

Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses

Evelyn Rodríguez-Cavallini, César Rodríguez, María del Mar Gamboa, María Laura Arias

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica

RESUMEN. Los alimentos listos para su consumo (ALC) son alimentos procesados que pueden consumirse sin ningún tratamiento térmico adicional, lo que ha incrementado su popularidad. El objetivo de este estudio fue determinar la inocuidad y calidad microbiológica de 90 ALC producidos por pequeñas industrias costarricenses, con el fin de evaluar el riesgo para la salud pública. Se analizaron 26 encurtidos, 18 aderezos, 18 ensaladas, 12 dulces en conserva y 16 antipastos. A cada muestra se le determinó el pH y la presencia por cultivo de indicadores de calidad microbiológica y de patógenos (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* y *Bacillus cereus*); además, se investigó por PCR la presencia de genes que codifican por las toxinas de *C. botulinum* y *C. perfringens*. Un 37% de las muestras tuvo un nivel de acidez que podría permitir la proliferación de patógenos ($\text{pH} \geq 4.5$). En general, los indicadores de vida útil fueron aceptables, siempre y cuando los ALC se mantengan en condiciones de temperatura y humedad adecuadas. Un 64% de las muestras presentó valores de coliformes totales que sugieren mala higiene en su elaboración ($\text{NMP/g} > 1000$), que se confirma con el hallazgo de coliformes fecales en el 56% y que las hace inaceptables para el consumo humano. Todos los cultivos para patógenos fueron negativos, excepto cuatro para *B. cereus*. No se detectaron toxinas de *C. botulinum* y solo una muestra fue positiva para el PCR de *C. perfringens*. Este estudio evidencia una importante contaminación fecal en ALC, una situación indeseable y totalmente prevenible si se practican técnicas adecuadas de manejo de alimentos, de higiene y se presta mayor atención a los puntos críticos de control.

Palabras clave: Alimentos listos para consumo, calidad microbiológica, contaminación fecal, inocuidad alimentaria.

SUMMARY: Microbiological evaluation of ready-to-eat foods manufactured by small Costa Rican industries. Ready-to-eat (RTE) foods are processed foodstuffs which have gained popularity in recent times because they can be ingested without further thermic treatments. In this work, the microbiological quality and safety of 90 samples of RTE foods manufactured by small Costa Rican industries was determined to evaluate whether they represent a Public Health risk. Twenty-six samples of pickled vegetables, 18 dips, 18 salads, and 12 sweet treats were studied. Each sample was analyzed with regard to its pH, the presence of culturable microbiological quality indicators and recognized foodborne pathogens (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, and *Bacillus cereus*). Selected genes encoding toxins of *C. botulinum* and *C. perfringens* were screened by PCR. Thirty-seven percent of the samples had a level of acidity that could allow the growth and proliferation of bacterial pathogens ($\text{pH} \geq 4.5$). The shelf-life indicators were acceptable but only if the RTE foods are kept at adequate conditions of temperature and humidity. Sixty-four percent of the RTE foods had total coliforms values that evidence inadequate hygiene practices during its elaboration ($\text{MPN/g} > 1000$). This result was confirmed by the finding of fecal coliforms in 56 % of the samples, which, by the way, are unacceptable for human consumption. All cultures for pathogens were negative, except for 4 samples that contained *B. cereus*. Toxins of *C. botulinum* were not detected and one single sample was positive for the PCR for *C. perfringens*. The elevated degree of fecal contamination detected in the RTE could be prevented by means of good manufacturing practices, better hygiene measures and a deeper attention to critical control points.

Key words: Ready to eat foods, microbiological quality, fecal contamination, food safety.

INTRODUCCION

Los alimentos listos para su consumo (ALC) son alimentos procesados que pueden ser crudos o cocidos, venderse calientes o fríos (1) y consumirse sin ningún tratamiento térmico adicional (2). En los últimos años la popularidad de este tipo de alimentos se ha incrementado, ya que representan una opción fácil y nutritiva para el consumidor. Por otro lado, representan una industria creciente, que ofrece oportunidades laborales, especialmente en países en vías de desarrollo como Costa Rica.

