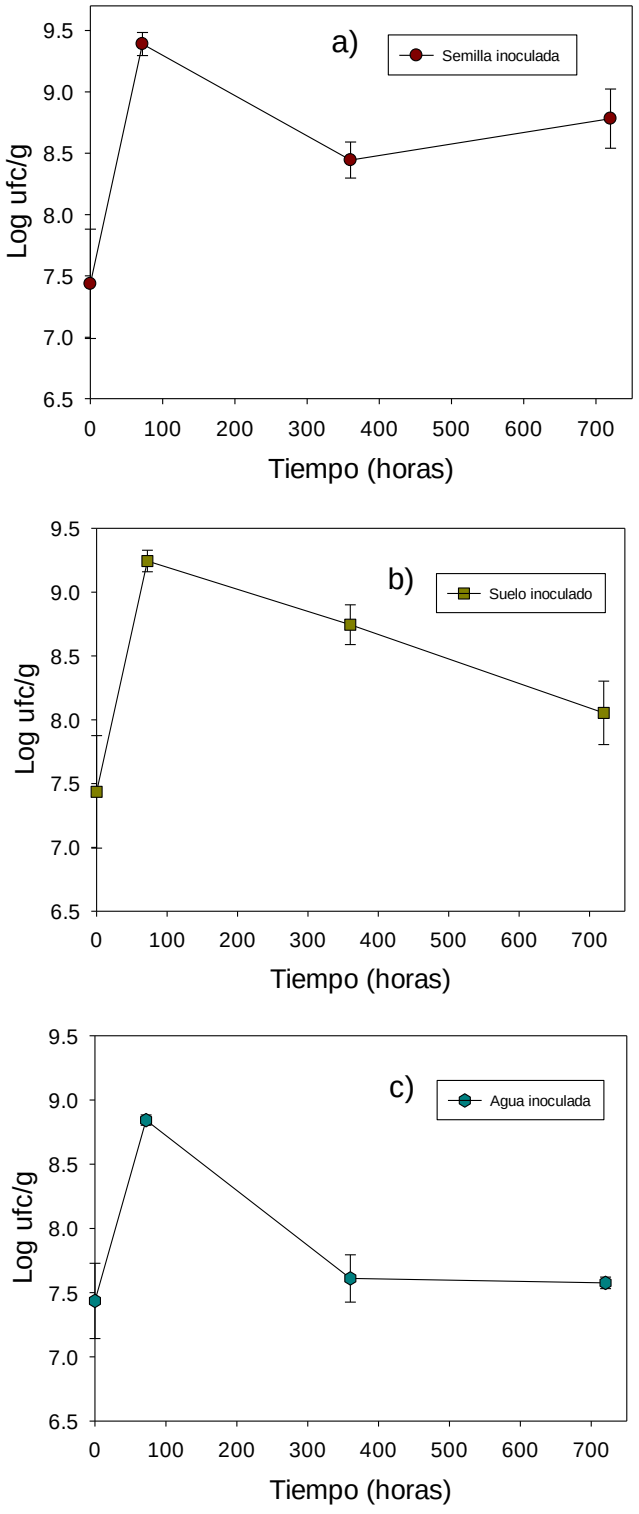

Figura. 44 Crecimiento de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) en plantas de espinaca, las cuales provinieron de: a) Semilla, b) Suelo y c) Agua inoculados, considerando el método M2 para el recuento y recuperación.

Los análisis estadísticos realizados para el método M2 (adherencia e internalización) mostraron un efecto significativo por el mecanismo de transmisión SuI, SeI y AgI, considerando un mismo tiempo de sobrevivencia con valores de $P<0.05$ para 72 horas, 360 horas y 720 horas. Realizando una prueba de Tukey se observó que existía diferencia significativa entre los tratamientos (SuI y SeI y AgI), resultando los recuentos más altos los correspondientes a suelo y semilla inoculados (tabla 10). Estos los valores pueden estar relacionados con lo reportado por Melotto, *et al*., (2006) y Underwood, et al., (2007), otros estudios asocian la internalización bacteriana con la búsqueda de un entorno más favorable y esta colonización endofítica es resultado de la infección de las raíces o de la contaminación de las semillas (Cooley, *et al*., 2003; Dong, *et al*., 2003; Tyler, *et al*., 2008).

El crecimiento de la población encontrada en el recuento de *E. coli* por M2 puede estar asociado a lo reportado en estudios recientes donde las bacterias se internalizan en las plantas, dándoles un entorno más favorable.

Tabla 10. Valores de los recuentos microbianos de *E. coli* (Log_{10} UFC/g) considerando los tres mecanismos de transmisión y como método de recuento M2 (colonización superficial e internalización).

Mecanismo de transmisión	Tiempo (horas)+		
	72	360	720
Suelo inoculado	9.24±0.083[a]	8.75±0.156[a]	8.05±0.248[b]
Agua inoculada	8.84±0.040[b]	7.61±0.184[b]	7.58±0.044[b]
Semilla inoculada	9.39±0.093[a]	8.44±0.146[a]	8.78±0.241[a]

* Los valores resultantes para el tiempo cero fueron de 7.44 Log_{10} UFC/g, además se incluyó un control dentro del modelo experimental para el cual sus valores fueron de 0 ufc/mL por lo cual no se incluyen en la tabla.
+ Valores en la misma columna con diferentes letras (a, b) son significativamente diferentes.
ł DS, desviación estándar.

Los resultados obtenidos en este trabajo para el método de recuento y recuperación 2 superficie y homogenización, correspondientes a los recuentos de bacterias a las 720 horas (28 días) se mantuvieron relativamente constantes, en comparación con los resultados obtenidos en el recuento por M1 (tabla 8). Estos cambios pueden estar relacionados con el tiempo, durante el cual las bacterias logran internalizarse, ya sea por medio de los estomas de las hojas o por medio de la quimiotaxis hacia las raíces (Kroupitski *et al*., 2009) y sobrevivir durante este periodo de tiempo. La tendencia de *E. coli* en su sobrevivencia en los tejidos espinacas pueden estar relacionado con lo estudiado por Golberg, *et al*., (2011), quienes mencionan una mayor internalización en vegetales que presentan hojas como lechuga y arúgula. Lo anterior debido a que el nivel de internalización se encuentra relacionado con el nivel de abertura de los estomas mismo que depende de la regulación del intercambio de gases y del equilibrio en la pérdida de agua.

5.5 Microscopías.

De acuerdo con los métodos de recuento y recuperación y su relación con el mecanismo de sobrevivencia de *E. coli*, ya sea por adherencia en la superficie (M1) o bien por internalización en los tejidos (M2), se analizaron las muestras con diferentes tipos de microscopías. Lo anterior con la finalidad de poder confirmar la presencia de *E. coli* mediante su adherencia y formación de biopelícula así como internalización en los tejidos (Tabla 11).

Tabla 11. Relación entre los métodos de recuento, mecanismos de sobrevivencia y tipo de microscopía para evaluar el crecimiento de *E. coli* a diferentes tiempos en y tipos de tejidos de espinaca.

Microscopía	Método de recuento y recuperación	Mecanismo de sobrevivencia	Tiempo	Tipo de tejido	AgI	SuI	SeI
IF	M2	Internalización	72	Raíz			
			360	Raíz			
				Tallo			
				Raíz			+
			720	Tallo	+		
				Hoja	+		
SEM	M1	Adherencia	72	Raíz			
			360	Raíz	+		
				Tallo	+		
				Raíz			+
			720	Tallo			+
				Hoja			+
CF	M2	Internalización	72	Raíz			
			360	Raíz			
				Tallo			
				Raíz			+
			720	Tallo	+		
				Hoja	+		

IF; inmunofluorescencia, SEM; Scan Electronic Microscopy (Microscopía electrónica de barrido), CF; confocal, M1 (Método de recuento y recuperación superficial), M2 (Método de recuento y recuperación superficial y homogenización), AgI; Agua inoculada, SuI; Suelo inoculado, SeI; Semilla inoculada, + microscopía positiva (presencia de bacterias).

5.5.1 Microscopía de epifluorescencia

Tras haber realizado los recuentos en placa para *E. coli* con los dos diferentes métodos de recuento y recuperación (M1 y M2), para los 3 tipos de mecanismos de transmisión (SeI, SuI y AgI) se realizaron observaciones por epifluorescencia y así confirmar la internalización de las bacterias en los diferentes tejidos (raíz, tallo y hoja) de la planta en la figura 45 y 46 se observa tejidos de tallo a las 720 horas de

crecimiento, en el cual se pueden confirmar la presencia de bacterias que se han logrado internalizar en este tejido.

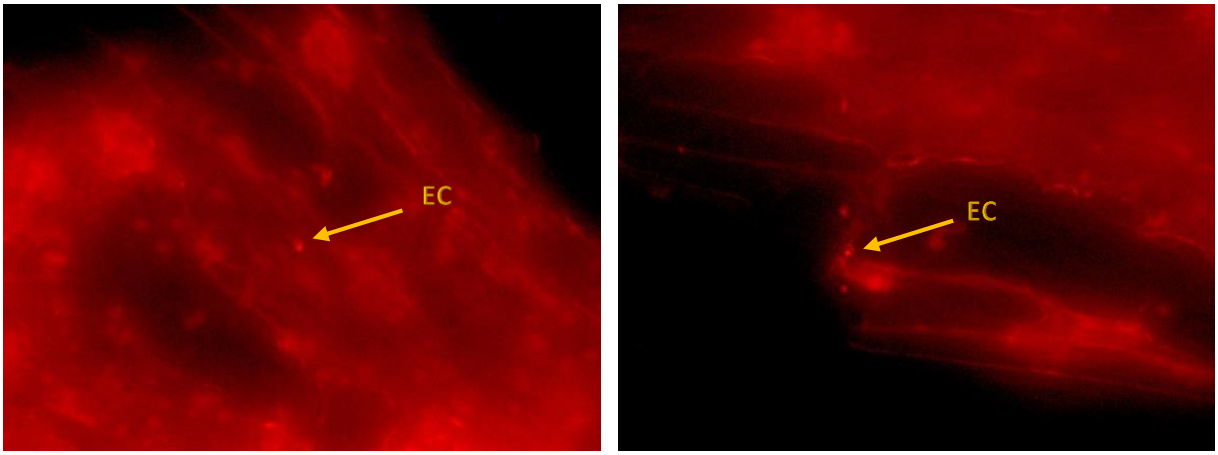

Figura. 45 Corte transversal de tejido de tallo (30µm) tras haber sido inoculado el sustrato y con crecimiento de 720 horas, observado mediante microscopía de epifluorescencia a 40x y un filtro en rojo. EC; *E. coli.*

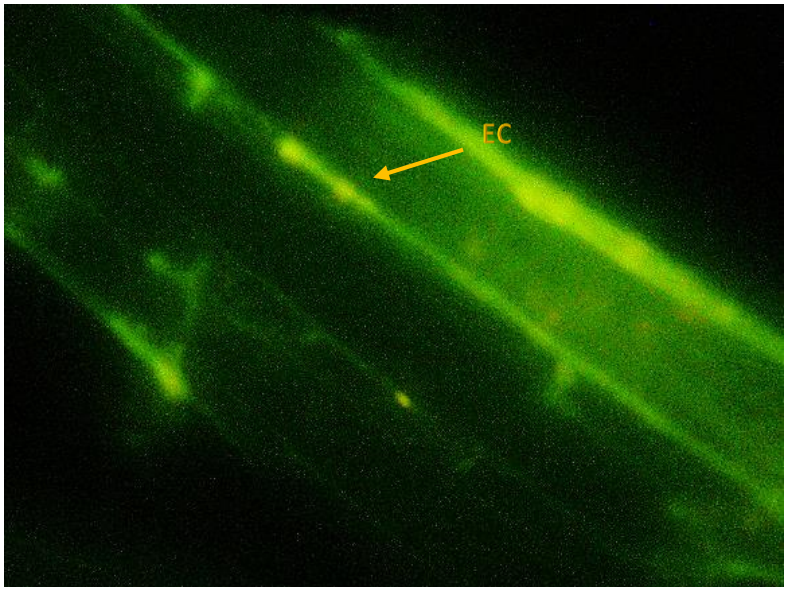

Figura. 46 Corte transversal de tejido de tallo (30µm) tras haber sido inoculado el sustrato y con crecimiento de 720 horas, observado mediante microscopía de epifluorescencia a 60x y un filtro en verde. EC; *E. coli.*

En la figura 47 podemos observar a *E. coli* que se ha logrado internalizar en hoja tras 720 horas, lo cual confirma los estudios realizados por Kroupitski *et al*., (2009)

donde la incidencia de la luz produce que los estomas de las plantas se abran más durante la fotosíntesis lo cual promueve a que suceda la internalización de microorganismos como *Salmonella* y *E. coli.* También existen reportes en donde se menciona una mayor incidencia de internalización de *E. coli* en las hojas de diversas hortalizas *(*Golberg*, et al,* 2011*).* Diversos estudios en donde se observan las interacciones entre la *E. coli* O157: H7 y hojas de lechuga cortadas demostraron apego eficiente de las bacterias a la superficie, tricomas, estomas, y cortes de bordes (Seo y Frank, 1999; Takeuchi y Frank, 2000, 2001 a, b).

