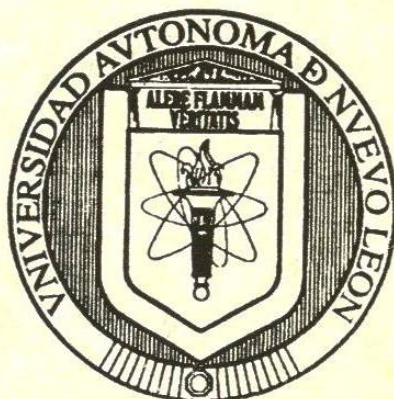


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



*DETECCION DE Clostridium perfringens  
ENTEROTOXIGENICO EN ESPECIAS USADAS EN EL AREA  
METROPOLITANA DE MONTERREY, N. L. POR MEDIO  
DE UNA SONDA DE ADN*

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA.

**P R E S E N T A**

**LUIS ALBERTO RODRIGUEZ ROMO**

San Nicolás, N. L.

Junio de 1997

TM

Z532

FCB

1997

R62

/



1020118504

---

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**DETECCION DE *Clostridium perfringens*  
ENTEROTOXIGENICO EN ESPECIAS USADAS EN EL AREA  
METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L. POR MEDIO DE  
UNA SONDA DE ADN**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA  
POR .

**LUIS ALBERTO RODRIGUEZ ROMO**

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L

JUNIO DE 1997

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO




**DETECCION DE *Clostridium perfringens* ENTEROTOXIGENICO**  
**EN ESPECIAS USADAS EN EL AREA METROPOLITANA DE**  
**MONTERREY, N. L. POR MEDIO DE UNA SONDA DE ADN**


**T E S I S**

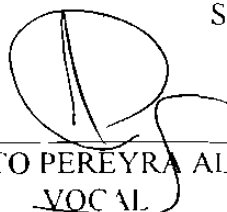
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA  
POR :

**LUIS ALBERTO RODRIGUEZ ROMO**

APROBADA  
COMISION DE TESIS

  
Dra NORMA I AURA HEREDIA ROJAS  
PRESIDENTE

  
Dr JOSE SANTOS GARCÍA ALVARADO  
SECRETARIO

  
Dr BENITO PEREYRA ALFEREZ  
VOCAL

DETECCION DE *Clostridium perfringens* ENTEROTOXIGENICO EN  
ESPECIAS USADAS EN EL AREA METROPOLITANA DE  
MONTERREY, N.L. POR MEDIO DE UNA SONDA DE ADN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y la codirección del Dr. José Santos García Alvarado.

Esta investigación formó parte de un proyecto apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el convenio 5095M 9406.

## DEDICATORIA

*A mis padres, que me dieron la libertad de elegir mi propio camino, tal vez a veces con silenciosa comprensión, su ejemplo de trabajo y tenacidad es parte de su valiosísimo legado.*

*este logro también es su logro.*

*A mis hermanos, en quienes siempre encuentro un abrazo sincero e incondicional y una sonrisa*

*al volver a casa*

*A mi Abuelita Sra. Diamantina Lozano, quien tal vez sin saberlo, me da día con día una*

*lección de vida*

*De una manera muy especial, a ti Chefy, a quien quiero tanto, gracias por compartir conmigo este lugar, tiempo y espacio. Las palabras son insuficientes para expresarte lo*

*importante que eres para mí*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo institucional y económico proporcionado para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A la Dra Norma Laura Heredia y al Dr José Santos García Alvarado por permitirme alcanzar ésta meta en su compañía, su comprensión y su paciencia, sus valiosos consejos ya rinden fruto en mi próximo futuro.

Al Dr. Rahim Foroughbakch Pournavab por su disponibilidad, tiempo y apoyo en los aspectos estadísticos de ésta investigación

Al Dr Peter Feng de la Food and Drug Administration y al Dr. Ronald Labbe de la Universidad de Massachusetts por su ayuda en aspectos técnicos y sus sugerencias en este trabajo de investigación

A la Q F B María Genoveva Alvarez por su ayuda en momentos difíciles su gran sentido humano me hace sentir complacido de contar con su amistad

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica y Genética de microorganismos, así como a el personal docente de la Facultad de Ciencias Biológicas, lo que me han permitido aprender es invaluable



## INDICE DE CONTENIDO

Página de título .....	I
Dedicatoria .....	IV
Agradecimientos .....	V
Indice de contenido .....	VI
Lista de tablas .....	VIII
Lista de abreviaturas .....	X
Resumen .....	XII
Abstarct .....	XIII
Introducción .....	1
Antecedentes .....	3
La toxi-infección alimentaria por <i>Clostridium perfringens</i> .....	3
<i>C. perfringens</i> en el medio ambiente .....	6
Incidencia de <i>C. perfringens</i> en alimentos .....	7
Incidencia de <i>C. perfringens</i> en especias .....	10
Detección de <i>C. perfringens</i> enterotoxigénico .....	13
Hipótesis .....	15
Objetivos .....	16
Material y métodos .....	17
Cepas de <i>C. perfringens</i> .....	17
Activación de las cepas .....	17
Especias y condimentos .....	17
Muestreo .....	18
Aislamiento de <i>C. perfringens</i> de las especias .....	19
Análisis de la actividad antimicrobiana de las especias utilizadas .....	19
Preparación de las muestras .....	20
Aislamiento presuntivo y recuento de <i>C. perfringens</i> .....	21
Pruebas confirmatorias de <i>C. perfringens</i> .....	21

Hibridación en colonia para la determinación del gen de la enterotoxina .....	22
Sonda de DNA .....	22
Marcaje de la sonda con digoxigenina .....	23
Preparación de las membranas para hibridación .....	23
Lisis celular y fijación del DNA a las membranas .....	24
Prehibridación e hibridación de la sonda .....	24
Detección colorimétrica.....	25
Análisis estadístico de los datos .....	26
Resultados .....	27
Análisis de la actividad antimicrobiana de las especias utilizadas .....	27
Análisis de la cantidad de <i>C. perfringens</i> en especias .....	28
Ajo en polvo .....	28
Pimienta .....	32
Comino .....	35
Orégano .....	39
Laurel .....	43
Comparación de la cantidad de <i>C. perfringens</i> en especias expandidas en los distintos municipios .....	46
Aislamiento de <i>C. perfringens</i> enterotoxigénico de las especias .....	47
Discusión .....	50
Conclusiones .....	56
Literatura citada .....	57

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies utilizadas .....	18
<b>Tabla 2.</b> Número de muestras de especias por presentación comercial.....	19
<b>Tabla 3.</b> Efecto de los extractos de especias sobre el crecimiento de <i>C. perfringens</i> .....	27
<b>Tabla 4.</b> Número de muestras de ajo en polvo expandidas en bolsa de polietileno que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .....	30
<b>Tabla 5.</b> Número de muestras de ajo en polvo expandidas a granel que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .....	31
<b>Tabla 6.</b> Número de muestras de ajo en polvo expandidas en frasco de vidrio que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .....	31
<b>Tabla 7.</b> Número de muestras de pimienta expandidas en bolsa de polietileno que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos ..	33
<b>Tabla 8.</b> Número de muestras de pimienta expandidas a granel que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .....	34
<b>Tabla 9.</b> Número de muestras de pimienta expandidas en frasco de vidrio que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos ..	34

<b>Tabla 10.</b> Número de muestras de comino expandidas en bolsa de polietileno que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos ..	37
<b>Tabla 11.</b> Número de muestras de comino expandidas a granel que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .....	38
<b>Tabla 12.</b> Número de muestras de comino expandidas en frasco de vidrio que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos ..	38
<b>Tabla 13.</b> Número de muestras de orégano expandidas en bolsa de polietileno que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos ..	41
<b>Tabla 14.</b> Número de muestras de orégano expandidas a granel que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .....	42
<b>Tabla 15.</b> Número de muestras de orégano expandidas en frasco de vidrio que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos	42
<b>Tabla 16.</b> Número de muestras de laurel expandidas en bolsa de polietileno que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .. ..	44
<b>Tabla 17.</b> Número de muestras de laurel expandidas a granel que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos .....	45
<b>Tabla 18.</b> Número de muestras de laurel expandidas en frasco de vidrio que contienen <i>C. perfringens</i> en diferentes rangos	45
<b>Tabla 19.</b> Aislamiento de <i>C. perfringens</i> enterotoxigénico en las diferentes presentaciones comerciales de las especias	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

$A_{600}$	Absorbancia a 600 nm
ADN	Acido desoxirribonucleico
$\alpha$	Nivel de significancia
ATCC	Colección de Cultivos "Tipo" Americano (American Type Culture Collection)
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono (gas)
dUTP	Desoxiuridil-trifosfato
dig	Digoxigenina
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
$\mu$	Micrómetro(s)
$\mu\text{l}$	Microlitro(s)
ml	Mililitro(s)
min	Minuto(s)
M	Molar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCTC	Colección Nacional de Cultivos Tipo (National Type Culture Collection)
$\text{N}_2$	Nitrógeno (gas)
pH	Logaritmo recíproco de la concentración del ión hidrogeno

p/v	Por ciento peso / volumen
pmol/ml	Picomol(es) por mililitro
%	Por ciento
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonia por Gramo
$nX$	Factor de concentración
$\chi^2$	Prueba estadística de Chi cuadrada

## RESUMEN

Algunos reportes a nivel mundial sobre la calidad microbiológica de las especias publican sobre la presencia de *Clostridium perfringens* en estos productos. Esta es una bacteria patógena, anaerobia, formadora de esporas y responsable de una intoxicación alimentaria debida a la producción de una enterotoxina.

En este trabajo se analizó la presencia de *C. perfringens* en 380 muestras de especias (comino, pimienta, orégano, ajo en polvo y laurel) ampliamente usadas en el norte de México. La potencialidad enterotoxigénica de los aislados se determinó por medio de una sonda de DNA marcada con digoxigenina dirigida contra una región del gen de la enterotoxina.

Las cuentas en placa de *C. perfringens* variaron de <100 a 500 UFC/g en ajo en polvo, de <100 a 200 UFC/g en pimienta, de <100 a 433 UFC/g en comino, de <100 a 340 UFC/g en orégano y de <100 a 450 UFC/g en laurel.

Con la técnica de dot-blot utilizada se determinó la presencia del gen de la enterotoxina en 8 (4.25%) de 188 aislados confirmados de *C. perfringens*.

## ABSTRACT

Several reports in the microbiology of spices and herbs indicate the presence of *Clostridium perfringens*, a spore forming foodborne pathogen responsible for gastrointestinal disease. In the present study a total of 380 samples of spices and herbs (cumin seed, black pepper, oregano, garlic powder and bay leaves) widely used in northern Mexico, were analyzed for the presence of *C. perfringens* and the enterotoxigenicity of the isolates determined by a dot-blot technique using an enterotoxin digoxigenin-labeled DNA probe

*C. perfringens* counts varied from <100 to 500 CFU/g in garlic powder, from <100 to 200 CFU/g in black pepper from <100 to 433 CFU/g in cumin seed, from <100 to 340 CFU/g in oregano and from <100 to 450 CFU/g in bay leaves. The dot-blot technique detected the enterotoxin gene in 8 (4.25%) of 188 confirmed isolates of *C. perfringens*



## INTRODUCCION

Las especias y los condimentos se utilizan mundialmente debido a que proporcionan una amplia variedad de sabores a los alimentos. Sin embargo, se ha observado que estos productos pueden ser acarreadores de un gran número de microorganismos entre los que se incluyen organismos patógenos y deteriorantes de alimentos (De Boer, E. *et al*, 1985; Pafumi, J., 1986; Powers, E. M. *et al*, 1975).