A pesar de su amplia aceptación, los ALC pueden representar un riesgo para la salud pública, debido a su contaminación con microorganismos patógenos como consecuencia de una inadecuada manipulación durante su preparación. Esta situación ya ha sido reportada en Tailandia, el Reino Unido y en Taiwán (1,3,4) y representa un reto para las autoridades sanitarias de países donde las enfermedades de origen alimentario tienen una alta morbilidad y donde no existen estándares microbiológicos específicos para los ALC (5).

La calidad microbiológica y la vida útil de los alimentos

se puede estimar determinando el número de bacterias aerobias y anaerobias, el recuento de bacterias lácticas y esporuladas (que resisten algunos tratamientos térmicos y condiciones de acidez), la presencia de indicadores de contaminación fecal e higiene (coliformes fecales y totales) y de patógenos reconocidos, entre los que podemos citar a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereu*, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum*.

En esta investigación se analizaron estos parámetros en 90 muestras de diferentes ALC producidos por pequeñas industrias costarricenses, empacados en bolsas o recipientes descartables y distribuidos en comercios tales como supermercados, pulperías o abastecedores, con el fin de estimar si estos alimentos representan un riesgo para la salud de los consumidores.

MATERIALES Y METODOS

El proyecto fue realizado en los laboratorios de Investigación en Bacteriología Anaerobia y de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, de la Universidad de Costa Rica. Se analizaron muestras, de tres lotes diferentes, de encurtidos ($n=26$), aderezos ($n=18$), ensaladas ($n=18$), dulces en conserva ($n=12$) y antipastos ($n=16$) elaborados por pequeñas industrias costarricenses ($n_{total}=90$). Las muestras fueron adquiridas en supermercados, pulperías o abastecedores del Área Metropolitana de San José, Costa Rica, transportadas hasta el laboratorio a la temperatura de mantenimiento en el supermercado y analizadas antes de su fecha de vencimiento. A cada muestra se le determinó directamente el valor de pH y se le investigaron, mediante cultivo, indicadores de calidad microbiológica y la presencia de patógenos. La presencia de *Clostridium botulinum* y de *C. perfringens* fue investigada además, por PCR de fragmentos conservados.

Calidad microbiológica

Se siguió la metodología descrita por Pouch (6) para los recuentos totales de bacterias aerobias y anaerobias mesófilas, así como de esporulados aerobios y anaerobios. Brevemente, se pesó 25 gramos de cada muestra en bolsa de Stomacher® donde se homogeneizó con 225 mL de agua peptonada estéril 0.1% (APE); se hicieron diluciones adicionales hasta 10^{-5} en APE. De cada dilución se inoculó, por duplicado, placas de agar estándar suplementados con 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) que fueron incubados en aerobiosis por 48 h a 35°C para el recuento total aerobio (RTA) y placas de agar estándar, incubados en jarras de anaerobiosis de 3 a 5 días a 35°C para el recuento total anaerobio (RTAn). Adicionalmente, cada dilución se inoculó, por duplicado en placas de agar “Man Rogosa Sharp” (MRS), incubados por 4 días a 20°C en atmósfera microaerofílica para el recuento de bacterias lácticas. Para el recuento de esporulados aerobios y

anaerobios (REA y REAn), la dilución inicial fue calentada a 80°C por 10 min y se inoculó siguiendo la metodología citada antes. El número más probable por gramo (NMP/g) de coliformes totales (CT) y fecales (CF) fue determinado en serie de tres tubos, inoculando 1 ml de cada dilución en caldo lactosado simple + campana Durham, los cuales fueron incubados por 48 h a 35°C; los tubos que presentaron gas fueron inoculados en caldo bilis verde brillante e incubados por 48 h a 35°C para la determinación de coliformes totales y en tubos de caldo *Escherichia coli*, los cuales fueron incubados por 24 h a 44.5°C para confirmar la presencia de coliformes fecales.

