

Interactions between *Escherichia coli* O157:H7 and food plants. Has this bacterium developed internalization mechanisms?

Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han Desarrollado Mecanismos de Internalización Bacteriana?

Vera Torres Armendáriz, Carlos Baudel Manjarrez Domínguez, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Campus 1. Av. Universidad S/N, Arboledas, Chihuahua, Chih. CP 31110, México; Carlos Horacio Acosta-Muñiz, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Cuauhtémoc. Av. Río Conchos S/N Parque Industrial. Cuauhtémoc, Chihuahua. CP 31570, México; Víctor Manuel Guerrero-Prieto, Rafael Ángel Parra-Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Campus Cuauhtémoc, Chih. Av. Presa de La Amistad 2015, Cuauhtémoc, Chih. CP 31510, México; Lorena Olivia Noriega Orozco, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Guaymas. Carr. Al Varadero Nacional Km 6.6 col. Las Playitas, Guaymas, Sonora. CP 85480, México; *Graciela Dolores Ávila-Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología. Periférico Francisco R. Almada Km 1, Chihuahua, Chih. CP 31453, México. *Correspondence author: gavilaq@gmail.com

Received: July 10th, 2015

Accepted: December 4th, 2015

Torres-Armendáriz V, Manjarrez-Domínguez CB, Acosta-Muñiz CH, Guerrero-Prieto VM, Parra-Quezada RA, Noriega-Orozco LO y Ávila-Quezada GD. 2016. Interactions between *Escherichia coli* O157:H7 and food plants. Has this bacterium developed internalization mechanisms? Revista Mexicana de Fitopatología 34: 64-83.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-4](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-4)

First DOI published: December 05, 2015.

Primera publicación DOI: 05 de Diciembre, 2015.

Abstract. Despite efforts to prevent microbial contamination, the occurrence of human pathogens in fresh fruit and vegetable is quite common. It is now known that *E. coli* O157:H7 can inhabit food plants passively. Here, we review the literature on phylloplane adhesion, survival and internalization of this bacterium, as well as some of the interaction mechanisms between it and the food plant, and other

Resumen. La presencia de bacterias patógenas en frutas y hortalizas es muy común a pesar de los grandes esfuerzos realizados para prevenir la contaminación microbiológica. En la actualidad, se sabe (o se conoce) que *E. coli* O157:H7 puede colonizar de forma pasiva plantas comestibles. Este trabajo presenta una revisión de literatura sobre *E. coli* y su adhesión al filoplano, supervivencia e internalización, así como mecanismos de interacción bacteria - planta. Una vez, que este patógeno, se adhiere a la superficie de la planta, puede introducirse al tejido, para después movilizarse y multiplicarse. Esta revisión ofrece una visión general de los mecanismos de interacción entre el tejido vegetal y *E. coli* O157:H7. Se considera que este patógeno ha mejorado su competencia ecológica en plantas comestibles, sin perder su virulencia para el ser hu-

associated microorganisms. This pathogen, once it has adhered to the surface of a food plant, can then enter the plant tissues, where it can migrate within them, and even multiply. This review provides an overview of the interaction mechanisms between the food plant tissues and *E. coli* O157:H7. It finds that this pathogen has improved its ecological competence in food plants without losing its virulence to humans. Also, a number of future research areas were identified.

Additional keywords: human pathogens on plants, bacteria adhesion and internalization, food safety.

Pathogens are found almost everywhere – in the air, in water and on all living and nonliving surfaces. Thus, the environments in which food products are produced, processed and transported can all cause cross-contamination. Some of the most common sources of microbial contamination of fresh produce are related to contaminated irrigation water (Cooley *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2013) and the use of improperly treated or contaminated manure (Fletcher *et al.*, 2013; Olaimat and Holley, 2012).

The chances of bacterial contamination of fruits is high, where water and nutrients are readily available to support bacterial growth. Plants and fruit surfaces usually carry static charge or have a micro-rough texture, both factors increase bacterial contamination by facilitating bacterial adhesion and establishment (Rivera *et al.*, 2009).

Escherichia coli (*E. coli*) represents a diverse group of bacteria. Pathogenic-*E. coli* strains are categorised into pathotypes based on their virulence factors. Six pathotypes are commonly associated with diarrhoea and collectively referred to as diarrhoeagenic-*E. coli*. For instance, Shiga toxin-producing-*E. coli* (STEC) is also referred as Verocytotoxin-producing-*E. coli* (VTEC) or enterohaemorrhagic-*E. coli* (EHEC). This

mano. Además, se identificaron áreas de oportunidad para futuros trabajos de investigación.