La calidad microbiológica de las especias a menudo refleja la situación higiénica del área en que estas se producen o procesan y como sucede con muchos otros productos agrícolas, las especias y los condimentos están expuestos a una gran variedad de contaminación microbiana durante la cosecha, el procesamiento y su almacenamiento en el mercado, debido al contacto con agua contaminada, polvo o heces fecales de pájaros, roedores e insectos (Silliker, J H *et al* 1985)

Diversos estudios sobre la microbiología de las especias han demostrado la presencia de importantes microorganismos patógenos en estos productos entre los que se incluyen, *Salmonella* (Bruchmann, M , 1995), *Escherichia coli* (Kaul, M y N Taneja. 1989), *Clostridium perfringens* (Kneifel, W. y E. Berger, 1994), *Bacillus cereus* (Antai S P . 1988; Powers. E M *et al*. 1976) y hongos productores de toxinas como *Aspergillus* (El-Kady. I A *et al*, 1992; Delcourt A *et al* 1994 Shrivastava. A. y P C Jain 1992)

*C perfringens* es una bacteria anaerobia, productora de esporas encapsulada, no móvil y que produce mas de trece toxinas diferentes, por lo cua se le clasifica en cinco tipos: A, B, C, D y E de acuerdo con la producción de cuatro toxinas extracelulares (alfa, beta, epsilon e iota) (Labbe R 1989) Este microorganismo es

responsable de una intoxicación alimentaria debida al consumo de alimentos contaminados con un gran número de células vegetativas (Labbe, R.G., 1991; De Boer, E. y E. M. Boot, 1983). Los síntomas asociados con el cuadro diarreico observado, se deben al efecto de una toxina producida por las cepas enterotoxigénicas del microorganismo durante el proceso de esporulación (Czeczulin, J.R. *et al*, 1993)

Las especias se encuentran frecuentemente contaminadas por *C. perfringens* (Powers, E. M., *et al*, 1975; De Boer, E. *et al*, 1985) y podrían jugar un papel importante en la contaminación de alimentos por bacterias esporuladas (Labbe, R.G., 1991).

Aún cuando existen investigaciones a nivel mundial sobre la contaminación microbiana de las especias no se conocen reportes en México sobre el grado de contaminación de estos productos por cepas enterotoxigénicas de *C. perfringens*. En el presente estudio, se analizaron 380 muestras de cinco especias (ajo en polvo, pimienta, comino, orégano y laurel), ampliamente usadas en Monterrey N.L. y su área metropolitana, con el fin de determinar la presencia de *C. perfringens* en estos productos, así mismo se determinó la enterotoxigenicidad de los aislados por medio de una técnica de dot blot utilizando una sonda de ADN marcada con digoxigenina dirigida contra una región del gen de la enterotoxina

## ANTECEDENTES

### La toxi-infección alimentaria por *Clostridium perfringens*

Durante los últimos 90 años, *C. perfringens* se había asociado estrechamente como el agente etiológico de la gangrena gaseosa; sin embargo, la primera referencia de este organismo como causante de diarrea en humanos, se hizo a finales del siglo XIX (Labbé. R. 1989). En 1940 Knox y Mac Donald en Inglaterra y Mc Clung en Estados Unidos, asociaron a esta bacteria directamente con una intoxicación alimentaria. No obstante, el interés en *C. perfringens* como productor de enfermedades relacionadas con alimentos permaneció bajo hasta 1953, cuando Hobbs *et al* comenzaron a estudiar más a fondo a este microorganismo.

Después de la II Guerra Mundial, en Alemania, se presentaron algunos cientos de casos de una enfermedad intestinal particularmente severa causada por *C. perfringens*, que fue descrita como enteritis necrosante, la cual fue debida al consumo de carne enlatada (Labbé. R. 1989)

En 1977 Vernon reportó en Inglaterra un brote de toxi-infección alimentaria por *C. perfringens* en 126 personas que habían ingerido carne de pavo contaminada con el microorganismo. en estos casos fue posible aislar una gran cantidad de esporas termorresistentes del alimento implicado.

Posteriormente Stringer *et al* (1980), utilizaron la tipificación serológica en la investigación de 573 casos de enfermedad por alimentos en Reino Unido y 37 de otros países, que involucraban a esta bacteria, con los 75 antisueros disponibles en esa

época fue posible caracterizar el 77% de un total de 7245 aislados, además se estableció que se presentaba un serotipo específico en el 63% de los brotes.

Borriello *et al* en 1985, realizaron un estudio epidemiológico de *C. perfringens* en instituciones geriátricas de Inglaterra y encontraron que el serotipo 41 de este microorganismo estaba involucrado en 5 casos de diarrea, así mismo, los serotipos 27 y 24 se presentaban en otros casos de intoxicación alimentaria en ese país. Los serotipos involucrados, se aislaron en un 59% en áreas donde se presentaba activamente la toxi-infección, un 27% en sitios donde anteriormente existía la enfermedad y había sido erradicada y en un 9% en lugares donde no habían ocurrido casos.

Jackson *et al* (1986) reportaron varios brotes de intoxicación alimentaria relacionada con *C. perfringens* en pacientes ancianos de hospitales psiquiátricos de Canadá, en los que se encontraban implicados varios serotipos de la bacteria, así como un gran número de aislados no tipificables; se observó que los enfermos presentaban antecedentes de cuentas elevadas de esporas en heces fecales y diarrea crónica.

En 1988, Collier *et al* realizaron un estudio de 48 brotes de enfermedades alimentarias ocurridas en hospitales de Escocia entre 1978 y 1987, en donde 25 de ellos involucraban a *C. perfringens* y 17 a *Salmonella* sp. Se observó que los brotes se relacionaban con el consumo de carnes rojas, carne de pollo y vegetales y que ocurrían más frecuentemente en hospitales generales, psiquiátricos y geriátricos. Los casos de toxi-infección se atribuyeron a la preparación de los alimentos mucho tiempo antes de su consumo y a una refrigeración y cocimiento inadecuados.

Ese mismo año, Petersen *et al* estudiaron un brote de *C. perfringens* en una fábrica de Connecticut, E U A , donde 600 empleados presentaron síntomas de gastroenteritis debidos al consumo de salsa de carne contaminada que se preparó de 12 a 24 h antes de servirse.

Levine *et al* (1991), reportaron la incidencia de esta bacteria en asilos de ancianos de E.U.A. durante el período de 1975 a 1987, y encontraron que se habían presentado 496 casos en 6 brotes. en los cuales 4 individuos se habían hospitalizado y 2 habían muerto.

Se han realizado estudios epidemiológicos en diversos países, que indican una gran cantidad de casos de enfermedad alimentaria debida a este microorganismo. en Canadá en 1982, se reportaron 1420 personas enfermas en 18 brotes, ese mismo año E.U.A. presentó 1189 afectados en 22 brotes. El Reino Unido, Finlandia y Japón (1984) indicaron la presencia de 1624, 593 y 1733 casos respectivamente, mientras que en Holanda (1981) se dieron a conocer 106 (Labbé, R. 1989)

En la década de los 80 se consideraba que en términos del número de casos de enfermedades alimentarias bacterianas reportadas cada año, *C. perfringens* ocupaba el segundo lugar en incidencia en Canadá e Inglaterra, y el tercero en Estados Unidos, país donde alrededor del 40 al 45% de los casos totales eran causados por este microorganismo (Labbé, R. 1991; Ting, M N y D Y C Fung, 1972).

Se ha observado que la carne, los productos cárnicos y los embutidos son los alimentos involucrados en la mayoría de los brotes. La intoxicación alimentaria está asociada más comunmente con comida preparada en establecimientos como

restaurantes, instituciones, hospitales, industrias y escuelas, en donde en la mayoría de las ocasiones se prepara con anticipación (Lund, M.B., 1990).

La intoxicación alimentaria ocurre generalmente de 8 a 24 h después de la ingestión de alimento que contiene grandes cantidades de células vegetativas del microorganismo. Los síntomas comunes son: diarrea y dolor abdominal severo. La náusea es menos común y la fiebre y el vómito casi nunca se presentan. Los casos de muerte son raros, pero han ocurrido en individuos débiles e inmunodeprimidos, especialmente en ancianos (Labbé, R. 1989).

Estos síntomas se deben a la acción de la enterotoxina, la cual es una proteína de peso molecular de 35 kDa que se ha asociado con el proceso de esporulación de la bacteria. La toxina generalmente no se encuentra en los alimentos en cantidades suficientes como para producir manifestaciones clínicas, mas bien, se produce durante la esporulación de las células vegetativas que llegan al intestino delgado con el alimento contaminado. La unión de la toxina a receptores de la superficie de las células del epitelio intestinal y su posterior inserción en la membrana celular provoca una pérdida de la integridad estructural y funcional de la membrana, lo cual trae como consecuencia un aumento considerable en la salida de electrolitos al lumen intestinal, con la subsecuente producción de diarrea (Lund, M B . 1990)

### **C. perfringens en el medio ambiente**

Los habitats principales de esta bacteria son el suelo y el contenido intestinal del hombre y de los animales. Solo el tipo A se encuentra como parte de la microflora tanto del suelo, como del intestino. Los tipos B, C, D y E, al parecer son parásitos

obligados principalmente de animales domésticos , aunque se pueden presentar en ocasiones en el hombre (Smith, L. y B. Williams, 1984).

*C. perfringens* se ha encontrado en cantidades variables en el contenido intestinal de un gran número de animales, entre los que se incluyen. perros, gatos, leones, tigres, lobos, ratas, cobayos, cerdos, cabras, borregos, caballos, reses, pollos, pavos, patos, ballenas, venados, y el hombre. Las cuentas microbianas por gramo de heces pueden variar grandemente, no solo de una especie a otra, sino de un individuo a otro (Labbé, R. 1989). Tschirdewahn *et al* (1991) reportaron la presencia de *C. perfringens* en heces fecales de distintos animales, con una proporción del 24% en caballos, 36% en reses, 80% en pollos y 2% en cerdos.

Debido a que este organismo forma esporas, y a que se presenta en el suelo, es posible encontrarlo en toda superficie expuesta al polvo; muchos de los artículos de cocina son susceptibles a contaminación, pero la ingesta diaria en un individuo es probablemente menor a 500 células por día (Labbé. R.1991).

Se ha observado que los sedimentos marinos, contienen pocas cantidades de *C. perfringens*, debido probablemente a una contaminación reciente (Labbé, R. 1989).