Presencia de patógenos

Se siguió la metodología recomendada por Pouch (6) y Jousimies-Somer y colaboradores (7) para la determinación de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *C. botulinum* y *C. perfringens*. La detección de *L. monocytogenes* se realizó homogeneizando 25 g de muestra en 225 ml de caldo Listeria, el cual fue incubado por 48 h a 30°C y posteriormente inoculado en placas de agar Oxford que fueron incubados por 48 h a 35°C. La presencia de *B. cereus* fue determinada homogeneizando 25 g de muestra en 225 ml de caldo tripticasa soya con polimixina, que fue incubado por 24 h a 35°C. En este caso, el aislamiento selectivo se hizo en placas de agar polimixina-manitol-yema de huevo que se incubaron por 24 h a 35°C. La detección de *Salmonella* spp. se realizó homogeneizando 25 g de muestra en 225 ml de caldo lactosa incubado por 24 h a 35°C. Posteriormente se hizo un enriquecimiento selectivo en caldo tetracionato por 24 h a 43°C y en caldo selenito- cistina por 24 h a 35°C. El aislamiento selectivo fue realizado en placas de agar Hecktoen y agar XLD incubados 24 h a 35°C.

Para el cultivo de *C. botulinum* y *C. perfringens* se inoculó, con técnica anaeróbica, de 1 g de muestra homogeneizada en dos tubos con 15 ml de medio Chopped Meat (CM) pre-reducido. El tubo utilizado para aislar *C. botulinum* se incubó por 72 h a 35°C y se inoculó en placas de agar yema de huevo (AYH) que se mantuvieron en anaerobiosis por 72 h a 35°C. Por su parte, el tubo utilizado para aislar *C. perfringens* se incubó por 24 horas a 44°C y luego se inoculó en agar oleandomicina-polimixina-sulfadiazina (OPSP) que se incubó en anaerobiosis por 24 h a 44°C. Estos procedimientos se validaron haciendo uso de las cepas control *Listeria monocytogenes* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Clostridium botulinum* ATCC 19397 y *Clostridium perfringens* ATCC 13134.

PCR para *C. botulinum* y *C. perfringens*

Se extrajo ADN a partir de agrupaciones de colonias lipasa positivas en placas de AYH y de colonias negras en placas de OPSP, con el protocolo para bacterias Gram-positivas del kit

DNEasy Blood & Tissue (Qiagen). Para la detección de cepas de *C. botulinum* potencialmente toxigénicas se usó el PCR múltiple descrito por Lindström y colaboradores (8) y las cepas control *C. botulinum* ATCC 19397 (tipo A), *C. botulinum* ATCC 7949 (tipo B), *C. botulinum* ATCC 17786 (tipo E) y *C. botulinum* ATCC 25764 (tipo F). Por su parte, la detección molecular de *C. perfringens* potencialmente toxigénico se basó en la amplificación de un fragmento del gen que codifica por la enterotoxina de esta bacteria (9). Como control positivo se utilizó ADN genómico de la cepa *C. perfringens* LIBA 89.

RESULTADOS

El pH promedio de los diferentes tipos de muestras osciló entre 3,6 y 4.7 (Tabla 1). Cabe destacar que el 37% de la muestras tuvo un valor de pH igual o mayor a 4,5 lo que, bajo determinadas condiciones ambientales, podría permitir el crecimiento de *C. botulinum* y de otros patógenos (10).