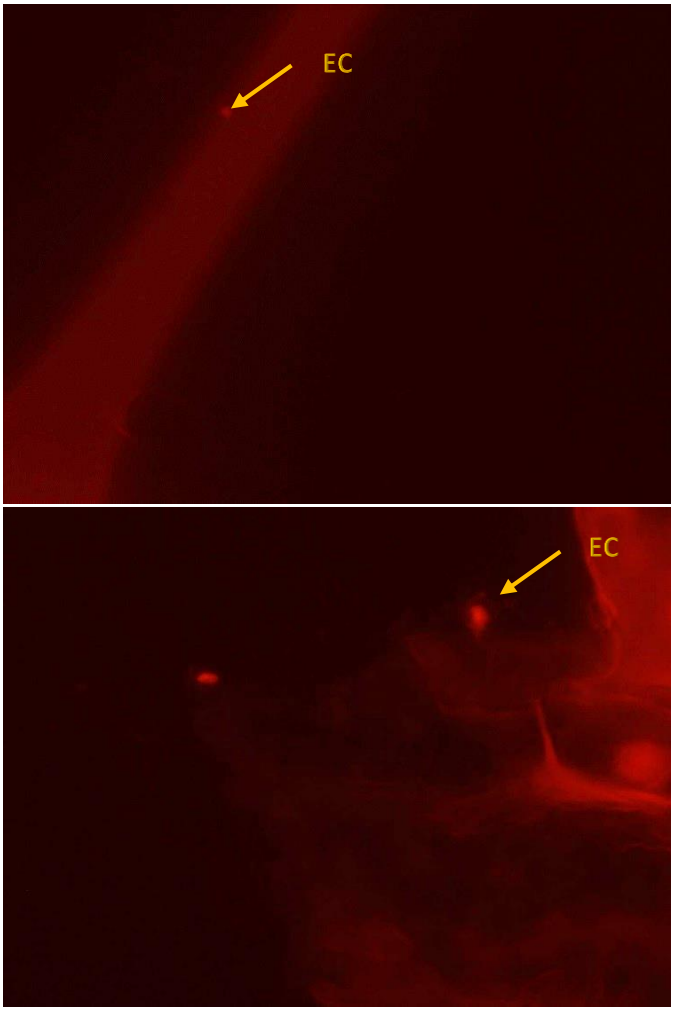

Figura. 47 Corte transversal de tejido de hoja (30µm) tras haber sido inoculada el agua y crecido durante 720 horas, mostrado mediante microscopio de epifluorescencia y observada con 60x y un filtro en rojo. EC; *E. coli*.

5.5.2 Microscopía confocal.

Las primeras determinaciones se realizaron por epifluorescencia óptica sin embargo para la confirmación de los resultados obtenidos se realizaron observaciones con microscopía confocal. Esta técnica reduce el corte a 200 nm, además reduce la autofluorescencia de las muestras y facilita la observación de las bacterias en diferentes planos. Asimismo las tomas pueden observarse de manera simultánea en campo claro, y dos canales en fluorescencia, verde para la planta (fluorescencia basal) y rojo para la tinción o visualización de *E. coli* (flourocromo especifico, rodamina) y una última toma donde se realiza una superposición de imágenes (over light).

Al haber realizado las tomas con microscopía confocal, se logró observar mucho mejor las capas internas del tejido muestra ya fuera hoja, tallo o raíz, particularmente para el mecanismo de transmisión agua inoculada a las 720 horas de crecimiento de la planta se encontró la presencia de bacterias internalizadas de *E. coli* en raíz y hoja como se muestran en la figura 48 y 49, donde la fluorescencia especifica del fluoróforo se observa en el extremo superior derecho en rojo.

En las imágenes de la 48, 49 y 50 se muestran los diferentes cortes de las muestras de espinacas inoculadas con *E. coli* por medio del agua (hoja, raíz y tallo, respectivamente) en los resultados obtenidos se identificó la internalización de la bacteria en hoja y raíz, lo que es similar a lo obtenido en la investigación realizada por Seo y Frank (1999), quienes observaron ocasionalmente células de *E coli* O157:H7 atrapadas de 20 a 100 micras debajo de la superficie de estomas y en los borde de cortes de lechuga iceberg. En un estudio reciente, se muestra que *E. coli* O157: H7 puede entrar en el tejido interno de hojas de espinaca bebé (Kroupitski et al., 2009).

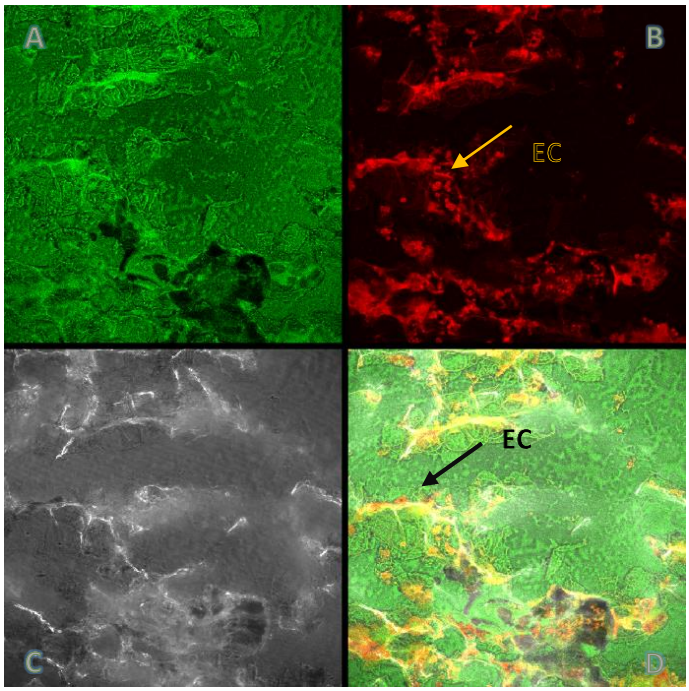

Figura. 48 Corte longitudinal de hoja (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada el agua de riego, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos. EC; *E. coli.*

Por otra parte, diversos estudios demuestran que el reciclaje del agua del lavado, una práctica común en el lavado e hidroenfriamiento, puede conducir a la contaminación cruzada (Brackett, 1998). Los microorganismos en el agua pueden contaminar la fruta a través de las lenticelas, estomas y heridas incurrido durante la cosecha.

En microscopías confocales realizadas por Golberg *et al*. (2011), se encontró *Salmonella* en superficie e internalización en las hojas de rúcula con una alta incidencia de internalización, en albahaca con incidencia de internalización media, y el perejil sin internalización. Y se mostró que esta se encuentra en el espacio subestomático y en la región intercelular (apoplasto) del parénquima esponjoso en hojas de rúcula.

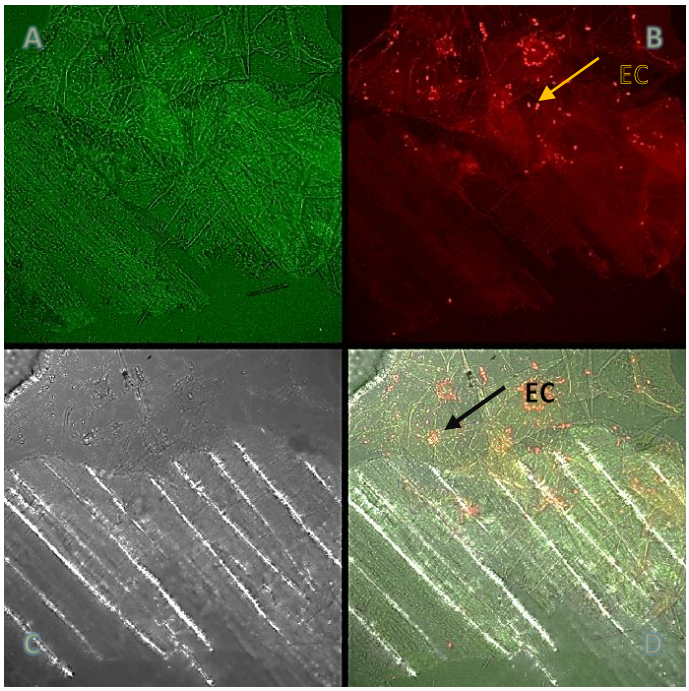

Figura. 49 Corte transversal de raíz (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada el agua de riego, microscopía confocal a 63x A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos. EC; *E. coli.*

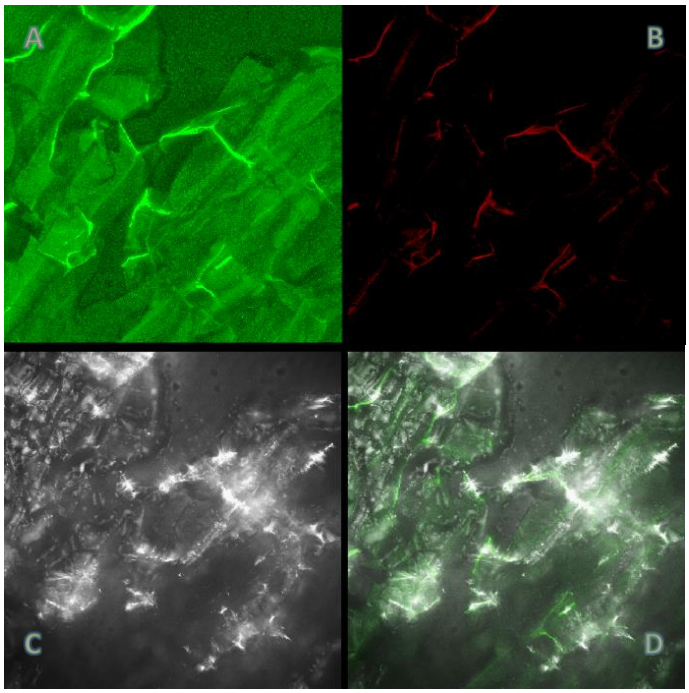

Figura. 50 Corte transversal de tallo (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada el agua de riego, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos.

De acuerdo con Lusasik *et al.,* (2001) la internalización bacteriana puede presentarse en cicatrices superficiales por ejemplo en flores, asimismo Annous *et al.,* (2001), y Reina *et al.,* (2002), encontraron que *E. coli* es capaz de adherirse principalmente a cáliz y cicatrices en tallos contaminados de manzanas Golden Delicious y pepino.

En semilla inoculada se refiere solo se encontró internalización de *E. coli* en el tejido para tallo como se muestra en la imagen 52 a diferencia de los otros tejidos donde la fluorescencia no se observa (figuras 51 y 53). El hecho de que no se observaran bacterias en las tomas de hojas y raíces de espinacas indica que no estén presentes, ya que durante el tratamiento de las muestras se pudieron haber perdido. Itoh *et al*., (1998) hallaron que *E. coli* O157:H7 se internaliza en los estomas de cotiledones de brotes de rábanos, los cuales fueron contaminados con la bacteria a partir de las semillas.

A pesar de que sólo se observa internalización en los tallos de espinaca, esto no quiere decir que sea un riesgo menor, ya que una vez internalizadas las bacterias ya no son susceptibles a los métodos de desinfección convencionales en la elaboración de alimentos y producción de hortalizas (Seo y Frank, 1999). Lo que plantea un peligro potencial para la seguridad de los consumidores. Además de que existe la posibilidad de que con el transcurso del tiempo estas bacterias se desplacen hacia otras partes de la misma hortaliza.