### **Incidencia de *C. perfringens* en alimentos**

*C. perfringens* es un contaminante común de una gran variedad de alimentos (Fruin, J., 1977). Este microorganismo requiere para su crecimiento de aminoácidos y péptidos. así como de varias vitaminas. Las carnes rojas y la de pollo le proveen de estos nutrientes y están generalmente involucradas en los brotes de intoxicación alimentaria (Craven. S. , 1980)

Los animales en canal y los cortes de carne, pueden contaminarse con células de *C. perfringens* del suelo, heces fecales y por manipulación durante el sacrificio y el procesamiento. Muchos microorganismos que compiten con esta bacteria, son eliminados cuando se cocina la carne, pero puede no suceder lo mismo con las esporas, que al recibir un choque térmico durante el proceso de cocción, germinan y crecen cuando la temperatura se torna favorable (Bryan, F L., 1979).

La presencia de esta bacteria, se ha reportado en diversos alimentos. En un estudio se demostró que el 82% de las muestras de carne de ternera, el 70% de la carne de res, el 62% de la de pavo, el 58% de la de pollo, el 52% de la de carnero, el 40% de las salsas para pastas, el 37% de la carne de puerco, el 5% de los vegetales, el 2% del pescado y el 1% de las carnes frías, contenían este microorganismo; en el hombre se presenta en el 100%, debido a que el microorganismo es un habitante normal del tracto intestinal (Fruin, J.T., 1977).

En 1958, McKillop realizó un estudio de contaminación de comida por *C. perfringens* en un hospital de Glasgow, Reino Unido y encontró que había grandes cantidades de esta bacteria en pollo mantenido en refrigeración, con el que se asociaron 6 casos de intoxicación alimentaria.

Algunos estudios han demostrado una alta incidencia de contaminación por este microorganismo en carne cruda. Hall y Angelotti (1965) mostraron que el 58% de las carnes de ternera, res, pollo, cordero y puerco muestreadas de carnicerías eran positivas para *C. perfringens*. Así mismo, Ladiges *et al* (1974) en un estudio similar reportaron una incidencia del 47% de esta bacteria, en muestras de carne de res obtenidas de establecimientos de Colorado, E U.A.



Tsai, *et al* en 1974. encontraron que el 64% de las cepas de *C. perfringens* aisladas de las heces de pollos, así como de la carne, y de los nódulos linfáticos y mesentéricos de las reses, eran enterotoxigénicas. Posteriormente, Fruin (1977) realizó estudios con esta bacteria en carne molida de res, puerco y pavo, así como de salchichas, cangrejos y almejas vivas y encontró que de 339 aislados, el 94% pertenecía al tipo A.

Saito (1990), estudió la producción de enterotoxina en 573 cepas de *C. perfringens* aisladas de heces fecales y de alimentos y 220 cepas de muestras de agua. Las cepas enterotoxigénicas se presentaban en el 6% de los manipuladores de alimentos, el 2% de las heces de perros, el 12% de las ostras y en el 10% de las muestras de agua. Entre las 162 muestras de carne, 23 eran positivas para esta bacteria y ninguna producía enterotoxina

En 1986, Souza y Tórtora realizaron un análisis de 42 muestras de carne molida de res, obtenidas de carnicerías de Río de Janeiro, Brasil y encontraron una incidencia de este microorganismo del 57.1%. se observó que de las cepas aisladas el 7.1% eran enterotoxigénicas

Se ha observado que *C. perfringens* también crece en alimentos no cárnicos, tales como frijoles, puré y ensalada de papa, además de presentarse en macarrón con queso y aceitunas (Craven, S 1980)

El frijol en la forma de salsa o como frijoles refritos, al parecer, son fuentes de enfermedades relacionadas con alimentos, debido a que a menudo se cocinan en grandes cantidades y se conservan por largos periodos de tiempo antes de consumirse Woodburn y Nester (1982) realizaron estudios de contaminación y

crecimiento de *B. cereus* y *C. perfringens* en frijoles estilo mexicano, se encontró que el crecimiento de ambos organismos era rápido a 37°C, y que se alcanzaban números celulares asociados a toxi-infección alimentaria en 4 y 6 h respectivamente. Rockland *et al* (1968), encontraron que los frijoles secos, contenían un factor no identificado que estimulaba un rápido crecimiento y la producción de gas en *C. perfringens* tipo A. Posteriormente Labbé y Rey (1979), determinaron que la rafinosa, un carbohidrato fermentable presente en los frijoles secos, aumentaba la esporulación y la producción de enterotoxina en este microorganismo

De 1972 a 1978, se reportaron un total de 78 brotes asociados con comida mexicana en E.U.A., de estos casos, siete involucraban a *C. perfringens*, uno a *B. cereus* y sesenta y uno de ellos eran de etiología desconocida (Centers for Disease Control, 1981).

La intoxicación alimentaria por *C. perfringens* es un problema mundial, sin embargo, no se cuenta en la actualidad con datos estadísticos confiables. A este respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha comenzado a recabar información para evaluar la situación global. el problema se incrementa por el hecho de que en algunos países los reportes a las autoridades sanitarias es voluntario (Labbé. R 1991)

### **Incidencia de *C. perfringens* en especias**

Las especias secas son portadoras de los microorganismos habitualmente presentes en las plantas y en el suelo en que estas crecen. A estos microorganismos hay que sumarles los procedentes del polvo, de la contaminación fecal de aves,

roedores e insectos y del agua no potable empleada en algunos pasos de su procesamiento (Silliker, J. H., *et al.* 1985).

De acuerdo a las regulaciones higiénicas modernas de los países desarrollados, las especias no deben contener ni microorganismos patógenos ni insectos y deben estar libres de materiales extraños y materia fecal. Además, para evitar la alta contaminación por bacterias y el subsecuente deterioro de los alimentos en que se utilizan, es esencial mantener las cuentas microbianas tan bajas como sea posible (Kneifel, W. y E. Berger, 1993).

Las especias, se encuentran frecuentemente contaminadas con *B. cereus* y *C. perfringens* y pueden tener un importante papel en las enfermedades alimentarias (Nakamura, M. y K. D. Kelly, 1968). Recientemente, se han realizado estudios de las salsas estilo mexicano para detectar bacterias patógenas y deteriorantes, y se ha reportado que los miembros de estos géneros bacterianos constituyen la flora principal de los condimentos utilizados en ellas (Draughon F. A., *et al.* 1981)

*C. perfringens* se ha encontrado en la mitad de las muestras analizadas de pimienta negra y de hoja de jamaica, cilantro, hoja de laurel y nuez moscada, y en menor proporción en canela y clavo. Generalmente, se encuentra en concentraciones inferiores a las 500 UFC/g y solo en raras ocasiones alcanza  $10^3$  UFC/g (Silliker, J. H. *et al.* 1985)

Investigaciones realizadas en Estados Unidos en las décadas de los treinta, cuarenta y setenta mostraron que muchas especias de importación se encontraban altamente contaminadas. Aunque estas se observaban generalmente más

contaminadas que las que se expendían al menudeo, se han encontrado pocos datos publicados acerca de su carga microbiológica (Schwab A.H., *et al* 1982).

De Boer *et al* (1985) reportaron un estudio microbiológico de 150 muestras de 54 especies diferentes en los países bajos y encontraron que las cuentas de microorganismos mesofílicos aerobios eran mayores a  $10^7$  UFC/g en pimienta blanca y negra, así mismo, *B. cereus* se presentaba en números mayores a  $10^4$  UFC/g en pimienta blanca y *C. perfringens* en más de  $10^3$  UFC/g en una mezcla de especias.

Pafumi, en 1986, realizó un estudio microbiológico de 33 tipos de especias en Australia, para determinar el grado de contaminación por bacterias mesofílicas aerobias, coliformes, hongos y levaduras, *E. coli*, *B. cereus*, presuntivo de *C. perfringens* y *Salmonella*. Se encontró que en la mayoría de las especias se observaban medias aritméticas de mesofílicos aerobios de  $1.0 \times 10^5$  UFC/g, menos de  $1.0 \times 10^3$  UFC/g de *B. cereus*, menos de  $1.0 \times 10^2$  UFC/g de *C. perfringens* y menos de 10 UFC/g de coliformes. La pimienta presentaba el nivel de contaminación microbiana más alto de todos los organismos probados.

Kneifel y Berger (1993) analizaron un total de 160 muestras de 55 especies diferentes obtenidas de mercados de Viena, Austria, y observaron que más del 50% del material contenía entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC/g de bacterias mesofílicas aerobias; el 40% de los productos presentaba *Bacillus*, con números mayores a  $10^5$  UFC/g y que una muestra de comino contenía *C. perfringens*.

### Detección de *C. perfringens* enterotoxigénico

La identificación de cepas enterotoxigénicas de *C. perfringens* a menudo involucra la detección de la producción de la enterotoxina por métodos inmunológicos, entre los que se encuentran, la inmunodifusión (Popoff, M.R., 1984), electroinmunodifusión (Duncan, C.L. y E B Somers, 1972), hemaglutinación pasiva reversa (Uemura, T. *et al*, 1973), contraelectroforesis (Naik, H.S. y C.L. Duncan, 1977), pruebas de ELISA (Bartholomew, B.A., *et al*, 1985) y el uso de anticuerpos fluorescentes (Niilo, L., 1978).

La mayoría de las pruebas desarrolladas no se utilizan ampliamente debido a problemas relacionados con su costo, el tiempo que se requiere para realizarlas, su sensibilidad o la imposibilidad de manejar grandes números de muestras (McClane, B A y J T Snyder, 1987)

Además de los métodos tradicionales mencionados, se han reportado tres métodos que involucran la detección del gen de la enterotoxina de *C. perfringens*, entre los que se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el uso de sondas marcadas radiactivamente y el uso de sondas marcadas con digoxigenina (Kokai-kun, J.F., *et al*, 1994).

En general, la calidad microbiológica de las especias a menudo refleja la situación higiénica de la región en donde se producen y procesan. Y es evidente, que como muchos otros productos agrícolas las especias están expuestas a la contaminación microbiana a varios niveles (Kneifel W y E Berger 1993)

Debido a que en México no se conocen reportes sobre la incidencia de *C. perfringens* enterotoxigénico en especias, consideramos de gran importancia

determinar la presencia y toxigenicidad de la bacteria en estos productos, que se expenden en la ciudad de Monterrey, N.L. y su Area Metropolitana

## HIPOTESIS

Las especias que se expenden en Monterrey, N.L. y su Area Metropolitana, presentan *Clostridium perfringens* enterotoxigénico en números importantes.

## OBJETIVOS

Determinar el número de *C. perfringens* en 5 especias de uso común, obtenidas de establecimientos comerciales del Area Metropolitana de Monterrey, N.L.

Determinar la presencia del gen de la enterotoxina en las cepas aisladas de *C. perfringens*, mediante la técnica de hibridización en colonia



## **MATERIAL Y METODOS**

### **CEPAS DE *C. perfringens***

Para este trabajo se utilizaron las cepas de referencia de *C. perfringens*, FD-1041, NCTC 8798 y NCTC 8239 las cuales son productoras de enterotoxina y las cepas FD-1 y ATCC 3624 las cuales no producen enterotoxina.