TABLA 1

Valores de pH promedio en 90 alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses

Tipo de alimento	pH promedio
Encurtidos (n=26)	3,6 ± 0,7
Aderezos (n=18)	4,0 ± 0,6
Ensaladas (n=18)	4,3 ± 0,4
Dulces en conserva (n=12)	4,7 ± 0,6
Antipastos (n=16)	4,6 ± 1,0

Con respecto al RTA, un 6% de los aderezos y ensaladas tenían entre 10^6 UFC/g y 10^8 UFC/g, valor que se considera límitrofe (6). El 39% de los aderezos, 38% de los antipastos y 28% de las ensaladas presentaron RTAn superiores a 10^6 UFC/g. Destaca el hallazgo de esporulados tanto aerobios como anaerobios en un porcentaje cercano al 50% de las muestras de aderezos y encurtidos. Por otra parte, se hallaron más de 10^6 UFC de bacterias lácticas/g en tan solo el 6% de los antipastos, 6% de los aderezos y 4% de los encurtidos (Tabla 2).

TABLA 2

Valores porcentuales de recuentos (UFC/g) de indicadores de vida útil y de bacterias esporuladas en 90 alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses

	Indicadores de vida útil												Recuento de esporulados					
	Recuento total			Recuento total			Recuento de bacterias			Aerobios			Anaerobios					
	Aerobio	anaerobios	lácticas	<10	<10 ⁶	>10 ⁶	<10	<10 ⁶	>10 ⁶	<10	<10 ⁶	>10 ⁶	<10	<10 ⁶	>10 ⁶	<10	<10 ⁶	>10 ⁶
Encurtidos (n=26)	38	62	0	34	58	8	65	31	4	58	42	0	50	46	4			
Aderezos (n=18)	39	55	6	22	39	39	55	39	6	50	50	0	33	61	6			
Ensalada (n=18)	0	94	6	0	72	28	61	39	0	0	100	0	0	100	0			
Dulces (n=12)	25	75	0	8	92	0	75	25	0	17	83	0	0	100	0			
Antipastos (n=16)	0	100	0	0	62	38	44	50	6	44	56	0	6	94	0			

A pesar de que algunos recuentos fueron altos, la mayoría de los tipos de muestras presentó recuentos asociados a vida útil dentro de valores aceptables ($<10^6$ UFC/g) siempre y cuando se den las adecuadas condiciones de almacenaje del producto y consumo a corto plazo. Sin embargo, cabe destacar que una muestra de aderezo mostró valores superiores a 10^6 UFC/g en todos los parámetros evaluados.

Aunque puede ser usual encontrar coliformes totales en ALC, es importante destacar que 58 muestras (64%) presentaron valores que sugieren una mala higiene en su elaboración (NMP/g > 1000). Esta noción se confirma con el hallazgo de coliformes fecales en 50 muestras (56%), lo que

las convierte en inaceptables para el consumo humano. Un 17% de los aderezos y ensaladas presentaron más de 1000 NMP/g de coliformes fecales (Tabla 3), evidenciando la utilización de materia prima contaminada o bien contaminación post-proceso.

Todas las muestras fueron negativas por cultivo para *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *C. botulinum*, en tanto que cuatro muestras fueron positivas por *B. cereus* (un encurtido, dos aderezos y un dulce). No se detectaron los genes para las toxinas de *C. botulinum* y una única muestra fue positiva por PCR para la enteroxina de *C. perfringens* (aderezo de yogur).

TABLA 3

Valores porcentuales de indicadores de higiene y contaminación fecal (NMP/g) de 90 alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses

	Coliformes totales			Coliformes fecales		
	<3	10-1000	>1000	<3	10-1000	>1000
Encurtidos n=26	65	8	27	77	15	8
Aderezos n=18	56	16	28	61	22	17
Ensaladas n= 18	0	78	22	11	72	17
Dulces n=12	33	67	0	42	58	0
Antipastos n=16	19	56	25	19	70	11

DISCUSION

Los ALC representan en la actualidad una alternativa de nutrición fácil y asequible para la población en general. No obstante, estos productos pueden representar un riesgo para la salud de los consumidores ya que han sido, reiteradamente, asociados con la transmisión de enfermedades de origen alimentario (1,3,4).