Además de que la contaminación de semillas con *E. coli* representa un peligro latente, como el caso reportado por Breuer et al., (2001) donde e reporta un brote de *Escherichia coli* O157:H7 ocurrido en Estado Unidos de Junio a Julio en 1997, en el que varias personas presentaron la patología y se encontró que el único vínculo en común fue el uso del mismo lote de semillas de alfalfa, crecido y se

expedido en Idaho, que indica que la semilla estaba contaminada antes de que fuera enviado a las instalaciones, el brote terminó después de los brotes de alfalfa del lote de semillas implicado ya no se vendieron. Esta fue la primera evidencia de la importancia de los métodos de desinfección en materias primas.

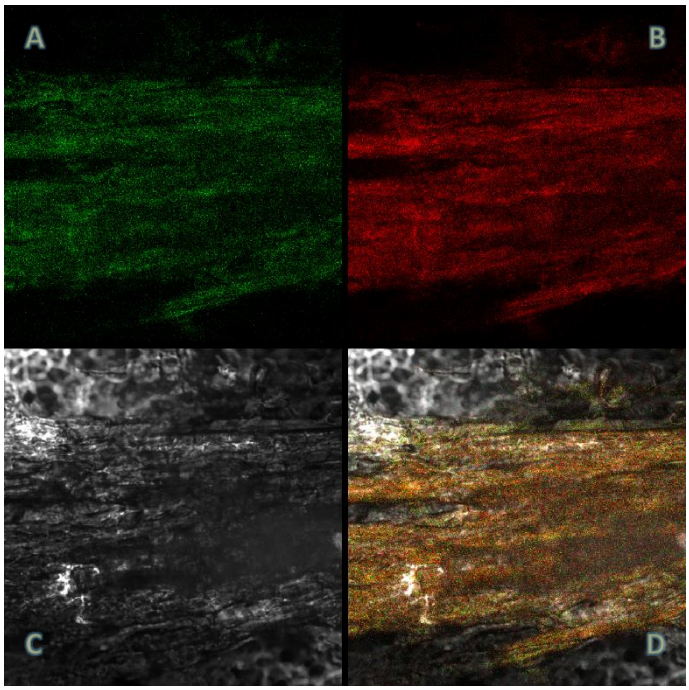

Figura. 51 Cortes transversal de raíz (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada la semilla, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos.

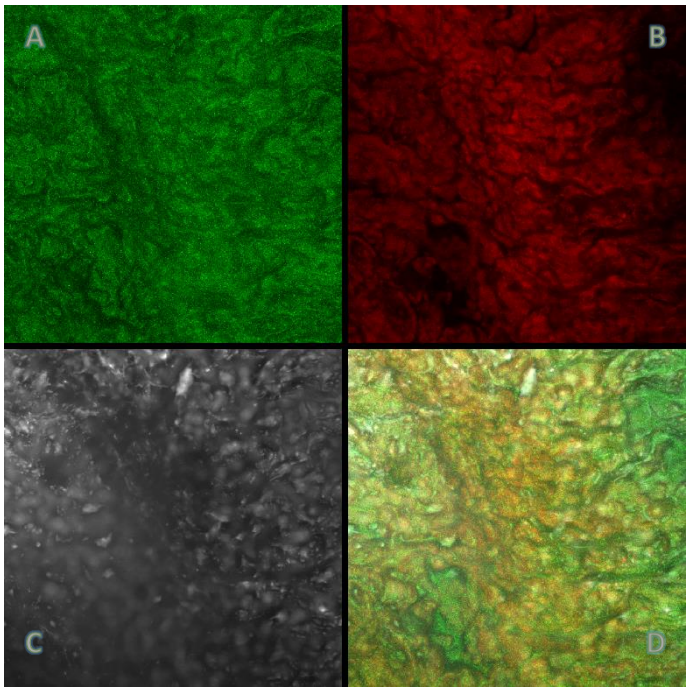

Figura. 52 Cortes longitudinal de hoja (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada la semilla, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos.

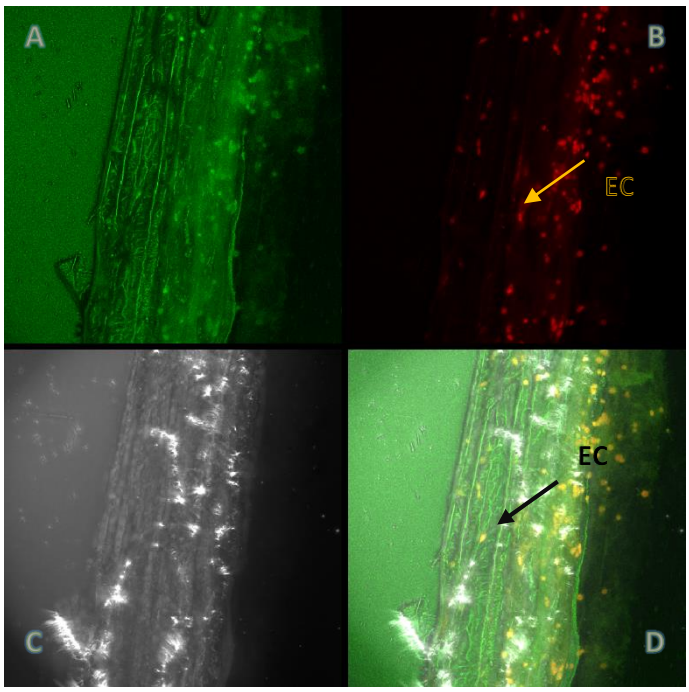

Figura. 53 Cortes transversal de tallo (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculada la semilla, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos. EC; *E. coli.*

Resultados obtenidos por Sharma *et al.,* (2009), donde hacen observaciones similares con microscopio de inmunofluorescencia para la internalización de *E. coli* en espinacas después de haber sido inoculadas, se asemejan a lo encontrado en este trabajo.

Por último para el mecanismo de transmisión de suelo inoculado, no se presentó la fluorescencia lo cual indica que no se internalizó la bacteria en ningún tipo de tejido (figuras 54, 55 y 56), lo cual difiere de lo encontrado con los recuentos donde el mecanismo de transmisión de suelo inoculado tuvo los recuentos más altos durante todo el periodo de crecimiento de la planta incluso para el método de recuento y recuperación M2.

En un estudio realizado por Solomon, *et al*., (2002), se encontró presencia de *E. coli* O157:H7 y la subsecuente internalización de la misma en plantas de lechuga producidas por medio de estiércol contaminado incorporado al suelo y en agua de riego contaminado. En este mismo estudio se determinó que la *E. coli* puede ser transportada desde el sistema de raíz en la parte comestible, supuestamente por el sistema vascular de la planta.

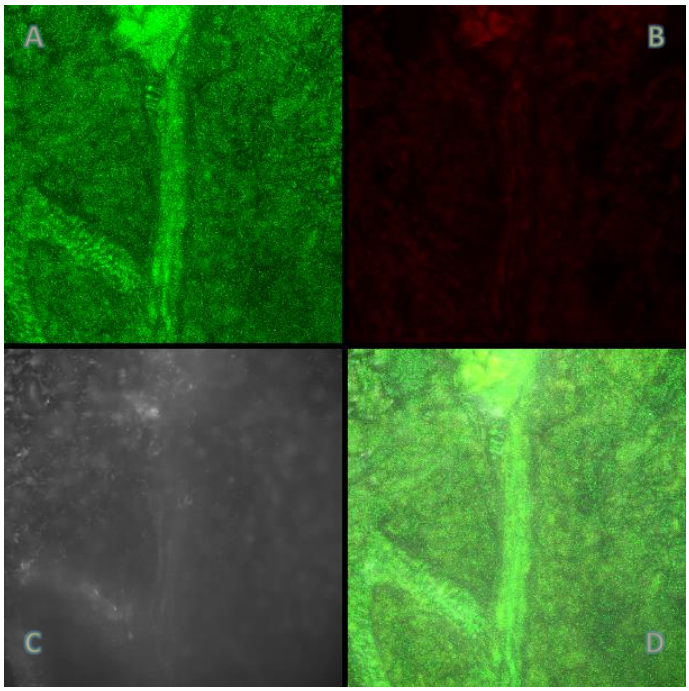

Figura. 54 Cortes longitudinal de hoja (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculado el suelo, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos.

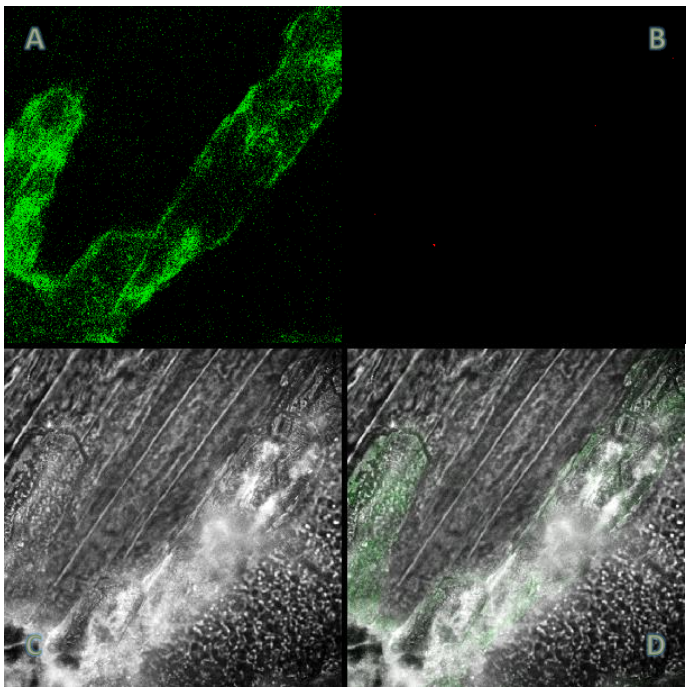

Figura. 55 Cortes transversal de raíz (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculado el suelo, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos.

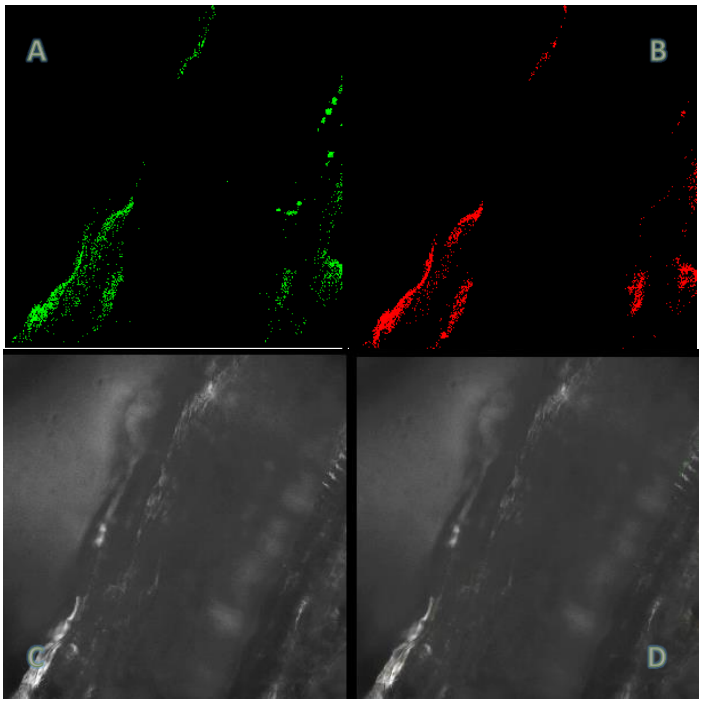

Figura. 56 Cortes transversal de tallo (30µm) después de 720 horas tras haber sido inoculado el suelo, microscopía confocal a 63x. A) Campo verde (color del tejido), Fluorescencia basal, B) Campo rojo fluorocromo, C) Campo claro, D) Superposición de los campos.

5.5.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Debido a que uno de los mecanismos de sobrevivencia de algunas bacterias es la adherencia y la formación de biopelícula sobre la superficie de los vegetales, se realizaron observaciones con un microscopio electrónico de barrido de los diferentes tejidos.

En las figuras 57, 58, 59 y 60 se observar tomas macroscópicas de raíz (figura 57) y tallo (figura 59) a las cuales se les hizo un acercamiento hasta 10,000x donde en las figuras 58 y 59 podemos observar la presencia de bacterias sobre las superficie de estos dos tejidos.