Las cepas fueron conservadas en medio de carne cocida según Robertson (Willis, A. T., 1960), como cultivos esporulados a -20 °C y se realizaron resiembras cada 4 meses

### **ACTIVACION DE LAS CEPAS**

Las cepas de referencia se activaron inoculando una alícuota del cultivo esporulado de reserva en tubos con 10 ml de caldo con tioglicolato e inmediatamente después se sometieron a un choque térmico a 75 °C por 15 min a fin de estimular la germinación de las esporas, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C por 14 a 16 h.

### **ESPECIAS Y CONDIMENTOS**

Para este estudio se analizaron un total de 380 muestras de especias y condimentos de uso común en Monterrey N.L. y su área metropolitana las cuales se muestran a continuación (Tabla 1)

Tabla 1 Especies utilizadas

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	PARTE USADA (ESTADO)
AJO	<i>Allium sativum L.</i>	FRUTO (POLVO)
PIMIENTA	<i>Polygonum hydropiper L.</i>	FRUTO (ENTERO)
COMINO	<i>Cyanomun cynanomun L.</i>	FRUTO (ENTERO)
OREGANO	<i>Origanum vulgare L.</i>	HOJAS/TALLOS (ENTEROS)
LAUREL	<i>Litsea glaucescens H.B.K.</i>	HOJAS (ENTERAS)

## MUESTREO

Se realizó un muestreo estratificado de las cinco especias en centros comerciales y establecimientos del municipio de Monterrey, N.L. y en tres de los municipios de su área metropolitana (San Nicolás de los Garza, Guadalupe y San Pedro Garza García), para este estudio se consideraron tres presentaciones comerciales de las especias: bolsa de polietileno, venta a granel y frasco de vidrio hermético. Esta consideración se hizo en base a un estudio preliminar de tipo encuesta en el que se obtuvo información acerca de las preferencias comerciales de estos productos en los diferentes municipios. Para este trabajo, se analizaron 300 muestras de la presentación de bolsa de polietileno provenientes de los cuatro municipios, 50 muestras de la presentación a granel (provenientes de Monterrey y Guadalupe) y 30 muestras de la presentación de frasco de vidrio (provenientes de Monterrey y San Pedro Garza García)(Tabla 2)

Tabla 2 Número de muestras de especias por presentación comercial

NUMERO DE MUESTRAS				
MUNICIPIO	BOLSA DE POLIETILENO	VENTA A GRANEL	FRASCO DE VIDRIO	TOTAL
San Nicolás de los Garza	75	0	0	75
Monterrey	75	25	15	115
Guadalupe	75	25	0	100
San Pedro Garza García	75	0	15	90
<b>TOTAL</b>	300	50	30	380

#### I. AISLAMIENTO DE *C. perfringens* DE LAS ESPECIAS

##### ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS ESPECIAS UTILIZADAS

Debido a la reconocida actividad antimicrobiana de las especias, se consideró necesario realizar algunos ensayos para determinar si existía un efecto de las muestras analizadas en el aislamiento del microorganismo, para lo cual se activaron las cepas: NCTC 8239, NCTC 8238, ATCC 3624 y FD-1 de *C. perfringens*, y se inocularon células (1 % de inóculo) en matraces con 200 ml de medio para esporulación Duncan-Strong (Duncan, C L y D H Strong, 1968) Los cultivos se incubaron a 37°C por 10 h en baño de agua

Las células obtenidas se separaron en una centrífuga IEC (Mod. HN-SII) a 5000 rpm/10 min y posteriormente fueron destruidas mediante ultrasonido utilizando un sonicador Cole-Parmer (Mod 4710) con el fin de eliminar las células vegetativas. Las células esporuladas obtenidas, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril fría

y se ajustaron a una absorbancia de 0.5 ( $A_{600}$ ) en un espectrofotómetro Sequoia-Turner (Mod 340). Se tomaron alícuotas de las células esporuladas y se determinó el número de esporas por el método de cuenta viable en placa, para lo cual se hicieron diluciones decimales en solución salina fisiológica (0.85 %), se inocularon en cajas petri y se agregó un medio que contenía extracto de levadura al 1%, peptona tripticasa al 1.5% y agar bacteriológico al 1.5%. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 h en anaerobiosis utilizando una mezcla de  $N_2$  y  $CO_2$  (95 : 5)

Se realizaron diluciones decimales en solución salina fisiológica (0.85 %) estéril (1 : 10) de cada uno de los extractos de las especias y se dejaron reposar por 15 min, posteriormente se tomaron alícuotas de 1.0 ml que se mezclaron con 100  $\mu$ l de las diferentes suspensiones de células esporuladas ajustadas ( $10^6$  -  $10^7$  UFC/g).

Las preparaciones se sometieron a choque térmico de 75°C/ 15 min y se inocularon diluciones decimales de ellas en agar base de Shahidi Ferguson Perfringens (SFP) (Difco) selectivo para *C. perfringens*, adicionado con 0.5% de neomicina y 0.2% de polmixina B para después incubarse a 37 °C durante 24 h en anaerobiosis con la mezcla anteriormente descrita.

## **PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE ESPECIAS**

Se pesaron porciones de 1 g de muestra de cada especia molidas en condiciones asépticas. Cuando éstas se encontraban enteras se utilizó licuadora y se colocaron en tubos que contenían 9 ml de solución salina fisiológica (0.85%). Las suspensiones se homogenizaron en un agitador eléctrico y se dejaron en reposo por 30 min a temperatura ambiente para permitir la separación de los microorganismos del

material vegetal. Posteriormente las mezclas se sometieron a agitación por 1 min y se dejaron en reposo por 5 min con el fin de permitir la precipitación de las partículas gruesas de la muestra (Kneifel, W. y E. Berger, 1994).

### **AISLAMIENTO PRESUNTIVO Y RECuento DE *C. perfringens***

Se realizaron diluciones decimales con solución salina fisiológica del sobrenadante del homogenado original y se sembraron en placas de petri con tres divisiones. Posteriormente se agregó agar SFP selectivo para *C. perfringens*, adicionado con 0.5% de neomicina y 0.2% de polmixina B y se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones anaeróbicas utilizando la mezcla anteriormente descrita.

Se contaron las colonias características de *C. perfringens* (negras rodeadas de un halo de precipitación). Se tomaron entre 1 y 5 colonias de cada placa para su siembra en caldo con tioglicolato y su posterior inoculación en medio de reserva de carne cocida según Robertson.

### **PRUEBAS CONFIRMATORIAS DE *C. perfringens***

Se tomaron de 2 a 3 gotas de los aislados presuntivos de *C. perfringens* mantenidos en medio de carne cocida a temperatura ambiente, y se inocularon en tubos con 5 ml de caldo con tioglicolato para posteriormente incubarse a 37°C por 24 h.

Los cultivos de células vegetativas se sembraron tomando una asada y colocándola en tubos con 5 ml de caldo lactosado, caldo nitrado, medio para producción de sulfuro, indol y detección de movilidad (SIM) y en gelatina nutritiva. Los

cultivos se incubaron en anaerobiosis utilizando la mezcla de gases ya descrita a 37 °C por 24 h.

Los aislados con la morfología característica del microorganismo, sin movilidad, que fueron capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido, que redujeron los nitratos a nitritos y presentaban actividad de gelatinasa, se identificaron como *C. perfringens* (Labbe, R. G. y S. M. Harmon, 1991) y fueron conservados a temperatura ambiente en medio de reserva para experimentos posteriores. Con los aislados identificados de *C. perfringens*, se realizaron las correcciones en forma proporcional de la cuenta viable en placa descrita anteriormente.

## II. HIBRIDACION EN COLONIA PARA LA DETRMINACION DE LA PRESENCIA DEL GEN DE LA ENTEROTOXINA

### **SONDA DE DNA**

La identificación de los aislados de *C. perfringens* que presentaban el gen de la enterotoxina (ent<sup>+</sup>) se realizó por medio de una sonda de ADN de 40 bases correspondientes a una región de este gen (Van Damme-Jongsten, M. *et al.* 1990); con la siguiente secuencia:

5' ATGCTTAGTAACAATTTAAATCCAATGGTGTTCGAAAATG 3'

Este oligonucleótido fue donado por el Dr. Peter Feng de los laboratorios de la Food and Drug Administration (FDA) en Washington, D.C. E.U.A.

## **MARCAJE DE LA Sonda CON DIGOXIGENINA**

El marcaje de la sonda de ADN anteriormente descrita, se realizó utilizando el hapteno digoxigenina, el cual se incorporó al extremo 3' del oligonucleótido por medio de una transferasa terminal, la cual adicionó una mezcla de nucleótidos no marcados y el complejo digoxigenina-11-dUTP, de acuerdo al protocolo descrito por el sistema comercial Genius (Boehringer-Mannheim, 1995).

## **PREPARACION DE LAS MEMBRANAS PARA HIBRIDACION**

Los cultivos de reserva de *C. perfringens* mantenidos en medio de carne cocida se activaron mediante la inoculación de 3 a 4 gotas del mismo en tubos con 5 ml de caldo con tioglicolato, los cuales se incubaron posteriormente a 37°C por 16 a 18 h. A partir de estos cultivos de células vegetativas se tomaron alícuotas de 50 y 100 µl y se colocaron de acuerdo a un patrón establecido previamente en una plantilla, en los orificios de una cámara de Dot blot (Minifold I, Schleicher & Schuell Keene, NH)

Se colocaron como controles positivos (ent<sup>+</sup>) y negativos (ent<sup>-</sup>), cultivos de cepas de referencia, los cuales se activaron de la forma descrita anteriormente. Los cultivos se impregnaron en membranas de nylon con un poro de 0.45 µ (Micron MSI Westboro, MA) colocadas entre la cámara de Dot blot y posteriormente se secaron aplicando vacío con una bomba de presión (General Electric, WP Indiana) por espacio de 20 min, lo que permitió que las células se adhirieran a la membrana

## **LISIS CELULAR Y FIJACION DEL ADN A LAS MEMBRANAS**

Las membranas se colocaron en una cama de papel filtro Whatman No. 1 impregnada con solución desnaturalizadora (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M en agua destilada y SDS 0.1%) por espacio de 15 min y luego se transfirieron a una cama de papel filtro impregnado con solución neutralizadora (Tris-HCl 1.0 M, pH 7.5 con NaCl 1.5 M) por 5 min. Posteriormente las membranas se colocaron 15 min en una solución amortiguadora de citratos 2X (0.3 M, pH 7 con NaCl 3 M)

El ADN se fijó a las membranas por calor en una estufa a 120°C por 15 a 30 min, manteniendo las membranas húmedas utilizando la solución amortiguadora de citratos 2X anteriormente descrita. Los restos celulares que pudieron quedar en las membranas se eliminaron utilizando una solución de lavado (Solución amortiguadora de citratos 3X, con SDS 0.1%) en agitación a 68°C por 1 a 3 h

## **PREHIBRIDACION E HIBRIDACION DE LA SONDA**

Las membranas se colocaron en placas petri que contenían 20 ml de solución de prehibridación [(Solución amortiguadora de citratos 5X con reactivo de bloqueo para la hibridación de ácidos nucleicos (Genius, Boehringer Mannheim, 1995) al 1% (p/v), N-lauroilsarcosina al 0.2% y SDS al 0.2%] y se incubaron en agitación en baño de agua a 68°C por 2 h

Posteriormente las membranas se colocaron en solución de hibridación (1 pmol/ml del oligonucleótido marcado con digoxigenina en 20 ml de la solución de prehibridación anteriormente descrita) y se incubaron en agitación en baño metabólico a 56°C por 4 h.