Los encurtidos, que fueron los ALC más ácidos debido a que contienen al menos 5% de ácido acético y se preparan con ingredientes escaldados (11), fueron los productos que más frecuentemente dieron lugar a valores negativos en los indicadores de vida útil e higiene (<10 UFC/g). Esto a pesar de que los vegetales son ampliamente reconocidos como portadores de una amplia variedad y cantidad de microorganismos (12).

Los aderezos son productos perecederos que usualmente se mantienen en refrigeración y que generalmente contienen ácido benzoico como preservante (13). Los aderezos analizados en este estudio no tenían preservantes y venían empacados en forma hermética; bajo estas condiciones, los recuentos altos de anaerobios y en menor grado de aerobios, podrían acortar considerablemente su tiempo de vida útil.

Llama la atención que un alto porcentaje de los encurtidos y aderezos hayan tenido esporulados aerobios y anaerobios, ya que su empaque podría favorecer el desarrollo de patógenos esporulados anaerobios como *C. botulinum* o *C. perfringens* y aerobios como *B. cereus*. Aunque no todos fueron encontrados en este estudio, existe un riesgo potencial de que puedan estar presentes en este tipo de muestras.

Los RTA, RTAn y los recuentos de bacterias lácticas de las ensaladas indicaron que tendrían una larga vida útil, no obstante, un 89% de las muestras se catalogaron como inaceptables para consumo humano debido a que estaban contaminadas con materia fecal. Múltiples investigaciones realizadas en diversas partes del mundo han puesto de manifiesto este tipo de contaminación en los ALC (1,14). Se ha descrito que la contaminación de los vegetales puede

provenir del suelo, agua de riego o de su manipulación posterior (6). Estudios anteriores realizados con hortalizas cultivadas en Costa Rica reportan un 100% de contaminación fecal con densidades poblaciones superiores a 10^4 UFC/g en estos productos (12). Además, cabe hacer notar que el troceo de los vegetales provoca un aumento de humedad y liberación de nutrientes que pueden favorecer el crecimiento de microorganismos, lo que agravaría el problema (15). Finalmente se debe considerar el contacto de los vegetales con superficies y equipo difícil de higienizar de manera adecuada (16).

A pesar de presentar el mayor valor de pH promedio, los dulces evaluados presentaron los mayores índices de vida útil, probablemente debido a su baja disponibilidad de agua; la contaminación fecal detectada pudo originarse en alguna etapa posterior al proceso de producción. Una situación similar podría haber ocurrido con los antipastos, pues en todos los casos, los antipastos eran de vegetales con algún grado de cocimiento previo.

Se aisló *B. cereus* en cuatro muestras y se obtuvo un único resultado positivo para la enterotoxina de *C. perfringens*. En este sentido, cabe destacar la importancia de una adecuada manipulación y almacenamiento de los alimentos, especialmente en referencia a la presencia de *B. cereus*, a fin de evitar que este patógeno alcance poblaciones que puedan comprometer la salud del consumidor.

La baja frecuencia de detección de *B. cereus* contrasta con estudios en Brazil (17), Japón (18) y Australia (19), entre otros, en los que se aisló con una frecuencia mayor. También llama la atención por su común cultivo a partir de especias, ensaladas y vegetales, así como de alimentos listos para consumo (20,21).

Las enfermedades de origen alimentario son consideradas por la FAO (Food and Agricultural Organization) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) como el problema de salud con mayor distribución en el mundo y como una causa importante de la reducción de la productividad económica de las naciones (22). Este estudio evidencia una importante contaminación fecal en productos listos para su consumo, una situación indeseable y totalmente prevenible si se practican las adecuadas técnicas de manejo de alimentos, de higiene y se presta mayor atención a los puntos críticos de control de su formulación. Al respecto, y con el propósito de colaborar con la pequeña industria costarricense, se alertó a los productores nacionales acerca de los resultados del estudio y se les brindaron medidas correctivas pertinentes. Se espera así, contribuir con el mantenimiento de la buena salud de la población.