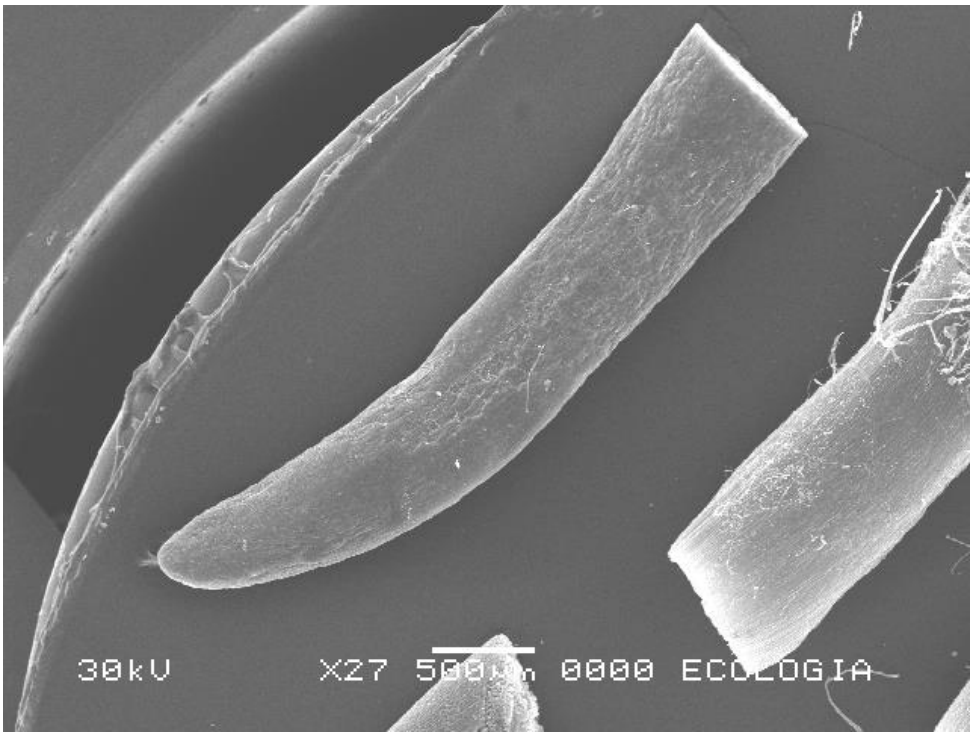

Figura. 57 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 500µm.

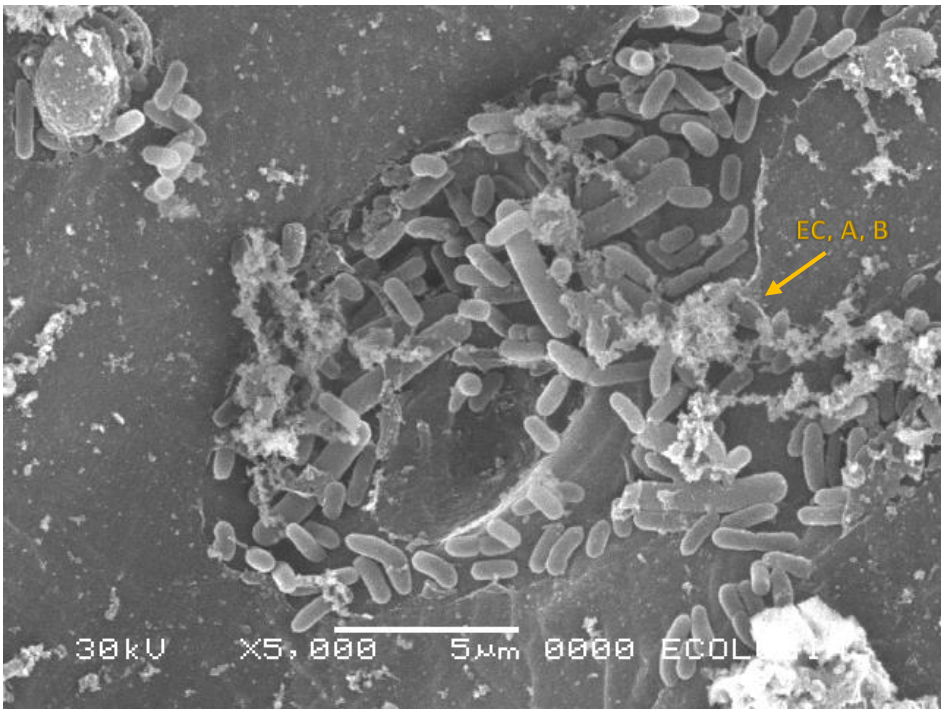

Figura. 58 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 5µm. EC; *E. coli*. A; Adherencia, B; Biopelícula.

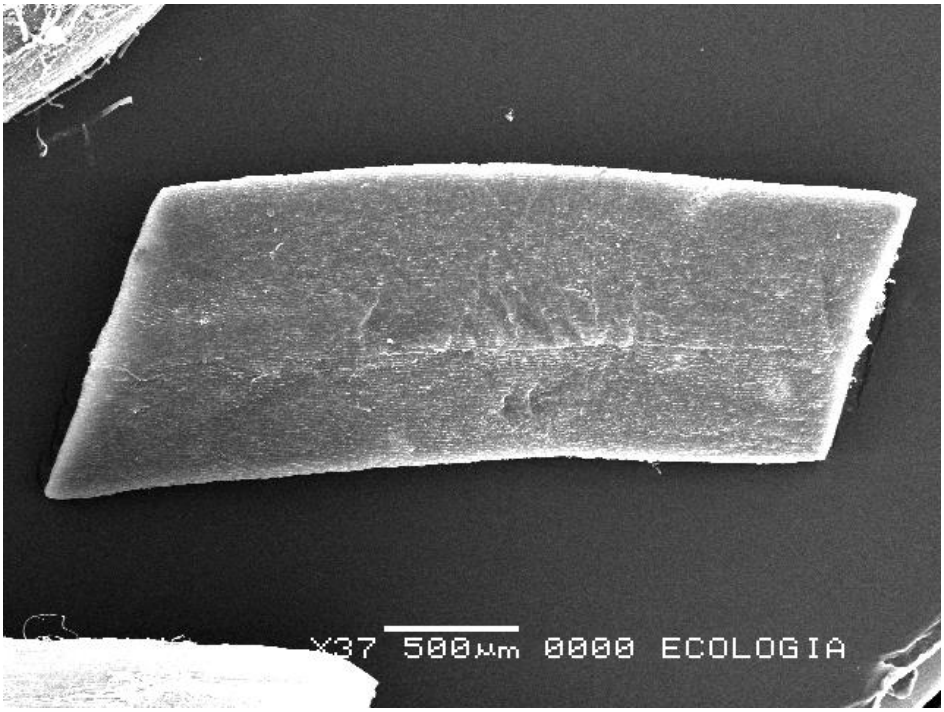

Figura. 59 Corte de tallo de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 500µm.

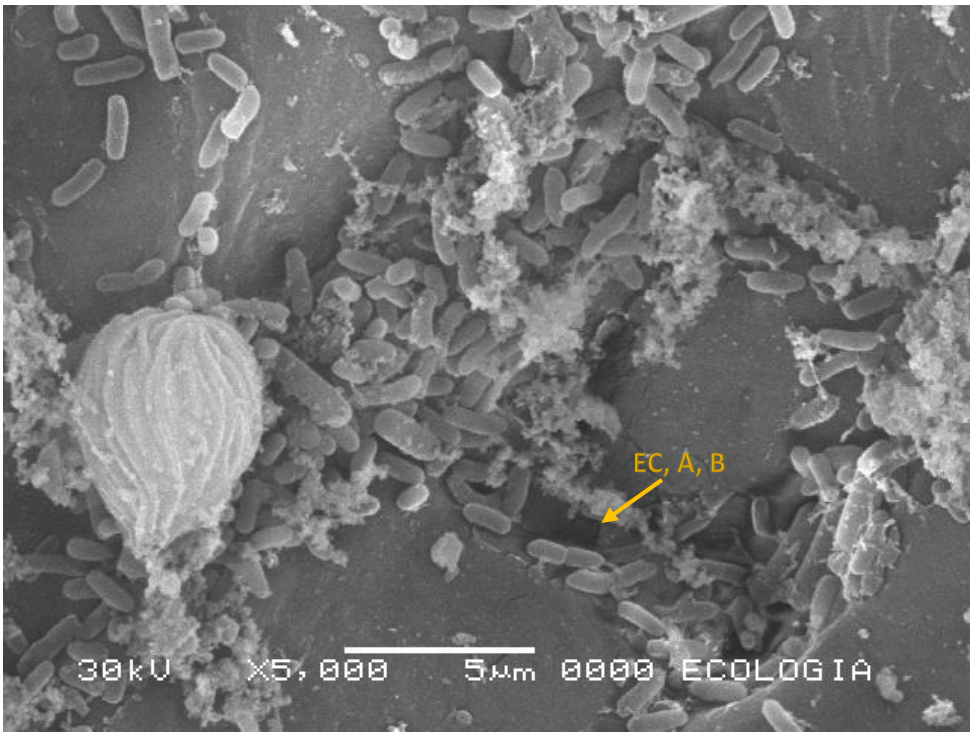

Figura. 60 Corte de tallo de espinaca donde fue inoculada el agua de riego y crecida durante 360 horas, observada mediante SEM, Barra: 5µm. EC; *E. coli*. A; Adherencia, B; Biopelícula.

En la figura 61 se observa una parte de raíz después de haber sido deshidratada y sometida a un recubrimiento de oro, partiendo de esta imagen se buscó sobre la superficie de la muestra bacterias, y la formación de biopelículas.

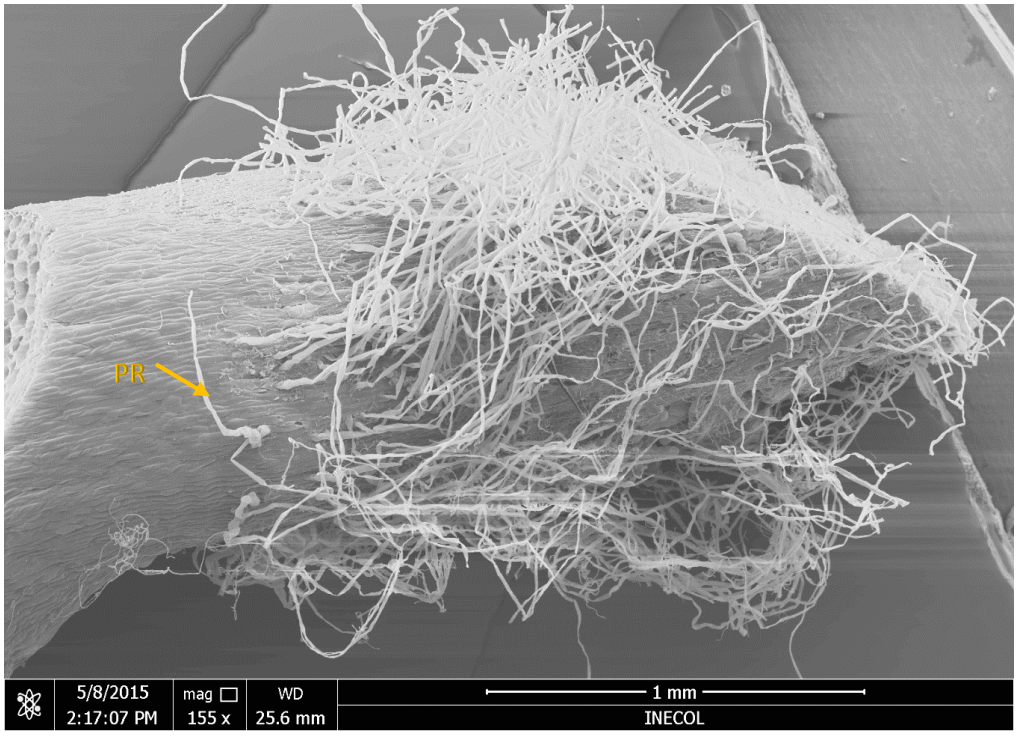

Figura. 61 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 1mm. PR; Pelos radicales de la raíz.