Palabras clave adicionales: patógenos de humanos en plantas, adhesión e internalización bacteriana, inocuidad.

Los patógenos se encuentran casi en cualquier lugar – aire, agua y sobre superficies vivas e inertes. De esta manera, el ambiente en el cual los alimentos se producen, procesan y transportan puede causar contaminación cruzada. Las fuentes más comunes de contaminación microbiológica en hortalizas frescas son el agua de riego contaminada (Cooley *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2013) y el uso de abono a base de estiércol no tratado adecuadamente (Fletcher *et al.*, 2013; Olaimat and Holley, 2012).

La posibilidad de contaminación bacteriana en frutas es elevada, ya que en su superficie se encuentra disponible agua y nutrientes; indispensables para su crecimiento. La superficie de plantas y frutas suelen presentar una carga estática o tienen una textura microrrugosa, incrementando ambos factores la posibilidad de contaminación bacteriana debido a que facilitan la adhesión y establecimiento de la bacteria (Rivera *et al.*, 2009).

Escherichia coli representa un grupo muy diverso de bacterias. Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en patotipos en función del factor de virulencia. Generalmente se asocian a diarrea seis patotipos, conocidos colectivamente como *E. coli* diarreogénica. Por ejemplo, la cepa *E. coli* que produce la toxina Shiga (STEC) también se conoce como *E. coli* productora de la enzima verotoxigénica (VTEC) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Este patotipo es uno de los más comúnmente asociados a brotes de origen alimentario.

E. coli O157:H7 es la cepa STEC más frecuentemente aislada en Norteamérica. También, es el

pathotype is one of the most commonly associated with foodborne outbreaks.

The pathogenic *E. coli* O157:H7 is the most commonly STEC isolated in North America. It is also the most often associated serotype to bloody diarrhoea and haemolytic uremic syndrome (HUS). It normally lives in the intestinal tract systems of animals (e.g. cattle) (Ferens and Hovde, 2011). It was first reported as a gastrointestinal pathogen in 1982 (Riley *et al.*, 1983). Since then, it has been recognized worldwide as a public health problem, causing diarrhea, haemorrhagic colitis and HUS (Wang *et al.*, 2013). The serotypes O26:H11, O111:NM and O104:H4 have recently been linked to human infections, but pathogenic *E. coli* O157:H7 has been associated with most of the major outbreaks (Bavaro, 2012, Tzschoppe *et al.*, 2012; Reineke *et al.*, 2015).

Since *E. coli* O157:H7 is ranked as an important pathogen due to the number and severity of the outbreaks it has caused, this review focuses on its ability to adhere to the phylloplane, to internalise and even to multiply in the tissues of food plants. It also proposes some potentially valuable lines for future research in this area.

CHARACTERISTICS AND PLANT-BACTERIUM COMMUNICATION

E. coli O157:H7 is a facultative Gram negative rod. Colourless colonies from 2-3 mm in diameter can be found when grown on sorbitol MacConkey agar (SMAC) or SMAC containing cefixime and tellurite (CT-SMAC). *E. coli* O157 is motile and possesses the flagellar antigen H7. VTEC O157 is probably the most highly infective *E. coli*; showing an infective dose of less than 15 cells (Teunis *et al.*, 2008). The infective dose for EPEC strains is 2.3×10^6 (Donnenberg *et al.*, 1998) and for Enterotoxigenic-*E. coli* (ETEC) is 10^9 (Freedman *et al.*, 1998).

serotipo más frecuentemente asociado a diarrea hemorrágica y al síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés). La bacteria normalmente vive en el sistema tracto intestinal de animales, particularmente en el ganado) (Ferens y Hovde, 2011). Esta bacteria fue reportada por primera vez como un patógeno gastrointestinal en 1982 (Riley *et al.*, 1983). Desde entonces, ha sido reconocida a nivel mundial como un problema de salud pública provocando diarrea, colitis hemorrágica y HUS (Wang *et al.*, 2013). Los serotipos O26:H11, O111:NM y O104:H4 recientemente han sido relacionado con infecciones en humanos, pero *E. coli* O157:H7 ha estado asociada a la mayoría de los grandes brotes (Bavaro, 2012, Tzschoppe *et al.*, 2012; Reineke *et al.*, 2015).