Se realizaron lavados de astringencia para eliminar el excedente del oligonucleótido no unido específicamente al gen, primero con la solución de lavado (amortiguador de citratos 2X con SDS 1%) a temperatura ambiente por 5 min, y posteriormente con una solución de lavado 0.5X (amortiguador de citratos 0.5X y SDS 0.1%) a la temperatura de hibridación (56°C) en baño de con agitación constante.

### **DETECCION COLORIMETRICA**

Después de la hibridación y los lavados de astringencia, se equilibraron las membranas a temperatura ambiente por 1 min en una solución amortiguadora [(Acido maléico 0.1M, pH 7.5 con NaCl 0.15M y Tween 20, 0.3% (p/v)].

Posteriormente, se colocaron las membranas en solución de bloqueo [reactivo de bloqueo para la hibridación de ácidos nucleicos (Genius, Boehringer Mannheim, 1995) al 1% (p/v) disuelto en solución amortiguadora de ácido maléico 0.1M] por 30 a 60 min con agitación a temperatura ambiente.

Las membranas se incubaron en una solución de anticuerpos anti-dig conjugados con fosfatasa alcalina [6 µl de anti-dig (Boehringer Mannheim) en 30 ml de la solución de bloqueo anteriormente descrita] a temperatura ambiente por 30 min en agitación. Se retiró esta solución y se realizaron dos lavados de 15 min con la solución amortiguadora de lavado de ácido maléico.

Se equilibraron las membranas en 20 ml solución amortiguadora de detección (Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5 con NaCl 0.1 M) por 2 min y posteriormente se agregaron 10 ml de solución de sustrato generador de color [45 µl de nitroazul de tetrazolio y 35 µl

de 5-bromo-4-cloro-3-indiolil-fosfato (Genius, Boehringer Mannheim, 1995) en 10 ml de la solución amortiguadora de detección anteriormente descrita].

Las membranas se incubaron en la obscuridad y sin agitación por espacio de 2 a 3 h, exponiéndose por períodos cortos de tiempo a la luz para observar el desarrollo de un color morado o pardo en las reacciones positivas. El revelado se detenía sometiendo a las membranas a un lavado con agua bidestilada.

## ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Los datos de contaminación de las especias por *C. perfringens* se sometieron a un análisis de varianza simple ( $\alpha = 0.05$ ), para determinar si existían variaciones en el grado de contaminación de estos productos en los diferentes municipios y posteriormente se les realizó una prueba de Tukey de comparación múltiple de medias con el fin de identificar donde ocurrían dichas variaciones por grupos de homogeneidad.

Así mismo se realizaron pruebas de " $\chi^2$ " Chi cuadrada ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar el efecto de los extractos en la germinación de las esporas de *C. perfringens* y de "t" de Student ( $\alpha = 0.05$ ) para comparar si existían diferencias significativas en el grado de contaminación de las especias por presentación comercial.

## RESULTADOS

### ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS ESPECIAS UTILIZADAS

Los resultados de la determinación del efecto de los extractos de las diferentes especias utilizadas en la germinación de esporas de *C. perfringens* se muestran en la Tabla 3. Se observó que en las cepas productoras de enterotoxina NCTC 8239 y NCTC 8238, no se presentaba diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) por la prueba de  $\chi^2$  en la cuenta de células esporuladas sometidas a la acción de los extractos de las diferentes especias (dilución 1:10) con respecto a los controles.

De manera similar, en las cepas no productoras de enterotoxina ATCC 3624 y FD-1 no se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la cuenta de células esporuladas sometidas a los tratamientos en relación a los controles.

TABLA 3 Efecto de los extractos de especias sobre el crecimiento de *C. perfringens*

CONTROLES UFC/g	CANTIDAD DE <i>C. perfringens</i> (UFC/g)				
	AJO EN POLVO	PIMIENTA	COMINO	OREGANO	LAUREL
NCTC 8239 <sup>*</sup> 1.97 X 10 <sup>7</sup>	6.6 X 10 <sup>6</sup>	3.0 X 10 <sup>6</sup>	9.3 X 10 <sup>6</sup>	9.0 X 10 <sup>6</sup>	1.43 X 10 <sup>7</sup>
NCTC 8238 <sup>+</sup> 4.0 X 10 <sup>6</sup>	2.0 X 10 <sup>6</sup>	1.6 X 10 <sup>6</sup>	1.0 X 10 <sup>6</sup>	3.0 X 10 <sup>6</sup>	2.0 X 10 <sup>6</sup>
ATCC 3624 <sup>-</sup> 1.5 X 10 <sup>7</sup>	1.3 X 10 <sup>6</sup>	1.3 X 10 <sup>6</sup>	2.0 X 10 <sup>6</sup>	2.3 X 10 <sup>6</sup>	3.0 X 10 <sup>6</sup>
FD-1 <sup>-</sup> 1.1 X 10 <sup>7</sup>	2.0 X 10 <sup>6</sup>	5.0 X 10 <sup>6</sup>	8.0 X 10 <sup>6</sup>	1.6 X 10 <sup>6</sup>	4.6 X 10 <sup>6</sup>

NOTAS \* CEPAS ENTEROTOXIGENICAS    + CEPAS NO ENTEROTOXIGENICAS

## ANÁLISIS DE LA CANTIDAD DE *C. perfringens* EN ESPECIAS

### AJO EN POLVO

Se analizaron 60 muestras de ajo en polvo de la presentación de bolsa de polietileno en los cuatro municipios estudiados. Los resultados se encuentran en la Tabla 4, en ellos se observa que de las 15 muestras provenientes del municipio de San Nicolás de los Garza, once (72%) presentaban entre < 9 y 30 UFC/g de *C. perfringens*, en dos muestras (14%) se detectaron entre 71 y 110 UFC/g y en otras dos (7%) entre 110 y 500 UFC/g.

Esta misma tendencia se observó en el municipio de Guadalupe donde el 80% (12 muestras) contenía entre < 9 y 30 UFC/g, y el 20% restante (3 muestras) presentaba entre 91 y 200 UFC/g.

De manera semejante en el municipio de San Pedro se observó que el 86% (13 muestras) presentaba entre < 9 y 30 UFC/g, en una de ellas (7%) se observaron 70 UFC/g y en otra más (7%) 200 UFC/g.

En forma contrastante, de las muestras analizadas del municipio de Monterrey se obtuvieron cuentas de < 9 UFC/g en tres de ellas (20%), siete muestras (14%) presentaban entre 10 y 70 UFC/g y en otras cinco (33%) se observaron entre 110 y 500 UFC/g.

Los resultados del análisis de la cantidad de *C. perfringens* en las especias que se expenden a granel, provenientes de los municipios de Monterrey y Guadalupe, se encuentran en la Tabla 5, en donde se observó que de las muestras analizadas el

20% presentaba <100 UFC/g, el 60% de las muestras contenía entre 101 y 300 UFC/g y el 20% de ellas presentaba 500 UFC/g en ambos municipios.

La comparación por la prueba de "t" de los datos de las muestras de ajo analizadas, expandidas en bolsa plástica y a granel demostraron que existía una diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre estas en cuanto la contaminación por el microorganismo, lo que indica una mayor proporción de *C. perfringens* en las muestras expandidas a granel que en las de bolsa plástica.

En las muestras analizadas de la presentación de frasco de vidrio, provenientes de los municipios de Monterrey y San Pedro, no se detectó la presencia (< 9 UFC/g) de *C. perfringens* (Tabla 6).

TABLA 4 Número de muestras de ajo en polvo expendidas en bolsa de polietileno que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>									
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g							
		<9	10-30	31-50	51-70	71-90	91-110	111-200	201-500
SAN NICOLAS	15 (100)*	9 (60)	2 (13)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	1 (7)	1 (7)	1 (7)
GUADALUPE	15 (100)	3 (20)	3 (20)	3 (20)	1 (7)	0 (0)	2 (13)	2 (13)	1 (7)
MONTERREY	15 (100)	6 (40)	6 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (13)	1 (7)	0 (0)
SAN PEDRO	15 (100)	11 (73)	2 (13)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)
TOTAL	60	29	13	3	2	1	5	5	2

Nota ( )\* Los números en paréntesis indican por ciento del total

TABLA 5 Número de muestras de ajo en polvo expendidas a granel que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<100	101-200	201-300	301-400	401-500
GUADALUPE	5 (100)*	1 (20)	1 (20)	2 (40)	0 (0)	1 (20)
MONTERREY	5 (100)	1 (20)	2 (40)	1 (20)	0 (0)	1 (20)
TOTAL	10	2	3	3	0	2

Nota: ( )\*. Los números en paréntesis indican porciento del total

TABLA 6 Número de muestras de ajo en polvo expendidas en frasco de vidrio que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<9	101-200	201-300	301-400	401-500
MONTERREY	3 (100)*	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	6	6	0	0	0	0

Nota: ( )\*. Los números en paréntesis indican porciento del total

## PIMIENTA

Se analizaron 60 muestras de pimienta de la presentación de bolsa de polietileno en los cuatro municipios estudiados. Los resultados se presentan en la Tabla 6, en ellos se observa que de las 15 muestras provenientes del municipio de San Nicolás de los Garza, catorce (93%) presentaban menos de 9 UFC/g de *C. perfringens*, solo en una muestra (7%) se observaron cuentas de 200 UFC/g

De las muestras analizadas del municipio de Monterrey, se obtuvieron cuentas de entre < 9 y 30 UFC/g en catorce de ellas (93%), en una muestra (7%) se observaron números de 200 UFC/g.

El análisis de las muestras en los municipios de Guadalupe y de San Pedro demostró que el total de ellas (100%) contenía entre < 9 y 30 UFC/g

Los resultados del análisis de la cantidad de *C. perfringens* en las especias que se expenden a granel, provenientes de los municipios de Monterrey y Guadalupe, se encuentran ordenados en la Tabla 8, en donde se observa que de las muestras analizadas, el 100% presentaba <100 UFC/g en ambos municipios

La comparación por la prueba de " t " de los datos de las muestras analizadas, expandidas en bolsa plástica y a granel demostraron que no existía una diferencia significativa en la cantidad del microorganismo, lo que indicó una proporción similar de *C. perfringens* en las muestras expandidas a granel y en bolsa plástica.