En las imágenes que corresponden para el mecanismo de transmisión de semilla inoculada, después de las 720 horas (Figuras 62, 63 y 64), para los tres tejidos se observan tanto bacterias adheridas sobre la superficie, como la formación de biopelícula. Particularmente para la sección de tejido correspondiente a raíz se logran observar mayor número de bacterias en la superficie.

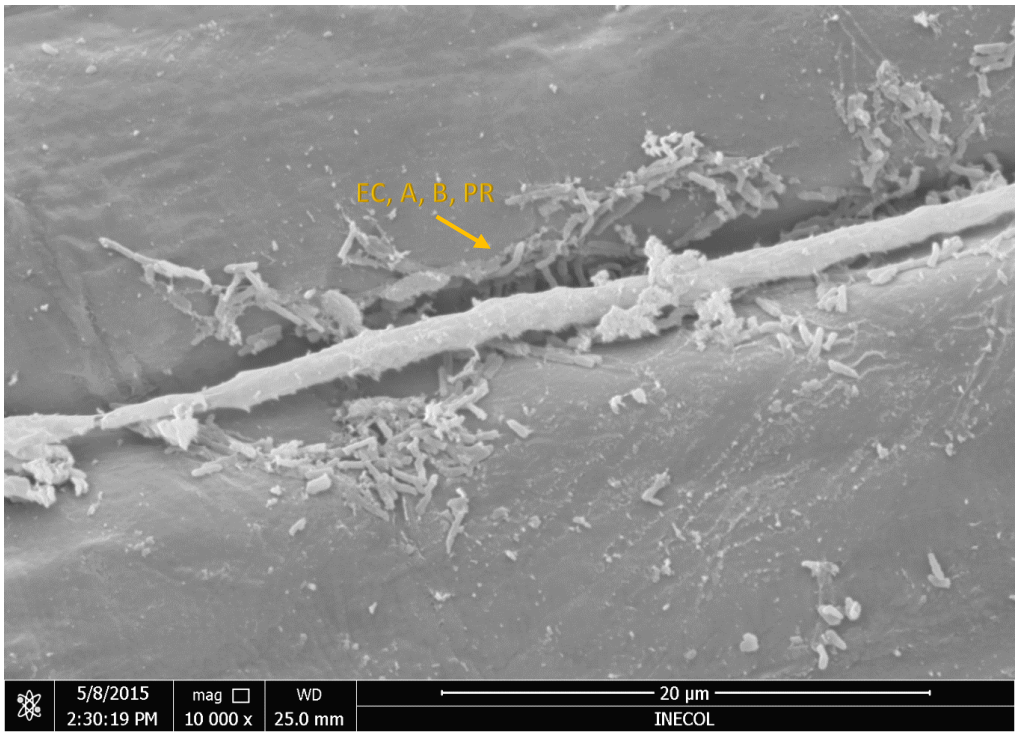

Figura. 62 Corte de raíz de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 20µm. EC; *E. coli*. A; Adherencia, B; Biopelícula, PR; Pelos radicales de la raíz.

En la figura 63 podemos observar los estomas de la hoja, y como se mencionó en la sección anterior pueden ser una entrada para las bacteria (Kroupitski *et al.,* 2009), dando como resultado que esta técnica de microscopía no sirva solamente para observar la adherencia, sino también como interactúan las bacterias sobre estos.

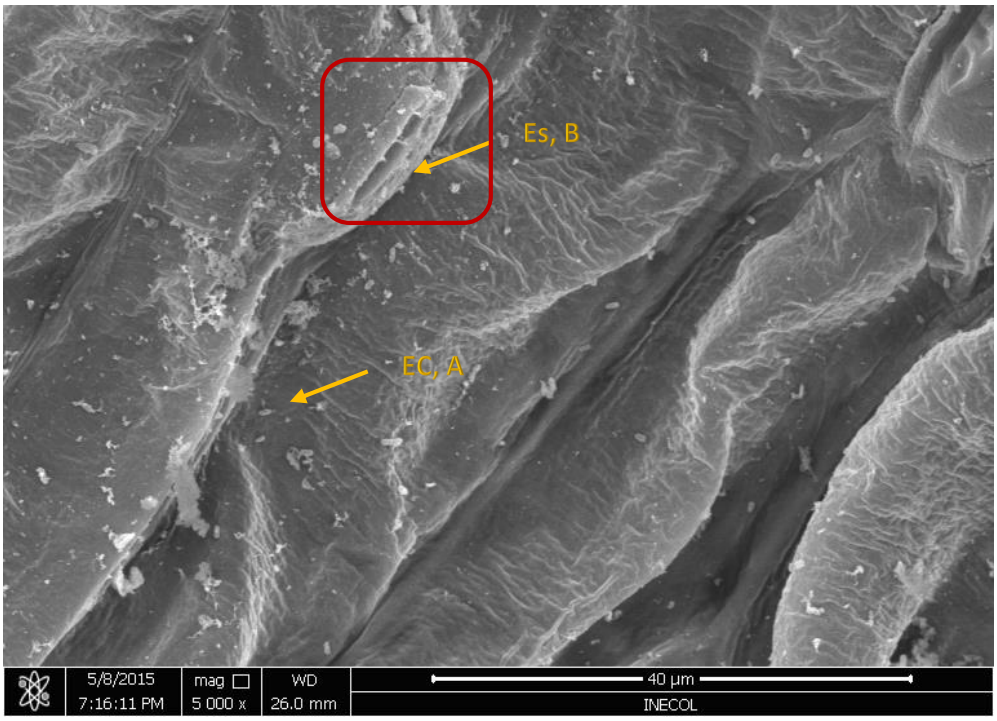

Figura. 63 Corte de hoja de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 50µm. EC; *E. coli*, A; Adherencia, Es; Estoma, B; Biopelícula

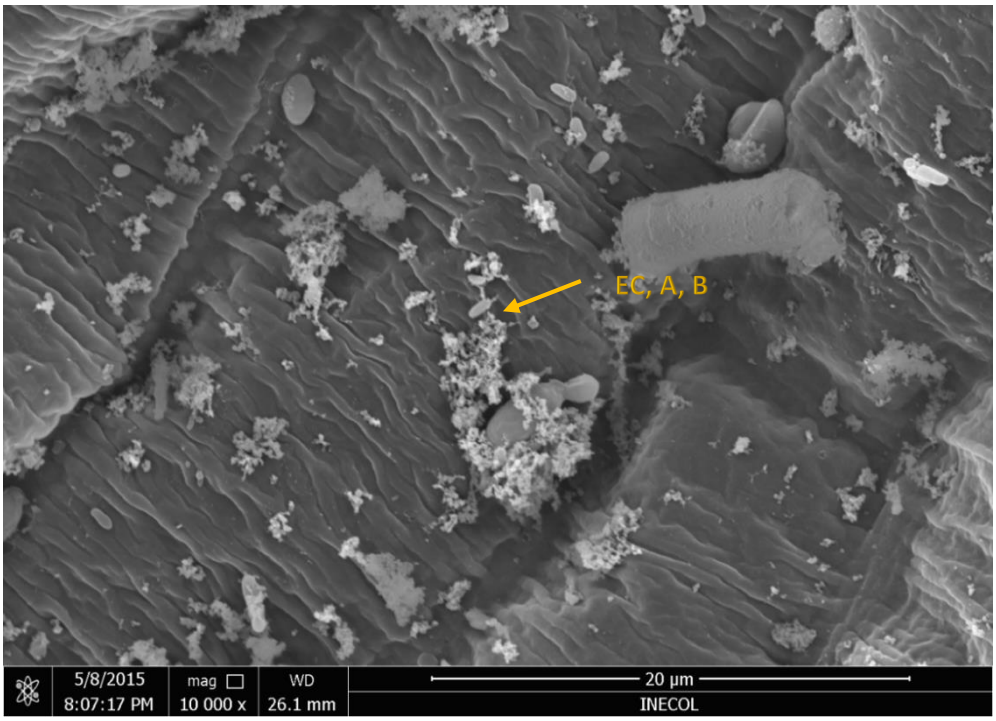

Figura. 64 Corte de tallo de espinaca donde fue inoculada la semilla y crecida durante 720 horas, observada mediante SEM, Barra: 20µm. EC; *E. coli*, A; Adherencia, B; Biopelícula.

Estudios realizados previamente demuestran que las hojas de lechuga se mantuvieron contaminadas con *E. coli* O157:H7 incluso después del lavado, lo que indica que la superficie y el agua de riego que se utiliza plantea riesgos importantes (Solomon *et al.,* 2002), así pues, en el trabajo realizado para espinaca se demuestra la sobrevivencia superficial después de 720 horas independientemente del mecanismo de transmisión al que fue sometido.

VI Conclusiones y sugerencias

- Fue posible recuperar a *E. coli* tras 720 horas de crecimiento de los tejidos vegetales sin importar el mecanismo de transmisión suelo, agua y semilla inoculados.
- Los valores de los recuentos de *E.* coli aumentaron cercanos a 1.3 Log_{10} UFC/g después de 72 horas, sin importar el mecanismo de transmisión, y el método de recuento y recuperación, confirmando la fase exponencial del microorganismo.
- El método de recuento y recuperación 2 superficial y homogenización (M2), resultó ser más efectivo para evaluar el crecimiento de *E. coli* debido a que se consideraron bacterias tanto internalizadas como superficiales presentes en los tejidos de espinaca.
- Para el método de recuento y recuperación superficial (M1), los recuentos fueron mayores para suelo inoculado a las 72 horas con valores de 1.5 Log_{10} UFC/g.
- Dependiendo del posible mecanismo de transmisión se incrementaron los valores de Log_{10} UFC/g para el método de recuento y recuperación superficial y homogenización (M2) en semilla inoculada con 1.8 Log_{10} UFC/g.
- Se confirma la internalización de *E. coli* en tejidos de raíz y hoja para agua inoculada y tallo para semilla inoculada, por las microscopías de inmunofluorescencia y confocal transcurridas las 720 horas de desarrollo de la planta.
- Las microscopías electrónicas de barrido confirman la adherencia y desarrollo de *E. coli* en superficies y estomas lo cual puede favoreció la internalización en tejidos como hoja.
- La adherencia e internalización de *E. coli* en tejidos de espinaca se relacionan con el riesgo potencial de adquirir una enfermedad transmitida por alimentos por el consumo de este vegetal.

- Se sugiere realizar estudios relacionados con las posibles fuentes de contaminación para diseñar medidas preventivas que garanticen la inocuidad de vegetales como la espinaca u otros vegetales que se consumen crudos.
- Debería tomarse en cuenta para futuras investigaciones la determinación de recuentos para los diferentes tejidos raíz, hoja y tallo y confirmar a que nivel se produce la contaminación microbiológica.
- Aumentar los tiempos de análisis considerando los tres mecanismos de transmisión semilla inoculada, agua inoculada y suelo inoculado, en los dos métodos de recuento y recuperación superficial y superficial y homogenización de *E. coli*, como se evaluaron en este estudio.
- Desarrollar tratamientos de limpieza y desinfección eficientes para el consumo de estos vegetales de acuerdo con los resultados obtenidos.

VII. Bibliografía

ABBOTT DW, BORASTON AB., 2007. The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase. J Mol Biol 368: 1215–1222.

ABDUL-RAOUF, BEUCHAT, L.R., AMMAN M.S. 2006. Survival and growth of *Escherichia coli* en salad vegetables. Appl. Environ. Microbiol. 1993. 59:1999.

ACKERS, M. L., MAHON, B. E., LEAHY, E., GOODE, B., DAMROW, T., HAYES, P. S., BIBB, W. F., RICE, D. H., BARRET, T. J., HUTWAGNER, L., GRIFFIN, P. M., SLUTSKER, L. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. J Food Prot. 61:1305-1311.

AHVENAINEN, R., 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. Trends in Food Science & Technology, 7(6), 179–187.

ALBERT, L.A y RENDÓN-VON OSTEN, J., 1988. Contaminación por conpuestos organoclorados en algunos alimentos procedentes de una región de México. Rev. Saúde Públ., S. Paulo, 22:500-6.

AMOAH, P., DRESHSEL, P., ABAIDOO, R. C., Y KLUTSE, A. 2007. Effectiveness of common and improved sanitary washing method in selected cities of West African for the reduction of coliform bacteria and helminthes eggs on vegetables. Tropical Medicine and International Health, 12, 40e50.