AGRADECIMIENTOS

A los señores Pablo Vargas, Laura Villalobos y Martín Quesada por su asistencia técnica y a la Vicerrectoría de

Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo económico.

REFERENCIAS

1. Chomvarin C, Chantarasuk Y, Srigulbutr S, Chareonsudjai S, Chaicumpar K. Enteropathogenic bacteria and enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* isolated from ready to eat foods in Khon Kaen, Thailand. *Southeast Asian J.* 2006;37:983-90.
2. Clarence YS, Obinna CN, Shalom NC. Assesment of bacteriological quality of ready to eat food (Meat pie) in Benin City metropolis, Nigeria. *African J Microbiol Research* 2009;3:390-5.
3. Gillespie I, Little C, Mitchell R. Microbiological examination of cold ready to eat sliced meats from catering establishments in the United Kingdom. *J Appl Microbiol.* 2000;88:4767-74.
4. Fang TJ, Wei QK, Liao CW, Hung MJ, Wang TH. Microbiological quality of 18 degrees C ready to eat food products sold in Taiwan. *Int J Food Microbiol.* 2003;80:241-50.
5. Wei Q-K, Hwang S-L, Chen T-R. Microbiological Quality of Ready-to-eat Food Products in Southern Taiwan. *J Food Drug Anal.* 2006;14:68-73.
6. Pouch F, ItoK. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington DC: APHA; 2001
7. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EL, Wexler HM, Finegold S. Anaerobic Bacteriology Manual. 6th ed. California: Star Publishing Company; 2002.
8. Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67:5694-9.
9. Fach P, Popoff M. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:4232-6.
10. Graham AF, Mason DR, Peck MW. Inhibitory effect of combinations of heat treatment, pH, and sodium chloride on a growth from spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* at refrigeration temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62: 2664-8.
11. Sánchez-Pineda MT. Procesos de conservación poscosecha de productos vegetales. Madrid: AMV Ediciones; 2004.
12. Calvo M, Carazo M, Arias ML, Chaves C, Monge R, Chinchilla M. Prevalencia de Cyclospora sp., Cryptosporidium sp., microsporidos y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica. *Arch Latinoamer Nutr.* 2004;54:428-32.
13. Mosupye F, Von Holy A. Microbiological quality and safety of ready-to-eat street-vended foods in Johannesburg, South Africa. *J Food Prot.* 1999;62:1278-84.
14. López L, Romero J, Duarte F. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pretragados expeditos en Chile. *Arch Latinoamer Nutr* 2003;53:383-8.
15. Watada AE, Ko NP, Minott DA. Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharv Biol and Technol.* 1996;9:115-25.
16. Garg N, Churey J, Splitstoesser L. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *J Food Prot.* 1990; 70:1-3.
17. Hanashiro A, Matté G, Matté M, Torres E. Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of São Paulo city, Brazil. *Food Control* 2004;15:439-44.
18. Ken Ichi K, Hideki H, Yoshimitsu O, Junko K, Masahiko K, Koki T, Yasuo O, Masuo O. Bacterial contaminatin of ready to eat foods and fresh products in retail shops and factories. *J Food Prot.* 1999; 62:644-9.
19. Australian Capital Territory Health Protection Service. Microbiological and Chemical Quality of Dips (Food Survey Reports 1997-1998): 1-4.
20. Little C, Omotoye R, Mitchell R. The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices. *Int J Environ Health Res.* 2003;13:31-42.
21. Banerjee, M, Sarkar, P.K. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control* 2004;15:491-6.
22. Edema MO, Omemu AM, Bankole MO. Microbiological safety and quality of ready to eat foods in Nigeria. In: Book of Abstract of the 29th annual Conference and General Meeting, Abeokuta 2005. Nig Soc Microbiol 2005: p 17.

Recibido: 05-05-2010

Aceptado: 28-06-2010