En las muestras analizadas de la presentación de frasco de vidrio, provenientes de los municipios de Monterrey y San Pedro, no se detectó la presencia (< 9 UFC/g) de *C. perfringens* (Tabla 9)



TABLA 8 Número de muestras de pimienta expendidas a granel que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<100	101-200	201-300	301-400	401-500
GUADALUPE	5 (100)*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MONTERREY	5 (100)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	10	10	0	0	0	0

Nota: ( ) Los números en paréntesis indican porcentaje del total

TABLA 9 Número de muestras de pimienta expendidas en frasco de vidrio que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<9	101-200	201-300	301-400	401-500
MONTERREY	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	6	6	0	0	0	0

Nota: ( ) Los números en paréntesis indican porcentaje del total

TABLA 7 Número de muestras de pimienta expendidas en bolsa de polietileno que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>										
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g								
		<9	10-30	31-50	51-70	71-90	91-110	111-200	201-500	
SAN NICOLAS	15 (100)*	14 (93)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)
GUADALUPE	15 (100)	11 (73)	3 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)
MONTERREY	15 (100)	13 (87)	2 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	15 (100)	14 (93)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	60	52	6	0	0	0	0	0	2	0

Nota: ( ). Los números en paréntesis indican porcentaje del total

TABLA 8 Número de muestras de pimienta expendidas a granel que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<100	101-200	201-300	301-400	401-500
GUADALUPE	5 (100)*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MONTERREY	5 (100)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	10	10	0	0	0	0

Nota: ( )\*. Los números en paréntesis indican por ciento del total

TABLA 9 Número de muestras de pimienta expendidas en frasco de vidrio que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<9	101-200	201-300	301-400	401-500
MONTERREY	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	6	6	0	0	0	0

Nota: ( )\* Los números en paréntesis indican por ciento del total

## COMINO

Se analizaron 60 muestras de comino de la presentación de bolsa de polietileno en los cuatro municipios estudiados. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Se observó que de las 15 muestras provenientes del municipio de San Nicolás de los Garza, trece (87%) presentaban entre  $< 9$  y  $30$  UFC/g de *C. perfringens*, en tanto que dos (13%) contenían  $110$  UFC/g.

De las muestras analizadas del municipio de Monterrey, trece de ellas (87%) mostraron entre  $< 9$  y  $30$  UFC/g, mientras que dos (13%) presentaban  $100$  UFC/g.

El análisis de las muestras del municipio de Guadalupe demostró que nueve de ellas (60%) contenían  $< 9$  UFC/g, cuatro (26%) presentaban cuentas de entre  $10$  y  $50$  UFC/g, una (7%) presentaba  $110$  UFC/g y otra  $500$  UFC/g.

En el municipio de San Pedro se observó que catorce de las muestras (93%) presentaban entre  $< 9$  y  $30$  UFC/g, mientras que en una de ellas (7%) se observaron cuentas de  $110$  UFC/g.

Los resultados que muestran la cantidad de *C. perfringens* en muestras de comino que se expenden a granel, provenientes de los municipios de Monterrey y Guadalupe se encuentran en la Tabla 11, en donde se observa que de las muestras analizadas el 100% presentaba  $< 100$  UFC/g en el municipio de Guadalupe, mientras que en Monterrey en un 40% se observaron  $200$  UFC/g y en un 10% de ellas  $500$  UFC/g.

La comparación por la prueba de "t" de los datos de las muestras analizadas, expandidas en bolsa plástica y a granel demostraron que existía una diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre la cantidad del microorganismo, lo que indicó

una mayor proporción de *C. perfringens* en las muestras de comino expandidas a granel que en las de bolsa plástica

En las muestras analizadas de la presentación de frasco de vidrio, provenientes de los municipios de Monterrey y San Pedro, no se detectó la presencia ( $< 9$  UFC/g) de *C. perfringens* (Tabla 12)

TABLA 10 Número de muestras de comino expandidas en bolsa de polietileno que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS FOTALES	No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>							
		UFC/g							
		<9	10-30	31-50	51-70	71-90	91 -110	111 -200	201 -500
SAN NICOLAS	15 (100)	8 (54)	5 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (13)	0 (0)	0 (0)
GUADALUPE	15 (100)	12 (80)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (13)	0 (0)	0 (0)
MONTERREY	15 (100)	9 (60)	2 (13)	2 (13)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	1 (7)
SAN PEDRO	15 (100)	12 (80)	2 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	60	41	10	2	0	0	6	0	1

Nota. ( ) Los números en paréntesis indican porcentaje del total

TABLA 11 Número de muestras de comino expandidas a granel que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<100	101-200	201-300	301-400	401-500
GUADALUPE	5 (100)*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MONTERREY	5 (100)	2 (40)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
TOTAL	10	7	2	0	0	1

Nota: ( )\*. Los números entre paréntesis indican porciento del total

TABLA 12 Número de muestras de comino expandidas en frasco de vidrio que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<9	101-200	201-300	301-400	401-500
MONTERREY	3 (100)*	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	6	6	0	0	0	0

Nota: ( )\*. Los números entre paréntesis indican porciento del total

## OREGANO

Se analizaron 60 muestras de orégano de la presentación de bolsa de polietileno en los cuatro municipios estudiados. Los resultados indicaron que de las 15 muestras provenientes del municipio de San Nicolás de los Garza trece (86%) presentaban entre < 9 y 30 UFC/g de *C. perfringens* y en dos muestras (14%) se observaron entre 91 y 200 UFC/g (Tabla 13).

En todas (100%) las muestras analizadas del municipio de Monterrey, se obtuvieron < 9 UFC/g. El análisis de las muestras en el municipio de Guadalupe demostró que catorce de ellas (93%) contenían < 9 UFC/g y una (7%) contenía 110 UFC/g. En el municipio de San Pedro se observó que trece de las muestras (86%) presentaban entre < 9 y 30 UFC/g en una (7%) se observaron 200 UFC/g y en otra (7%) 500 UFC/g.

Cuando se analizaron las muestras expandidas a granel, provenientes de los municipios de Monterrey y Guadalupe (Tabla 14), se encontró que el 100% de ellas presentaba <100 UFC/g en Guadalupe, mientras que en Monterrey se observó que el 60% de estas contenía <100 UFC/g, un 20% de ellas presentaba 200 UFC/g y el restante 20% contenía 400 UFC/g.

La comparación por la prueba de " t " de los datos de las muestras analizadas, expandidas en bolsa plástica y a granel demostraron que existía una diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la cantidad del microorganismo entre las presentaciones comerciales lo que indicó una mayor proporción de *C. perfringens* en las muestras de orégano expandidas a granel que en las de bolsa plástica.



En las muestras analizadas de la presentación de frasco de vidrio, provenientes de los municipios de Monterrey y San Pedro, no se detectó la presencia ( $< 9$  UFC/g) de *C. perfringens* (Tabla 15).

TABLA 13 Número de muestras de orégano expandidas en bolsa de polietileno que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

		<b>No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i></b>							
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g							
		<9	10-30	31-50	51-70	71-90	91-110	111-200	201-500
SAN NICOLAS	15 (100)*	11 (73)	2 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	1 (7)	0 (0)
GUADALUPE	15 (100)	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MONTERREY	15 (100)	14 (93)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	15 (100)	12 (80)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (7)	1 (7)
TOTAL	60	52	3	0	0	0	2	2	1

Nota ( ) Los números entre paréntesis indican por ciento del total

TABLA 14 Número de muestras de orégano expandidas a granel que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS DE QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<100	101-200	201-300	301-400	401-500
GUADALUPE	5 (100)*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MONTERREY	5 (100)	3 (60)	1 (20)	0 (0)	1 (20)	0 (0)
TOTAL	10	8	1	0	1	0

Nota: ( )\*. El Número entre paréntesis indica el por ciento del total

TABLA 15 Número de muestras de orégano expandidas en frasco de vidrio que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<9	101-200	201-300	301-400	401-500
MONTERREY	3 (100)*	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	6	6	0	0	0	0

Nota: ( )\*. Los números entre paréntesis indican el por ciento del total

## LAUREL

En las 60 muestras de laurel analizadas empaquetadas en bolsa de polietileno en los cuatro municipios estudiados, se observó que en los municipios de San Nicolás de los Garza y Monterrey el total (100%) de ellas presentaba entre < 9 y 30 UFC/g de *C. perfringens*. Cuando se analizaron las muestras de los municipios de Guadalupe y de San Pedro se encontró que catorce de ellas (93%) contenían < 9 UFC/g, así mismo, una muestra (7%) presentaba 30 UFC/g (Tabla 16).

En el análisis de las muestras de la presentación a granel, provenientes de los municipios de Monterrey y Guadalupe, se observó que el 80% de ellas presentaba <100 UFC/g en Guadalupe y el restante 10% de ellas contenía 500 UFC/g, mientras que en Monterrey el total de las muestras presentaba <100 UFC/g (Tabla 17).

La comparación por la prueba de “ t “ de los datos de las muestras analizadas, expandidas en bolsa plástica y a granel demostraron que no existía una diferencia significativa entre la cantidad del microorganismo, lo que indicó una proporción de *C. perfringens* similar en las muestras expandidas a granel y en bolsa plástica

En las muestras analizadas de la presentación de frasco de vidrio, provenientes de los municipios de Monterrey y San Pedro, no se detectó la presencia (< 9 UFC/g) de *C. perfringens* (Tabla 18).

TABLA 16 Número de muestras de laurel expendidas en bolsa de polietileno que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>									
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g							
		<9	10-30	31-50	51-70	71-90	91-110	111-200	201-500
SAN NICOLAS	15 (100)*	14 (93)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GUADALUPE	15 (100)	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MONTFRREY	15 (100)	14 (93)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	15 (100)	14 (93)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	60	57	3	0	0	0	0	0	0

Nota: ( ) \* El número entre paréntesis indica el por ciento del total

TABLA 17 Número de muestras de laurel expendidas a granel que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<100	101-200	201-300	301-400	401-500
GUADALUPE	5 (100)*	4 (80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
MONTERREY	5 (100)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	10	9	0	0	0	1

Nota: ( ). Los números entre paréntesis indican el porciento del total

TABLA 18 Número de muestras de laurel expendidas en frasco de vidrio que contienen *C. perfringens* en diferentes rangos

No. DE MUESTRAS QUE CONTIENEN <i>C. perfringens</i>						
MUNICIPIO ANALIZADO	MUESTRAS TOTALES	UFC/g				
		<9	101-200	201-300	301-400	401-500
MONTERREY	3 (100)*	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SAN PEDRO	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TOTAL	6	6	0	0	0	0

Nota: ( ). Los números entre paréntesis indican el porciento del total

## COMPARACION DE LA CANTIDAD DE *C. perfringens* EN ESPECIAS EXPENDIDAS EN LOS DISTINTOS MUNICIPIOS

El análisis de varianza de los datos de la cantidad de *C. perfringens* en muestras de ajo en polvo, indicó que existía una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en los diferentes municipios. Por medio de la prueba de Tukey de comparación múltiple de medias se determinó que el mayor grado de contaminación lo presentaba el municipio de Monterrey. En los municipios de San Nicolás y de Guadalupe se observó una contaminación media, mientras que la contaminación menor se presentaba en el municipio de San Pedro.

Así mismo, se observó que no existía una diferencia significativa en la cantidad de *C. perfringens* en las muestras de pimienta, comino y laurel en los diferentes municipios.