ANNOUS BA, SAPERS GM, MATTRAZZO AM, RIORDAN DCR. 2001. Efficacy of washing with a commercial flat-bed brush washer, using conventional and experimental washing agents, in reducing populations of *Escherichia coli* on artificially inoculated apples. J Food Prot 64(2):159-63.

ANONIMO, 2010. Multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded Romaine lettuce from a single processing facility. Available at: http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html. Revisado diciembre 2014.

ANONIMO, 2012. Investigation announcement: Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to Romaine lettuce. Disponible en: http://www.cdc. gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/120711/index.html., revisado diciembre 2014.

ARAUJO E. A., ANDRADE, N. J., CARVALHO, A. F., RAMOS A. M., SILVA C. A. S., 2010. Colloidal aspects of bacterial adhesion. Quím. Nova. 33:1940-1948.

BALL, E. M., 1974. Serological test for the identification of plant viruses. Am. Phytopathol Soc., Plant Virology Commitee, St. Paul Minn 31p.

BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J. V., VANGRONSVELD, J., VAN DER LELIE, D., 2004. Engeneeredendophytic bacteria improve phytoremedation of wáter-soluble, volatile, organic pollutants. Nature Biotechnology. 22(5):583.

BENÍTEZ, O., URIBE F., NAVARRO A., HERNÁNDEZ D., RUIZ T., CRAVIOTO A., 1991. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. Bol Med Hosp Infant Mex 48:65-70.

BERGER, C., SODHA, S., SHAW, R., GRIFFIN, P., PLKN, D., HAND, P., FRANKEL, G., 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. UK. Environmental Microbiology. 12(9), 2385–2397

BERGQUIST, S. A. M., GERTSSON, U. E., OLSSON, M. E., 2006. Influence of growth stage andpostharvest storage on ascorbic acid and carotenoid content and visual qualityof baby spinach (Spinacia oleracea L.). J. Sci. Food Agric. 86, 346–355.

BEUCHAT, L. R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. Microbes and Infections, 4, 413e423.

BEUCHAT, L. R., 1996. Phatogenic microorganism associated with fresh produce. J. Food Prot. 59:204-216.

BEUCHAT, L. R., 1999. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. J Food Prot. 62: 845-849.

BEUCHAT, L. R., SCOUTEN, A. J., 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatment on the survival of Salmonella and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. J Food Prot. 92: 382-395.

BRACKETT, R. E., 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. Postharvest Biology and Technology, 15(3), 305–311.

BRESSANI, R., HARPER, J.M. y WHICKSTROM, B., 1984. Processed and packaged weading foods: development, manufacture and marketing. In: Mitzner, N., Scrimshaw, N., Morgan, R., Eds. Improving the nutritional status of children during weaning period. págs. 51-64. MIT. Cambridge, MA, EEUU.

BREUER, T., BENKEL, D. H., SHAPIRO, R. L., HALL, W. N., WINNETT, M. M., LINN, M. J., NEIMANN, J., BARRET, T. J., DIETRICH, S., DOWNES, F. P., TONEY, D. M., PEARSON, J. L., ROLKA, H., SLUTSKER, L., GRIFFIN, P. M. A, 2001. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated sedes. Emerging Infectious Diseases Vol 7, no. 6.

BREUER, T., BENKEL, D.H., SHAPIRO, R.L., HALL, W.N., WINNETT, M.M., LINN, M.J., 2001. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. Emerg Infect Dis 7: 977–982.

BROKRANZ W, WANG X, TSCHÄPE H et al. 2005. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. J. Med. Microbiol.; 54: 1171-82.

BRYAN, F. L. 1977. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. J. Food Prot. 40:45-56.

BURNETT, S. L., BEUCHAT, L. R. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 25(6), 281–287, 2000.

BUTLER, J. L., J. C. STEWART, C. VANDERZANT, Z. L. CARPENTER, Y G. C. SMITH. 2000. Attachement of microorganisms to pork skin and surfaces of beef and lamb carcasses. J. Food Prot. 42:401-406, 1979.

CARPENTIER, B.; CERF, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry: Review, J Appl Bacteriol.m, 75, 499-511.

CASSERES E. 1980. Producción de hortalizas. IICA, 3ra edición, San José, Costa Rica.

CASTAÑEDA, R. N. B., 2000. Identificación de *Escherichia coli* O157H:7 en verduras y frutas congeladas para exportación. 5-7.

CASTRO-ROSAS, J. y E. F. ESCARTÍN. 2000. Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. J. Food Sci. 65:162-165

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (a), 2006, Ongoing Multistate Outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach, Morbidity and Mortality Weekly Report, Vol. 55, Estados Unidos.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (b), 2006. Update on mutistates outbreaks of *E. coli* O157:H7 infections from fresh spinach. Available online: http://www.cdc.gov/foodborne/-ecolispinach/current.htm.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) A., 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach - United States, Septiembre 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 55:1-2.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2006. B. Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections, November-December 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2002. Outbreak of Salmonella serotype Kottbus infections associated with eating alfalfa sprouts – Arizona, California, Colorado, and New Mexico, February–April 2001. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 51: 7–9.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC), 1988. Summary of notifiable diseases, United States.

CENTERS FOR DISEASE ONTROL AND PREVENTION (CDC), 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and Campylobacter among attendees of the Washington county fair-New York, Morb Mortal Wkly Rep. 48: 803-804.

CHMIELEWSKI, R.; FRANK, J. 2003. Biofilm Formation and Control in food Processing Facilities. Compr Rev Food Sci Saf., 2, 22-32.

CHUA, D. GOH, K. R. SAFTNER, A. BHAGWAT. A.A. 2008. Fresh-cut lettuce in modified atmosphere packages stored at improper temperatures supports enterohemorrhagic *E. coli* isolates to survive gastric acid challenge, Journal of Food Science, 73 (3), pp. M148–M153.

COMM ESPRESSO, *E. coli* outbreak: laboratory confirmation of contamination source is major breakthrough, says Commissioner John Dalli, 2011, revisado agosto de 2014, http://ec.europa.eu/food/food/docs/comm_espresso_ecoli_11062011_en.pdf, Alemania.

CONTE, A., CONVERSA, G., SCROCCO, C., BRESCIA, I., LAVERSE, J., ELIBA, A., NOBILE, M.A.D., 2008. Influence of growing periods on the quality of baby spinach leaves at harvest and during storage as minimally processed produce. Postharvest Biol. Technol. 50, 190–196.

COOKSON, A. L., COOLEY, W. A., WOODWARD, M. J., 2002. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic Surface. Int. J. Med. Microbiol. 37:424-432.

COOLEY M, CARYCHAO D, CRAWFORD-MIKSZA L, JAY MT, MYERS C, et al, 2007. Incidence and Tracking of *Escherichia coli* O157:H7 in a Major Produce Production Region in California. PLoS ONE 2(11): e1159. doi:10.1371/journal.pone.0001159

CRAVIOTO A, ORTEGA R, RODRÍGUEZ P, REYES R, LÓPEZ D, FERNÁNDEZ G., 1985. Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. I. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el periodo neonatal. Bol Med Hosp Infant Mex 42:287-296.

DAVILA, M., SANGRONIS, E. Y GRANITO, M. 2003. Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. Archivos Latinoaméricanos de Nutrición, 53(4): 348-354.

del ROSARIO BA, BEUCHAT LR., 1999. Survival and Growth of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Cantaloupe and Watermelon. Journal of Food Protection 58:105-107.

DÍAZ R., VERNON J., 1999. Inocuidad microbiológica de frutas frescas y mínimamente procesadas. Cienc Tecnol Aliment, 2: 133-136.

DIAZ-SOBAC, R., VERNON-CARTER, J. 1990. Inocuidad microbiológica de frutas frescas y mínimamente procesadas. Ciencia y Tecnología Alim4entaria. Vol. 2 3: 133-136.

DICKSON, J. S., Y M. ROSENBERG. 1990. Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement and significance, p, 1-37. En R. J. DOYLE Y M. ROSENBERG (ed). Microbial surface hydrophobicity. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

DONG, Y., INIGUEZ, A. L., AHMER, B. M., TRIPLETT, E. W., 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of Madicago sativa and Medicago Truncatula. Appl. Environ. Microbiol. 69:1783-1790.

DONNENBERG, M. S., TACKET, C. O., LOSONSKY, G., FRANKEL, G., NATARO, J. P., DOUGAN, G. Y LEVINE, M. M., 1998. Effect of prior experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection on illness following homologous and heterologous rechallenge. Infection and Immunity. 66, 1, p. 52-58 7 p.

ECONOMIC RESEARCH SERVICE, 2010. Vegetables and melons yearbook. Revisado noviembre 2014, disponible en http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/ers/89011/Table072.xls.

ELIKA. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Tipos de contaminación. , revisado el 25 de Noviembre de 2014. Disponible en: http://www.elika.net/datos/formacion_documentos/Archivo9/6.Tipos%20de%20contaminaci%C3%B3n%20alimentaria.pdf.

EMBERLAND, K.E., ETHELBERG, S., KUUSI, M., VOLD, L., JENSVOLL, L., LINDSTEDT, B.A., 2007 Outbreak of Salmonella Weltevreden infections in Norway, Denmark and Finland associated with alfalfa sprouts, July–October 2007. Euro Surveill 12: pii=3321.

ERICKSON, M.C., AND DOYLE, M.P., 2007, Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Food Prot 70: 2426–2449.

EROSKI. Espinacas, disponible en: http://verduras.consumer.es/documentos/hortalizas/espinacas/intro.php. Revisado el 18 de noviembre 2014.

ESLAVA, C.A., Patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica, http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-

coli.html, departamento de salud pública de la UNAM, última revisión 2014, revisado en noviembre 2014.

FAO., 2007 Codex Alimentarius, Food Standards Programme, 17 ed.

FDA. 2009. Program information manual retail food protection: Recommendations for the temperature control of cut leafy greens during storage and display in retail food establishments disponible en: http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/IndustryandRegulatoryAssistanceandTrainingResources/ucm218750.htm revisado 18 de noviembre 2014.

FDA, 1998. Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables, U.S. Food and Drug Administrastion. Disponible en http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/hhsprout.htlm, revisado el 14 de octubre de 2014.

FENA, P. 1996. *Escherichia coli* serotypes O157:H7. Novel vehcles of infection and emergente of phenotypic variants. Synopsis, US Food and Drug Administration, US FDA. Washington, DC; USA. Doc. Tec. No. 1, 1:1-9.

FERGUSON, D.D., SCHEFTEL, J., CRONQUIST, A., SMITH, K., WOO-MING, A., ANDERSON, E. 2005 Temporally distinct *Escherichia coli* 0157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source – Colorado and Minnesota, 2003. Epidemiol Infect 133: 439–447.

FERNÁNDEZ, E. E. 2000 Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. México, DE Universidad Autónoma de Querétaro.

FETT, W.F., 2006. Interventions to ensure the microbial safety of sprouts. In: Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E. (Eds.), Microbiology of Fruits and Vegetables. Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, FL., pp. 187–210.

FIRSTENBERG-EDEN, R., S. NOTERMANS, F. THIEL, S. HENSTRA, Y E. H. KAMPLEMACHER. 1979. Scanning electron microscopic investigations into attachment of bacteria to teats of cows. J. Food. Prot. 44:602-607.

GAGLIARDI, J. V., KARNS, J. S. 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. Env. Microbiol. 4, 2: 89-96.

GARCIA, C, TANOADA, O. R., LOPEZ, H, LOPEZ, P A., MORA G, TLAPA, B., 2011. Calidad de plántulas de chile "poblano" en la sierra nevada de Puebla, México, México, Fitotec. 34(2):115.

GARCÍA, I., DORRONSORO, C. 2005. Contaminación por Metales Pesados. En Tecnología de Suelos. España, DE Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola.

GARRETT, T.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, Review, Prog Nat Sci., 18;1049-1056.

GIL, A., 2010. Tratado de nutrición: composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos, Volumen 2, Médica Panamericana.

GOLBERG, D., KROUPIYSKI, Y., BELAUSOW, E., PINTO, R., SELA, S. 2011. Salmonella Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. Int J Food Microbiol. 145: 250-257.

GRANT, J., WENDELBOE, A. M., WENDEL, A., JEPSON, B. TORRES, P., SMELSER, C., ROLFS, R. T., 2008. Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, Emerg Infect Dis. 14:1633–1636.