Puesto que *E. coli* O157: H7 está clasificada como un patógeno importante debido a la cantidad y severidad de los brotes a los que se le ha asociado, esta revisión se centra en su capacidad para adherirse al filoplano, interiorizar e incluso desarrrollarse en el tejido de las plantas. Además de proponer algunas líneas potenciales para futuras investigaciones en este campo.

CARACTERÍSTICAS Y COMUNICACIÓN PLANTA-BACTERIA

E. coli O157:H7 es un bacilo facultativo Gram negativo, presenta colonias hialinas de 2-3 mm de diámetro en agar MacConkey sorbitol (SMAC) o SMAC adicionado con cefixima y telurito (CT-SMAC). Es una bacteria móvil que posee un antígeno flagelar (H7). VTEC O157 es probablemente la *E. coli* más infecciosa; con una dosis infectiva de menos de 15 células (Teunis *et al.*, 2008). La dosis infectiva para las cepas enteropatogénica es 2.3×10^6 (Donnenberg *et al.*, 1998) y para la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es de 10^9 (Freedman *et al.*, 1998).

E. coli O157:H7 carries a number of virulence factors including a pathogenicity island, the locus of enterocyte effacement (LEE) that encodes gene regulators (Deng *et al.*, 2004), adhesin, intimin (Lai *et al.*, 2013), a type III secretion system (T3SS) (Kessler *et al.*, 2015), chaperones and several secreted proteins as the translocated intimin receptor Tir (Lai *et al.*, 2013).

It is well known that bacteria can communicate by chemical signals, to detect cell density and coordinate gene expression (Hughes and Sperandio, 2008). This process is called quorum sensing (QS). *E. coli* O157:H7 also may use QS signaling to communicate with plants, to regulate the expression of virulence and flagellar genes (Carey *et al.*, 2009).

Cell-to-cell signaling between this bacterium and its host, are regulated by acylhomoserine lactones (AHLs) (Hughes and Sperandio, 2008). In addition, AHLs are involved in biofilm formation and motility (Carey *et al.*, 2009).

BACTERIAL ATTACHMENT, ADHESION AND SURVIVAL ON PLANTS

The first step of a bacterial infection in a plant tissue is phylloplane adhesion. Although, the presence and survival of pathogenic bacteria on leaves or fruit can be influenced by surface roughness and trichomes, environment conditions are also key to modulating bacterial community structures (Wan-Ying *et al.*, 2015).

Environmental factors affecting bacterial behaviour and survival time on fresh produce are: temperature, pH, relative humidity and the presence of liquid water. These can be decisive for microbial activation and growth.

Additional factors relating to the ability of the bacteria to bind and proliferate in the plant are the motility on the phyllosphere, the pathogen's

La bacteria *E. coli* O157: H7 posee varios factores de virulencia como la isla de patogenicidad, el locus de eliminación del enterocito (LEE) que codifica genes reguladores (Deng *et al.*, 2004), adhesina, intimina (Lai *et al.*, 2013), un sistema de secreción de tipo III (SST3) (Kessler *et al.*, 2015), chaperones y varias proteínas secretadas como el receptor de intimina translocado Tir (Lai *et al.*, 2013).

Es conocido que las bacterias pueden comunicarse por medio de señales químicas para detectar la densidad celular y coordinar la expresión de genes (Hughes y Sperandio, 2008) Este proceso es conocido como detección del quórum (QS). *E. coli* O157:H7 utiliza las señales del QS para comunicarse con las plantas, y para regular la expresión de genes de virulencia y genes flagelares (Carey *et al.*, 2009).

Las señales célula-célula entre la bacteria y su hospedero, están reguladas por acilhomoserin lactonas (AHLs) (Hughes y Sperandio, 2008). Además, las AHLs están involucradas en la formación de biopelículas y en la movilidad (Carey *et al.*, 2009).

ADHESIÓN BACTERIANA Y SOBREVIVENCIA EN LAS PLANTAS

El primer paso para que ocurra una infección bacteriana en tejido vegetal es el contacto con el filoplano. La presencia y sobrevivencia de las bacterias en hojas o frutos puede ser influenciada por la rugosidad de la superficie y las tricomas, condiciones ambientales también son clave para la modulación de la estructura bacteriana (Wan-Ying *et al.*, 2015).