Se determinó que existía una diferencia altamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la cantidad de *C. perfringens* en muestras de orégano en los diferentes municipios. El mayor grado de contaminación lo presentaba San Pedro, en los municipios de San Nicolás y de Guadalupe se observó una contaminación similar media, mientras que la contaminación menor se presentaba en Monterrey.

## **AISLAMIENTO DE *C. perfringens* ENTEROTOXIGENICO DE LAS ESPECIAS**

Se obtuvieron un total de 188 aislados confirmados de *C. perfringens* a partir de las muestras de especias analizadas, los cuales se sometieron a una prueba de hibridación utilizando una sonda de ADN dirigida contra el gen de la enterotoxina, los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 19.

Un porcentaje alto (54%) de las muestras de ajo en polvo analizadas presentaron *C. perfringens*, de estas se obtuvieron ochenta y cuatro aislados (45%) provenientes de la presentación de bolsa plástica y dieciseis (9%) de la presentación a granel. De un total de cien aislados de este microorganismo dos, correspondientes a los municipios de San Nicolás y Monterrey, presentaron el gen de la enterotoxina.

En las muestras de pimienta analizadas se obtuvieron once aislados (6%) de la presentación de bolsa plástica y solo uno (0.5%) de la presentación a granel. Dos de los aislados provenientes del municipio de Monterrey resultaron positivos en la prueba de hibridación.

Se encontraron un total de cuarenta y siete aislados de *C. perfringens* en las muestras analizadas de comino, de los cuales, treinta y nueve (20.5%) provenían de la presentación de bolsa plástica y ocho (4%) de la presentación a granel. Solo uno de los aislados correspondiente al municipio de Monterrey presentaba el gen de la enterotoxina.

De las muestras de orégano analizadas se obtuvieron un total de veintitrés aislados, de los cuales diecisiete (9%) provenían de la presentación de bolsa plástica



y seis (3%) de la presentación a granel. Un aislado del municipio de Monterrey resultó positivo a la prueba de detección del gen de la enterotoxina de este microorganismo.

En las muestras de laurel analizadas, se obtuvo una menor proporción de aislados de *C. perfringens*, dos (1%) provenientes de la presentación de bolsa plástica y cuatro (2%) de la presentación a granel, ambos correspondientes al municipio de Guadalupe, sin embargo, dos de ellos resultaron positivos en la prueba de hibridación con el gen de la enterotoxina. En la presentación comercial de frasco de vidrio no se obtuvieron aislados de este microorganismo.

De un total de ciento ochenta y ocho aislados confirmados de *C. perfringens*, ocho (4.25%) resultaron positivos a la prueba de hibridación utilizando una sonda de ADN del gen de la enterotoxina.

TABLA 19 Aislamiento de *C. perfringens* enterotoxigénico en las diferentes presentaciones comerciales de las especias

ESPECIA/ PRESENTACION	No. DE AISLADOS (%)	No. DE AISLADOS CON EL GEN DE LA ENTEROTOXINA
<b>AJO EN POLVO</b>		
BOLSA PLASTICA	84 (45)	1 <sup>a</sup>
GRANEL	16 (9)	1 <sup>b</sup>
FRASCO DE VIDRIO	0	0
<b>PIMIENTA</b>		
BOLSA PLASTICA	11 (6)	2 <sup>b</sup>
GRANEL	1 (0.5)	0
FRASCO DE VIDRIO	0	0
<b>COMINO</b>		
BOLSA PLASTICA	39 (20.5)	0
GRANEL	8 (4)	1 <sup>b</sup>
FRASCO DE VIDRIO	0	0
<b>OREGANO</b>		
BOLSA PLASTICA	17 (9)	0
GRANEL	6 (3)	1 <sup>b</sup>
FRASCO DE VIDRIO	0	0
<b>LAUREL</b>		
BOLSA PLASTICA	2 (1)	0
GRANEL	4 (2)	2 <sup>c</sup>
FRASCO DE VIDRIO	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>188</b>	<b>8</b>

NOTAS: Origen: San Nicolas, Monterrey, Guadalupe

## DISCUSION

En el presente trabajo se determinó la incidencia de *C. perfringens* enterotoxigénico en especias que se expenden en Monterrey, N. L. y su área metropolitana.

Existe una gran variedad de reportes a nivel mundial sobre la calidad microbiológica de las especias. Estos estudios indican la importancia de la determinación de la presencia de *C. perfringens* en estos productos como organismo contaminante, potencialmente patógeno y responsable de deterioro (De Boer, E. y E. M. Boot, 1983; De Boer, E. *et al.* 1985; Kneifel W y E Berger, 1994; Pafumi, J., 1986; Powers, E. M., *et al.*, 1975). El presente trabajo ofrece información al respecto debido a que en México no se conocían estudios relacionados a la contaminación de las especias por microorganismos anaerobios esporulados.

### Análisis de la actividad antimicrobiana de las especias

Se determinó la actividad antimicrobiana de las especias, esto se hizo con el fin de establecer si existía algún efecto en la germinación de las esporas durante el aislamiento. Se observó que a la dilución empleada (1:10) no se observaba inhibición en las cepas de referencia de *C. perfringens*, tanto enterotoxigénicas como no enterotoxigénicas (Tabla 3). Existen reportes que indican que la actividad antimicrobiana de las especias debida a su contenido de aceites esenciales es de poca importancia para la preservación de los alimentos.

Esto es debido a que la concentración de estos aceites en los productos a los que se añaden las especias es generalmente demasiado baja como para que llegue a impedir el crecimiento microbiano (Silliker, J. H., et al., 1985).

### **Análisis de cantidad de *C. perfringens* en las especias**

Las especias secas son portadoras de los microorganismos habitualmente presentes en la planta y en el suelo en que ésta crece. A estos microorganismos hay que sumarles los procedentes del polvo, de la contaminación fecal de aves, roedores e insectos y del agua no potable empleada en algunos pasos del procesamiento (Silliker, JH, et al 1985)

En el presente estudio la cantidad de *C. perfringens* en las diferentes especias analizadas resultó variable dependiendo de cada tipo de especia, y en particular de su presentación comercial y del área de procedencia de la muestra.

Se observó que la cantidad del microorganismo en las muestras de ajo en polvo era mayor que en las otras especias estudiadas. Esto se demostró particularmente en el Municipio de Monterrey y en la presentación comercial a granel (Tabla 5) en donde variaba de 10 a 50 X 10<sup>2</sup> UFC/g. Nuestros resultados se relacionan con lo reportado por otros autores (De Boer E et al , 1985; Pafumi, J . 1986; Powers, E M et al, 1975)

En las muestras de pimienta analizadas no se observó una diferencia significativa en la cantidad de *C. perfringens* en los diferentes municipios, ni en las presentaciones comerciales de bolsa plástica y de granel (Tablas 7 y 8). Los valores variaron

de 1.0 a  $2.0 \times 10^2$  UFC/g que resultaron similares a lo reportado en otros estudios (Silliker, J. H. *et al.*, 1985)

Se observó que en las muestras de comino, las cantidades de este microorganismo no diferían significativamente en los municipios y eran mayores en la presentación comercial a granel (Tabla 11), con un rango de 1.0 a  $4.3 \times 10^2$  UFC/g, similar a lo reportado por otros autores (De Boer, E., *et al.* 1985; Pafumi, J., 1986).

En las muestras de orégano, la cantidad de *C. perfringens* varió significativamente en los municipios. Se encontró una mayor proporción en el municipio de San Pedro Garza García y en la presentación comercial a granel (Tabla 14), cuyos valores alcanzaron de 1.0 a  $3.4 \times 10^2$  UFC/g. Estos resultados fueron similares a lo reportado en otras investigaciones (Pafumi, J., 1986; Powers, E. M., *et al.*, 1975).

Las muestras de laurel presentaron cuentas de *C. perfringens* menores comparadas con las otras especias estudiadas, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes municipios, ni entre las presentaciones comerciales de bolsa plástica y de granel (Tablas 16 y 17). La cantidad del microorganismo en general fue de  $<30$  UFC/g, muy inferior a lo reportado en otros estudios (Silliker, J. H., *et al.*, 1985).

Las diferencias observadas en la cantidad de *C. perfringens* en las especias y en los municipios podrían deberse a deficiencias sanitarias durante los procesos de cosecha, almacenaje, transportación, empaque y venta en el mercado (Kneifel, W. y E. Berger, 1994)

La presencia en las especias de esporas bacterianas resistentes al calor como las de *C. perfringens*, además de ser un riesgo a la salud representa un serio

problema debido a que en muchos casos, este microorganismo es responsable del deterioro que sufren algunos productos. Es importante destacar que la destrucción de tales esporas requiere a menudo un tratamiento térmico drástico, el cual puede causar una reducción sustancial de la calidad nutricional y sensorial del producto condimentado (Rodríguez M *et al* , 1991).

En las muestras analizadas de frasco de vidrio no se detectó la presencia de *C. perfringens* debido probablemente a que fueron sometidas a algún tipo de tratamiento, entre los métodos utilizados para eliminar o reducir la carga microbiana en estos productos se incluyen prácticas de fumigación con dióxido de etileno y óxido de propileno, así como el uso de microondas y rayos gamma (Kneifel, W. y E. Berger, 1994 Powers E M *et al* 1975)

#### Aislamiento de *C. perfringens* enterotoxigénico en las especias

La presencia del gen de la enterotoxina en los aislados obtenidos de *C. perfringens* se determinó por medio de una sonda de ADN marcada con digoxigenina dirigida contra una región de dicho gen (Tabla 19). Se observó que el mayor número de aislados se obtuvo de las muestras de ajo (54% del total), por otro lado en las muestras de laurel se presentó el menor número de aislados (6 en total) pero una de las mayores proporciones de la presencia del gen de la enterotoxina.

De un total de 188 aislados confirmados de *C. perfringens* solo 8 cepas provenientes de los municipios de San Nicolás de los Garza, Monterrey y Guadalupe, N.L. resultaron positivas a la prueba de hibridación con la sonda, lo que constituye el 4.25% de los aislados. Estudios recientes sugieren que solo el 6% de los aislados de *C. perfringens* a nivel global presentan el gen de la enterotoxina, sin embargo, se ha

observado que el porcentaje de este microorganismo que presenta este gen en aislados provenientes de heces fecales de individuos afectados por la intoxicación alimentaria es considerablemente mayor (40-60 %) (Van Damme-Jongsten, *et al.*, 1990).

Existe una gran variedad de métodos serológicos para detectar la producción de la enterotoxina de *C. perfringens* y que son útiles en las investigaciones de la epidemiología de las intoxicaciones alimentarias por este microorganismo, entre los que se incluyen la inmunodifusión (Popoff, M. R., 1984), la electroinmunodifusión (Duncan C. L. y E. B. Somers, 1972), la hemaglutinación pasiva reversa (Uemura, T. G., *et al.*, 1973), la contraelectroforesis (Naik, H. S. y C. L. Duncan, 1978), pruebas de ELISA (Bartholomew B. A., *et al.* 1985) y el uso de anticuerpos fluorescentes (Nillo, L. 1977). Sin embargo estas pruebas pueden dar resultados falsos negativos (Van Damme-Jongsten, M., 1990), además de requerir que los aislados de *C. perfringens* esporulen *ex vivo* para obtener niveles detectables de enterotoxina.