GUERRANT RL, SCHORLING JB, MCAULIFFE JF, DE SOUZA MA. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. Am J Trop Med Hyg. 1992 Jul; 47 (1 Pt 2):28–35.

GUO, XUAN, CHEN, JINRUM BRACKETT, ROBERT E., BEUCHAT, LARRY R., 2001. Survival of Salmonnellae on and in Tomato Plants from the Time of Inoculation at Flowering and Early Stages of Fruits Development through Fruit Ripening, Georgia, Applied and Enviromental Microbiology. 67(10):4760.

HALFACRE G. R., Barden, J., 1984 Horticultura, México, 1ra edición.

HERALD, P., Y E. ZOTTOLA. 1988. Attachment of Listeria monocytogenes to stainless Steel surfaces at various temperaturas and pH values. J. Food Sci. 53:1549-1552.

HILLBORN, E. D., MERMIN, J. H., MSHAR, P. A., HADLER, J. L., VOETSCH, A., WOJTKUNSKI, C., SWARTZ, M., MSHAR, R., LAMBER-FAIR, M. A., FARRAR, J. A., GLYNN, M. K., SLUTSKER, L. A. 1999. multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. Arch Inter Med. 159:1758-1764.

HODGES, D. M., FORNEY, C. F. 2003 Postharvest ascorbate metabolism in two culti-vars of spinach differing in their senescence rates. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 128,930–935

HONISH, L., AND NGUYEN, Q. 2001. Outbreak of Salmonella Enteritidis phage type 913 gastroenteritis associated with mung bean sprouts – Edmonton, 2001. Can Commun Dis Rep 27: 151–156.

HORINOUCHI, H., MUSLIM, A., HYAKUMACHI, M., 2010. Biocontrol of Fusarium wilt of spinach by the plant growth promoting fungus Fusarium equiseti gf183. J. Plant Pathol. 92, 249e254.

HUSMARK, U., Y U. RONNER. 1990. Forces involved in adhesion of Bacillus cereus spores to solid surfaces under different environmental conditions. J. Appl. Bacteriol. 69:557-562.

IBARRA-SANCHEZ, L.S., ALVARADO-CASILLAS, S., RODRIGUEZ-GARCIA, M.O., MARTINEZ-GONZALES, N.E. Y CASTILLO, A., 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. Journal of Food Protection, 67, pp: 1353-1358.

IBEKWE, A. M., PAPIERNIK, S. K., GRIEVE, C. M., YANG, C. 2011. Quantification of Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in Contrasting Soils. Int J Microbiol. 2011: 421379.

ISLAM, M., DOYLE, M. P., PHATAK, S. C., MILLNER, P., JIANG, X. 2004 Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure compost or irrigation water. J. Food Prot. 67, 7:1365-1370.

ITOH, Y., SUGITA-KONISHI, Y., KASUGA, F., IWAKI, M., HARA-KUDO, Y., SAITO, N., NOGUCHI, Y., KONUMA, H. Y KUMAGAI, S. 1988. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. Applied and Environmental Microbiology, 64, pp: 1532-1535.

ITURRIAGA, M. H., TAMPLIN, M. L., ESCARTÍN, E. F. 2006. Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is Affected by Relative Humidity and Storage Temperature. J. Food Prot. 70, 30-34.

ITURRIAGA, M. H., TAMPLIN, M. L. ESCARTÍN, E. F., 2007. Colonization of Tomatoes by *Salmonella Montevideo* Is Affected by Relative Humidity and Storage Temperature, Journal of FoodProtection, 4-260, pp. 30-34(5).

JOHNSON, E. J. 2000. The role of lutein in disease prevention. Nutrition in Clinical Care. 3, 289–296.

KADER, A. 2007. Tecnología Postcosecha de Productos Hortofrutícolas. Universidad de California. 3a edición. 580 p.

KADER, A. A. 2002. Postharvest Technology of Horticultural Crops. USA, DE University of California Agricultural Publications 3311,

KHURDIYA, D. S. AND ROY, S. K. 1995. Other subtropical fruit. In D. K. Salunkhe; S. S. Kadam (ed.), Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage and Processing. New York: Marcel Dekker.

KIM J.G., LUO Y., SAFTNER R.A., GROSS K.C., 2005. Delayed modified atmosphere packaging of fresh-cut Romaine lettuce: effects on quality maintenance and shelf-life. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130 (1), pp. 116–123.

KIRLI, W. G., CAI, J., DE LONG, M. J., PATTEN, E. J., JONES, D. P. 1999. Dietary compounds that induce cancer preventine Phase 2 Enzyme activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcionoma cells. Journal of Nutrition 129: 1827-1835.

KLERKS, M. M., DIEPENINGEN, A. D. V., VISSER, A. A., FRANZ E. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expresing *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium. Food Microbiol. 24: 106-112.

KOIKE S., SUSLOW T., CAHN M., 2014. Survival and Internalization of E. coli and Salmonella on Spinach and Lettuce under Commercial Salinas Valley Field Conditions, American Vegetable Grower.

KROUPITSKI, Y., GOLBERG, D., BELAUSOV, E., PINTO, R., SWARTZBERG, D., GRANOT, D., SELA, SHLOMO. 2009. Internalization of Salmonella enterica in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through Open stomata. Appl Env Mircobiol. Octubre, 6076-6086.

KURIYAMA, I., MUSUMI, K., YONEZAWA, Y., TAKEMURA, M., MAEDA, N., IIJIMA, H., HADA, T., YOSHIDA, H., MIZUSHINA, Y. 2005. Inhibitory effects of glycolipids fraction from spinach on mammalian DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation. The Journal of Nutritional Biochemistry, 16, 594–601.

KYLE JL, PARKER CT, G D, BRANDL MT. 2010. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 exposed to lysates of lettuce leaves. Appl Environ Microbiol 76: 1375–1387.

LE BOUGUÉNEC, C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. Int. J. Med. Microbiol. 295:471–478.

LEÓN, Y. J. A. 2007. El consumo de hortalizas crudas (Lechuga “Lactuca sativa” y Tomate “Lycopersicum esculentum”) y su incidencia en la generación de Etas en el mercado central de la cuidad de Ambato. Universidad técnica de Ambato Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimento.

LIVA, M., ALLEYNE, S., GUILLEN, T., COLLAZO, O., JIMÉNEZ, J., CASTRO, D., ÁIVAREZ, M., RODRIGUEZ, A., GONZALEZ, R., 2013. Procedimiento analítico para la determinación de metales en zanahorias y espinaca cultivadas en organopónicos urbanos, Cuba, Ciencias Técnicas Agropecuarias, 22(1), 20-26.

LIVA, M.; MUÑOZ-OLIVAS, R., CÁMARA, C. 2000. Determination of Cd in sonicate slurries and leachates of biological and environmental materials by FI-CV-AAS. Talanta, 51(2):381-387.

LUCHO, C. A., ÁLVAREZ, M., BELTRÁN, R. I., PRIETO, F., POGGI, H. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major andtrace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. Environmental International, On Line: 0160-4120-D 2004 doi:10.1016/j.envint.2004.08.002, 2005.

LUKASIK J, BRADLEY ML, SCOTT TM, HSU W-Y, FARRAH SR, TAMPLIN ML. 2001. Elution, detection, and quantification of Polio I, *Bacteriophages*, *Salmonella* Montevideo, and *Escherichia coli* 0157:H7 from seeded strawberries and tomatoes. J Food Prot 64(3):292-7.

LUNA.GUEVARA. 2012. Diversity of enterobacteria associated with tomato (Lycopersicumsculentum Mill) fruits and greenhouse soils.ScientiaAgropecuaria 2(2012) 161 – 169.

LUND, B. M. 1992 . Ecosystems in vegetable foods. J. Appl. Bact. Vol 73 Suplement 21:115s-135s.

MAHON, B.E., PONKA, A., HALL, W.N., KOMATSU, K., DIETRICH, S.E., SIITONEN, A., 1997. An international outbreak of Salmonella infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. J Infect Dis 175: 876–882.

MANNING, S.D., 2010. *Escherichia coli* Deadly diseases and epidemics, Infobase Publishing, 2da edición.

MARTIN, C. W. 2000. Heavy Metals Trends in Floodplain Sediments and Valley Fill. Catena 39, 53-68.

MARTÍNEZ B., ALLENDE, A., SELMA, V., GIL, M. I., SUÁREZ, J. E., RODRÍGUEZ, A. 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing Listeria monocytogenes in vitro and in fresh-cut lettuce. Food Microbiol. 24, 759-766.

MARTINEZ, A., CEPEDA, A., HERRERA, A., MARTÍN M.R., 2012, Informe del comité científico de la atención española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigenicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC). AESAN-2012-007.

MEADOWS, P. S., 1971 The attachment of bacteria to solid surfaces. Arch. Microbiol. 75:374-381.

MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., HE, S. Y. 2006. Role of Stomata in plant innate inmmunity and foliar Bacterial diseases. Annu Rev Phytopathol. 46:101-122.

MEYEROWITZ, S., 1999. My favorite greens. Better Nutrition 61, 18–21.

MEYEROWITZ, S., 1999. Sprouts: TheMiracle Food. USA, DE Sproutman Publications.

MICHANIE, 2003. S. *Escherichia coli* O157:H7. La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. Ganados & Carnes. Vol. 4 (17):40-42.

MITRA, R., CUESTA-ALONSO, E., WAYADANDE, A., TALLEY, J., GILLILAND, S., FLETCHER, J. 2009. Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach. J Food Prot. 72:1521-1530.

MITTELMAN, M. W. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. J Dairy Sci. 81(10):2760–4.

MOHLE-BOETANI, J.C., FARRAR, J.A., WERNER, S.B., MINASSIAN, D., BRYANT, R., ABBOTT, S., 2001. *Escherichia coli* O157 and Salmonella infections associated with sprouts in California, 1996–1998. Ann Intern Med 135: 239–247.

MOR, F. & CEYLAN, S., 2008. Cadmium and lead contamination in vegetables collected from industrial, traffic and rural areas in Bursa Province, *Turkey. Food Additives & Contaminants*: Part A, 25: 5, 611 – 615.

MUSLIM, A., HORINOUCHI, H., HYAKUMACHI, M., 2003. Suppression of Fusarium wilt of spinach hypovirulent binucleate Rhizoctonia. J. Gen. Plant Pathol. 69, 143-150.

NATARO, J.P., KAPER, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol. 11(1):142-201.

NESTLÉ, M., 1997. Broccoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme system: Clinical, dietary and policy implications. Proceedings of the National Academy of Science 94: 1149-1151.

Nicholson, F. et al. 2005, Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. Bioresource Technology 96: 135-43.

NOEL, J. T. JOY, J. SMITH, J. N., FATICA, M., SCHNEIDER, K. R., AHMER, B. M. M., TEPLITSKI, M., 2010. Salmonella SdiA recognizes N-acyl homoserine lactone signals from Pectobacterium carotovorum in vitro, but not in a bacterial soft rot. Mol. Plant-Mircobe Interact. 23:273-282.

OIRSA, 2000. Inocuidad de alimentos en vegetales. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria-OIRSA. Honduras.

OLAIMAT, A.N. HOLLEY, R. A. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. Food Microbiol. 32(1), 1-19.

PAMPLONA J, 2003, Salud por los alimentos, Ed Safeliz.

PAMPLONA ROGER, J.D. 1999. Enciclopedia de los alimentos y su poder curativo. Tratado de Bromatología y Dietoterapia, págs. 86-87. Ed. San Feliz. Madrid, España.

PANDRANGI, S., LAABORDE, LF, 2004. Retention of folate, caroteniods, and other quality characteristics in commercially packaged fresh spinach. J. Food Sci. 69, C702-C70.

PINEDA, H. R., 2004. Presencia de Hongos Micorrízicos Arbusculares y Contribución de Glomus Intraradicesen la Absorción y Translocación de Cinc y Cobre en Girasol (*Helianthus Annuus* L.) Crecido en un Suelo Contaminado con Residuos de Mina. Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias Universidad de Colima. Tecoman, Colima. Colima, DE Universidad de Colima

PONCE de LEÓN C., EZPERANZA T. M., CRUZ M, M., 2004. Use in the alimentation of some germinated seeds: mung bean and wheat sprouts, Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol, 107;47-55. Madrid.

PONCE DE LEÓN, E.C., MATALLANA GONZÁLEZ, MC.& TORIJA ISASA, E. 2011. Germinados o brotes. Su interés en la alimentación actual. Schironia. Revista científica del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, 10: 5-13.

PONCE, A. G., ROURA, S. I., DEL VALLE, C. E., FRITZ, R., 2002. Characterization of native microbial population of Swiss chard (Beta vulgaris, type cicla). LWT-Food Science and Technology, 35(4), 331–337.

PROCTOR, M.E., HAMACHER, M., TORTORELLO, M.L., ARCHER, J.R., AND DAVIS, J.P., 2001. Multistate outbreak of Salmonella serovar Muenchen infections associated with alfalfa sprouts grown from seeds pretreated with calcium hypochlorite. J Clin Microbiol 39: 3461–3465.

PU, S., BEAULIEU, J.C., PRINYAWIWATKUL, W. AND GE, B. 2009. Effects of plant maturity and growth media bacterial inoculum level on the surface contamination and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in growing spinach leaves. J Food Prot 72, 2313–2320.

RANGEL, J.M., SPARLING, P.H., CROWE, C., GRIFFIN, P.M., AND SWERDLOW, D.L., 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. Emerg Infect Dis 11: 603–609.

RASFF, 2011. EL MSPSI INFORMA SOBRE EL BROTE DE *E. COLI* APARECIDO EN FRANCIA, revisado agosto de 2014, disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/notas_prensa/brote_francia.shtml, España.

RATTRAY, E., PROSSER, J., KILLHAM, K., GLOVER, L., 1990. Luminescence-based nonextrative technique for in situ detection of *Escherichia coli* in soil, Escocia, Applied and Enviromental Microbiology. 56(11):3368.

REINA, L.D.; FLEMING, H.P.; BREIDT, F., 2002. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. Journal of Food Protection, v.65, p.1881-1887.

REINA, L.D.; FLEMING, H.P.; BREIDT, F., 2002. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. Journal of Food Protection, v.65, p.1881-1887

RISO, P., BRUSAMOLINO, A., SCALFI, L., PORRINI, M., 2004. Bioavailability of carotenoids from spinach and tomatoes. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 14, 150–156.

RODIONOV DA, GELFAND MS, HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N., 2004. Comparative genomics of the KdgR regulon in Erwinia chrysanthemi 3937 and other gammaproteobacteria. Microbiology 150: 3571–3590.

RODRÍGUEZ, M. A., GUZMÁN, T. E., ESCALONA, R. A., OTERO, F. M., 2005. Peligros biológicos e inocuidad de alimentos. REDVET Vol. VI, Nº9.

RUIZ. N., GRONENBERG L. S., KAHNE, D., SILHAVY, T. J., 2008. Identification of two innwe-membrane proteins re quired for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci. 105:5537-5542.

RYU, J. H. Y BEUCHAT, L. R., 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless Steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 71:247-254.

SAGARPA, 2008. Proyecto sectorial: "Inventario de red de frio para frutas y hortalizas". FIRCO.

SANZ ME, VIÑAS MR, PARMA AE., 1998. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. Eur J Epidemiol. 14(4):399-403.

SAUER, F. G., BARNHART, M., CHOUDHURY, D., KNIGHT, S. D., WAKSMAN, G., HULTGREN, S. J., 2000. Chaperone-assisted pilus assembly and bacteria attachment. Curr Opin Struct Biol. 10: 548-556.

SCHEUTZ, F., STROCKBINE GARRITY, G. M., BRENNER, D. J., KRIEG N. R., STALEY, J. T., 2005. *Escherichia* Bergey´s manual of systematic bacteriology. Springer, New York. p. 607-624.

SCHMIDT-HEBBEL, H., 1986. Tóxicos químicos en alimentos. Avances en su identificación, previsión y desintoxicación. Ed. Fundación Chile. Santiago de Chile.

SCHUHEGGER, R. IHRING, A. GANTNER, S. BAHWEG, G. KNAPPE, C. VOGG, G. HUTZLER, P. SCHMID, M. VAN BREUSEGEM, F. EBERL, L. HARTMANN, A. LANGEBARTELS, C., 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homocesine lactone-producing rhizosphere bacterial, Plant Cell Environ. 29, 909-918.

SEO, K.H., FRANK, J. F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface anda bacterial bacterial viability in response to chlorine treatment as demostrated by using confocal scanning laser microscopy. J Food Prot. 62: 3-9. 1999.

SETO, E. Y. W., SOLLER, J. A., COLFORD, J. M. JR., 2007. Strategies to reduce person-to-person transmission during widespread *Escherichia coli* O157:H7 outbreak. Emerging Infectious Diseases, 13, 860-866.

SHARMA M., INGRAM D. T., PATEL J. R., MILLNER P. D., WANG X., HULL A. E., DONNENBERG M. S., 2009. A novel Approach to Investigate the Uptake and Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 Cultivated in Soil and Hydroponic Medium, Journal of Food Protection, Vol. 72, No. 7, Pages 1513–1520.

SHEPARD, J. F., SHALLA, T. A., 1970. An antigenic analysis of potato virus X and of its degraded protein. I. Evidence for and degree of antigenic disparity. Virology 42:825-834.

SIMOES, M., PISANI, B., MARQUES, E. G. L., PRANDI, M. A. G., MARTINI, M. H., CHIARINI, P. F. T., et al. 2001. Hygienic sanitary conditions of vegetables and water from kitchen garden in the municipality of Campinas. Brazilian Journal of Microbiology, 32, 331e333.

SLIFKO, T. R., SMITH, H. V., Y ROSE, J. B. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. International Journal for Parasitology, 30, 1379e1393.

SOLOMON, E. B., POTENSKI, C. J., MATTHEWS, K. R., 2002. Effect of irrigation method on transmission to and persistence of Escherichia coli O157:H7 on lettuce. J Food Prot 65: 673-676.

SOLOMON, E. E., PANG, H.-J., MATTHEWS, K. R., 2003. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. J Food Prot. 66:2198-2202.

STEPHENS, C., 2002. Microbiology: Breaking Down Biofilms, Curr Biol., 12, R132-R134.

STINE, S. W., SONG, I., CHOI, C. Y., GERBA, C. P., 2005. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce and bell peppers. J Food Prot. 68: 1352-1358.

STRATTON, J., STEFANIW, L., GRIMSRUD, K., WERKER, D.H., ELLIS, A., ASHTON, E., et al., 2001. Outbreak of Salmonella paratyphi B var java due to contaminated alfalfa sprouts in Alberta, British Columbia and Saskatchewan. Can Commun Dis Rep 27: 133–137; discussion 137–138.

TAKEUCHI, K., FRANK, J.F., 2000. Penetration of *Escherichia coli* O157: H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. Journal of Food Protection 63, 434–440.

TAKEUCHI, K., FRANK, J.F., 2001a. Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. Journal of Food Protection 64, 2088–2102.

TAKEUCHI, K., FRANK, J.F., 2001b. Quantitative determination of the role of lettuce leaf structures in protecting *Escherichia coli* O157:H7 from chlorine disinfection. Journal of Food Protection 64, 147–151.

TAORMINA, P.J., BEUCHAT, L.R., AND SLUTSKER, L., 1999. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. Emerg Infect Dis 5: 626–634.

TECNOAGRO, 2010, El cultivo de la Espinaca *Spinacia oleracea* L., noviembre 2010, disponible en: http://tecnoagro.com.mx/no-63/el-cultivo-de-la-espinaca-spinacea-oleracea-l-dp2, revisado marzo 2015.

THOMPSON L. J., GRAY V., HOLY L. A., 2006, Carbon: nitrogen: phosphorus ratios influence biofilm formation by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*, Journal of Applied Microbiology. 101:1105-1113.

TOLEDO ET AL., 2003, M.E.A. TOLEDO, Y. UEDA, Y. IMAHORI, M. AYAKI., 2003 l-ascorbic acid metabolism in spinach (Spinacia oleracea L.) during postharvest storage in light and dark. Postharvest Biology and Technology, 28 (1), pp. 47–57.

TORRES, A. G., ZHOU, X., KAPER, J. B., 2005. Adherences of diarreheagenic *Escherichia coli* strains to epitelial cells. Infect. Immun. 73:18-29.

TORRES, Alfredo G., JETER, Cecelia, LANGLEY, William, MATTHYSSE, Ann G., 2005. Differential Binding of *Escherichia coli* O157:H7 to Alfalfa, Human Epithelial Cell and Plastics is Mediated by Variety of Surface Structures, Texas, Applied and EnviromentalMicrobiologY. 71(12):8008.

TYLER H. L., TRIPLETT E. W., 2008. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 46, 53–73

UHLICH, G. A., KEEN, J. E., ELDER, R. O., 2001. Mutation in the *csgD* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 67:2367-2370.

UNDERWOOD, W., MELOTTO, M., HE, S. Y., 2007. Role of stomata in bacterial invasion. Cell Microbiol. 9:1621-1629.

VALDESPINO JL, GARCÍA ML, DEL RÍO A, GIONO S, SALCEDO RA, SEPÚLVEDA J., 1994. Epidemiología y etiología de las diarreas Infecciosas. El caso de México. Rev Latinoam Microbiol 36:307-324.

VAN BENEDEN, C.A., KEENE, W. E., STRANG, R.A., WERKER, D.H., KING, A.S., MAHON, B., et al., 1999. Multinational outbreak of Salmonella enterica serotype Newport infections due to contaminated alfalfa sprouts. JAMA 281: 158–162.

VAN DUYN M. A., & PIVONKA E., 2000. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional. J Am Diet Assoc 99 (10): 1241-1248.

van DUYNHOVEN, Y.T., WIDDOWSON, M.A., DE JAGER, C.M., FERNANDES, T., NEPPELENBROEK, S., VAN DEN BRANDHOF, W., et al., 2002. Salmonella enterica serotype Enteritidis phage type 4b outbreak associated with bean sprouts. Emerg Infect Dis 8: 440–443.

WACHTEL M. R., WHITELAND L.C; MADRELL, R. E., 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. J. Food Prot. 65:18-25.

WAJE, C.K., HAN, D.H., JO, C., KWON, J.H., JUN, S.Y., LEE, Y.K., KIM, B.N., 2009. Microbial quality assessment and pathogen inactivation by electron beam and gamma irradiation of commercial seed sprouts. Food Control 20, 200–204.

WENDEL, A.M., JOHNSON, D.H., SHARAPOV, U., GRANT, J., ARCHER, J.R., MONSON, T., *et al*., 2009. Multistate outbreak of *Escherichia coli*O157:H7 infection associated with consumption of packaged spinach, August–September 2006: the wisconsin investigation. Clin Infect Dis 48: 1079–1086.

WERNER, S., BOMAN, K., EINEMO, I., ERNTELL, M., DE JONG, B., LINDQVIST, A., et al., 2007. Outbreak of Salmonella Stanley in Sweden associated with alfalfa sprouts, July–August 2007. Euro Surveill 12: pii=3291.

WESTERLUND-WIKSTRÖM, B., KORHONEN, T. K., 2005. Molecular structure of adhesion domains in *Escherichia coli* fimbriae. Int J Med Microbiol. 295, (6, 7):479-86.

WHO, 2011. EHEC outbreak: Update 5 (03-06-11).

WIGMORE, A., 1986. The Sprouting Book. USA, DE Penguin Group.

WILSON C.L., OUELLETTE A.J., SATCHELL D.P., AYABE T., LÓPEZ-BOADO Y.S., STRATMAN J.L., HULTGREN S.J., MATRISIAN L.M., PARKS W.C., 1999 Regulation of intestinal α-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. Science. 286:113–117.

WINTHROP, K.L., PALUMBO, M.S., FARRAR, J.A., MOHLE-BOETANI, J.C., ABBOTT, S., BEATTY, M.E., et al., 2003. Alfalfa sprouts and Salmonella Kottbus infection: a multistate outbreak following inadequate seed disinfection with heat and chlorine. J Food Prot 66: 13–17.

XIAO, Z., LESTER, G.E., LUO, Y., WANG, Q., 2012. Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: edible microgreens. J. Agric. Food Chem. 60, 7644e7651.

YOUNG, K. D., 2006. The selective value of bacterial shape. Microbiol Mol Biol Rev 70:660-703.