Entre los métodos para la detección del gen de la enterotoxina se incluyen a la reacción en cadena de la polimerasa, el uso de sondas marcadas radiactivamente y el uso de sondas marcadas con digoxigenina. Estos presentan la ventaja de que pueden utilizarse preparados de células vegetativas del microorganismo, debido a que algunos aislados de *C. perfringens* esporulan muy poco o no lo hacen en los medios de cultivo convencionales (Kokai-kun J. F., *et al.* 1994).

El presente estudio demostró que la técnica de Dot-blot utilizada, es efectiva en la detección del gen de la enterotoxina en aislados de *C. perfringens* provenientes de especies además de ser más rápida que los métodos inmunológicos convencionales.

Las especias analizadas se utilizan ampliamente en México, sin embargo, no existen normas oficiales que regulen su calidad microbiológica, ni datos que impliquen a estos productos como una fuente de contaminación de *C. perfringens*.

En base a nuestros resultados establecemos que se acepta la hipótesis propuesta para este trabajo que indica la presencia de *C. perfringens* enterotoxigénico en las especias estudiadas por lo que sugerimos el mejoramiento de la calidad microbiológica de estos productos expendidos en Monterrey, N. L. y su área metropolitana.



## CONCLUSIONES

*C. perfringens* se encuentra como contaminante en las especias que se expenden a granel y en bolsa plástica en los municipios de Monterrey, N.L. y su área metropolitana

La cantidad de *C. perfringens* es significativamente mayor en las presentaciones comerciales de granel en ajo en polvo, comino y orégano.

En el municipio de Monterrey, N.L. se encontraron cantidades significativamente mayores del microorganismo en el ajo en polvo. Mientras que en el municipio de San Pedro Garza García el mayor número se presentó en el orégano que se expende en bolsa plástica.

No se detectó la presencia de *C. perfringens* en ninguna de las muestras de la presentación comercial de frasco de vidrio.

El gen de la enterotoxina de *C. perfringens* se encontró en una proporción del 25% de los aislados obtenidos de las especias.

Es posible detectar la presencia de *C. perfringens* enterotoxigénico en muestras de especias utilizando una técnica de Dot-blot.

## LITERATURA CITADA

Antai, S. P. 1988. Study of the *Bacillus* flora of Nigerian spices. *Int. J. Food Microbiol.* **6**: 259-261.

Bartholomew, B. A., M. F. Stringer, G. N. Watson y R. J. Gilbert. 1985. Development and application of an enzyme linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *J. Clin. Pathol.* **38**:222-228

Bryan, F. L. 1979. Foodborne diseases in the U. S. associated with meat and poultry. *J. Food Prot.* **43**: 140-150.

Bruchmann, M. 1995. Salmonella contamination of spices. Results of studies carried out in Brandenburg in 1993. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene.* **46**:17-19.

Centers for Disease Control. 1981. Foodborne disease outbreaks annual summary. 1978. Revised, reissued. Atlanta, GA.

Collier, P. W., J. C. M. Sharp, A. F. MacLeod, G. I. Forbes y F. Mackay. 1988. Food poisoning in hospitals in Scotland, 1978-87. *Epidem. Inf.* **101**: 661-667.

Craven, S. E. 1980. Growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in foods. *Food Technol.* **34**: 80-87.

Czeczulin, J. R. , P.C. Hanna y B. C. McClane. 1993. Cloning, nucleotide sequencing and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61**:3429-3439.

De Boer, E. y E. M. Boot. 1983. Comparison of methods for isolation and confirmation of *Clostridium perfringens* from spices and herbs. *J. Food Prot.* **46**:533-536.

De Boer, E., W. M. Spiegelberg, y F. W. Janssen. 1985. Netherlands Society for Microbiology. Section for food Microbiology. Microbiology of spices and herbs. *Antonie van Leeuwenhoek.* **51**:435-438.

Delcourt, A., A. Rousset y J. P. Lamaitre. 1994. Microbial and mycotoxic contamination of peppers and food safety. *Boll. Chim. Farm.* **133**:235-238

Draughon, F. A., M. Elahi, e I. E. McCarty. 1981. Microbial spoilage of mexican-style sauces. *J. Food Prot.* **44**:284-287.

Duncan, C. L. y D. H. Strong. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* **16**: 82

Duncan, C. L. y E. B. Somers. 1972. Quantitation of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by electroimmunodiffusion. *Appl. Microbiol.* **24**:801-804

El-Kady, I. A., S. S. Mohamed El-Maraghy y E. Mostafa-M. 1992. Contribution of the mesophilic fungi of different spices in Egypt. *Mycopathol.* **120**:93-101.

Fruin, J. T. 1977. Significance of *Clostridium perfringens* in processed food. *J. Food Protect.* **40**: 330-332.

Hall, H. E. y R. Angelotii. 1965. *Clostridium perfringens* in meat and meat products. *Appl. Microbiol.* **13**: 352-357.

Jackson, S. G., D. A. Yip-Chuck, J. B. Clak y M. H. Brodsky. 1986. Diagnostic importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin analysis in recurring enteritis among elderly, chronic care psychiatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 748-751.

Julseth, R. M. y R. H. Deibel. 1974. Microbial profile of selected spices and herbs at import. *J. Milk Food Technol* **37**: 414-419.

Kaul, M. y N. Taneja, 1989 A note on the microbial quality of selected spices. *J. Food Sci. Technol. India.* **26**:169-170.

Kneifel, W. y E. Berger. 1994 Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *J. Food Prot.* **57**:893-901.

Kokai-kun, J. F., J. G. Songer, J. R. Czeczulin, F. Chen y B. A. McClane. 1994. Comparison of western immunoblots and gene detection assays for identification of potential enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. J. Clin. Microbiol. **32**:2533-2539.

Labbé, R. G. y D. K. Rey. 1979. Raffinose increases sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A. Appl. Environ. Microbiol. **37**: 1196-1200.

Labbé, R. G. 1989. *Clostridium perfringens*, ch 5. In M. P. Doyle (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York.

Labbé, R. G. 1991. *Clostridium perfringens*. J. Assoc. Anal. Chem. **74**:711-714.

Labbé, R. G. y S. M. Harmon. 1991. *Clostridium perfringens*. Chapter 37. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C.

Ladiges, W. C., J. F. Foster y W. M. Ganz. 1974. Incidence and viability of *Clostridium perfringens* in ground beef. J. Milk Food Technol. **37**: 622-623.

Levine, W. C., J. F. Smart, D. L. Archer, N. H. Bean y R. V. Tauxe. 1991. Foodborne disease outbreaks in nursing homes, 1975 through 1987. JAMA. **266**: 2105-2109.

Lund, M. B. 1990. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. In: Foodborne illness. Lancet: 982-986.

McKillop, E. J. 1958. Bacterial contamination of hospital food with special reference to *Clostridium welchii* food poisoning. J. Hyg. **57**: 31-35.

McClane, B. A. y J. T. Snyder. 1987. Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Immun. Meth. **100**:131-136.

Naik, H. S. y C. L. Duncan. 1978. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin in human fecal samples and anti-enterotoxin in sera. J. Clin. Microbiol. **7**:337-340.

Nakamura, M. y K. D. Kelly. 1968. *Clostridium perfringens* in dehydrated soups and sauces. J. Food Sci. **33**:424-426.

Niilo, L. 1977. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A studied by the use of fluorescent antibody. Can. J. Microbiol. **23**:908-915.

Pafumi, J. 1986. Assesment of the microbiological quality of spices and herbs. J. Food. Prot. **49**:958-953.

Petersen, L. R., R. Mshar, G. H. Cooper Jr., A. R. Bruce y J. L. Hadler. 1988. A large *Clostridium perfringens* foodborne outbreak with an unusual attack rate pattern. Amer. J. Epidem. **127**: 605-611.

Popoff, M. R. 1984. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin: a rapid method for preparation of a specific antiserum using an enterotoxin purified by the polyacrylamide gel electrophoresis technique. FEMS Microbiol. Lett. **21**:1-5.

Powers, E. M., R. Lawyer e Y. Masuoka. 1975. Microbiology of processed spices. J. Milk Food Technol. **38**:683-687.

Powers. E M , T G. Latt y T. Brown. 1976. Incidence and levels of *Bacillus cereus* in processed spices J. Milk Food Technol. **39**:668-670

Rockland, L. B., B. L. Gardiner y D. Pieczarka. 1968 Stimulation of gas production and growth of *Clostridium perfringens* type A (No. 3624) by legumes. J. Food Sci. **34**: 411-414.

Rodríguez, M , M. Alvarez y M. Zayas. 1991. Calidad microbiológica de especias consumidas en Cuba Rev. Lat Microbiol. **33**: 149-151

Saito, M. 1990. Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals foods and natural environment in Japan J. Food Prot. **53** 115-118

Shrivastava, A. y P C. Jain. 1992. Seed mycoflora of some spices. J. Food Sci. Technol. India. **29**:228-230.

Silliker, J. H., R. P. Elliot, A. C. Baird-Parker, F. L. Bryan, J. H. B. Christian, D. S. Clak, J. C. Olson Jr. y T. A. Roberts (eds.) 1985. Microbial ecology of food. 1st. ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. International Association of Microbiological Societies. Washington. D.C.

Souza, de T: L. y J. C. O. Tórtora. 1986. *Clostridium perfringens* enterotoxigenico em carne moída bovina no Rio de Janeiro. Rev. Microbiol. Sao Paulo. **17**:356-363.

Stringer, M. F., P. C. B. Timbull y R. J. Gilbert. 1980. Application of serological typing to the investigation of outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning, 1970-1978. J. Hyg., Cambridge. **84**. 443-456.

Ting, M. N. y D. Y. C. Fung. 1972. Chemically defined medium for growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. **24**: 755-759.

Tsai, C. C., M. J. Torres-Angel y H. P. Riemann. 1974. Characteristics of enterotoxigenic *Clostridium pefringens* type A isolated from cattle and chickens J. of the Formosan Medical Association. **73**. 501-510.



Tschirdewahn, B., S. Notermans, K. Wernars y F. Untermann. 1991. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in feces of various animals. Int. J. of Food Microbiol. **14**. 175-178.

Uemura, T., G. Sakaguchi y H. P. Riemann. 1973. In vitro production of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its detection by reversed passive hemagglutination. Appl. Microbiol. **26**:381-385.

Van Damme-Jongsten, M , J. Rodhouse, R. J. Gilbert, y S. Notermans. 1990. Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from outbreaks of food poisoning. J. Clin. Microbiol. **28**:131-133

Vernon, E. 1977. Food poisoning and *Salmonella* infections in England and Wales, 1973-75. Public Health, London. **91**: 225-235.

Willis, A. T. 1960. Anaerobic bacteriology in clinical medicine. Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. London.

Woodburn, M. y S Nester. 1982. Contamination and growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in mexican-style beans J. Food Prot. **45**:638-642