La temperatura, el pH, la humedad relativa y la presencia de agua líquida son factores ambientales que afectan el comportamiento y el tiempo de sobrevivencia de las bacterias en las plantas. Estos

ability to leach nutrients, and its interactions with other epiphytic (Aruscavage *et al.*, 2006) or phytopathogenic microorganisms. For example, Cooley *et al.* (2006) reported that *Wausteria paucula* can actively support and enhance the survival of *E. coli* O157:H7 in the rhizosphere and on the leaf-surface of lettuce. Similarly, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, can also support the survival of *E. coli* O157:H7 on lettuce (Aruscavage *et al.*, 2008).

The ability to attach to a plant surface is an important feature affecting bacterial establishment in plants. For instance, a study by Macarisin *et al.* (2012) showed that constituents of extracellular matrix such as curli and the polysaccharide cellulose can also be important for the attachment of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves.

According to Franz *et al.* (2007) and Xicohtencatl-Cortés *et al.* (2009), adhesion mechanisms suggest that *E. coli* uses several pathways to colonise food plants. The pathogen is well adapted to the biosphere and can reach the substomatal cavity and spongy mesophyll for survival. In a study by Prigent-Combaret *et al.* (2000), *E. coli* K-12 strains formed curli on coverslips. This enabled the bacteria to attach even to a clean glass surface.

To colonise host tissues, *E. coli* O157:H7 expresses intimin and other adhesins. Adhesins are a group of proteins involved in the attachment of *E. coli* to abiotic surfaces such as plastic or steel, and also the colonization of biological surfaces (McWilliams and Torres, 2014).

Moreover, these bacterial proteins located in the outer membrane, such as intimin and its translocated intimin receptor (Tir), are necessary for the adhesion between host cells and attaching and effacing (A/E) pathogens. Such A/E bacteria have an essential characteristic; the formation of an actin-rich pedestal for intimate attachment.

factores pueden ser decisivos para la activación microbiana y su crecimiento.

La movilidad en el filosfera, la capacidad del patógeno para lixiviar los nutrientes, y sus interacciones con otros microorganismos epifitos o fitopatógenos son factores adicionales relativos a la capacidad de las bacterias para unirse y proliferar en la planta (Aruscavage *et al.*, 2006). Por ejemplo, Cooley *et al.* (2006) reportaron que *Wausteria paucula* puede ayudar de forma activa a mejorar la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en la rizosfera y en la cutícula de la hoja de la lechuga. Del mismo modo, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, también sustenta a la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en la lechuga (Aruscavage *et al.*, 2008).

La capacidad de la bacteria para unirse a la superficie del tejido vegetal es una característica importante que influye en su establecimiento en la planta. Por ejemplo, un estudio realizado por Macarisin *et al.* (2012) mostró que los constituyentes de la matriz extracelular tales como la fimbria (curli) junto con la celulosa pueden ser importantes en la adhesión de *E. coli* O157:H7 a las hojas de espinaca.

De acuerdo a los mecanismos de adhesión de *E. coli*, Franz *et al.* (2007) y Xicohtencatl-Cortés *et al.* (2009), sugieren que la bacteria utiliza varias vías para colonizar a las plantas. La bacteria patógena se adapta bien a la biosfera y puede llegar a la cavidad subestomatal y al mesófilo esponjoso para sobrevivir. En un estudio realizado por Prigent-Combaret *et al.* (2000) la cepa *E. coli* K-12 formó curli sobre cubreobjetos; lo que permitió a la bacteria unirse a una superficie limpia e inerte (vidrio).

Para colonizar los tejidos del hospedante, *E. coli* O157:H7 expresa intimina y otras adhesinas. Las adhesinas son un grupo de proteínas involucradas en la unión de *E. coli* tanto a superficies abióticas (plástico y acero), como a superficies vivas (McWilliams y Torres, 2014).

Intimin is encoded by the *eaeA* gene, it is in the outer membrane, and is one of the most important virulence factor of *E. coli* strains. It is involved in the attachment process of *E. coli* O157:H7 and was considered the only colonization factor before other adhesins, such fimbrial and afimbrial were discovered (Farfan and Torres, 2012). Intimin is regulated by the locus LEE (Kendall *et al.*, 2007). The expression of intimin can be regulated to respond to external factors such as osmolarity and pH (Torres *et al.*, 2007). In a study carried out by Carey *et al.* (2009) in lettuce, the *eaeA* gene was down-regulated during the storage period at 15°C, as compared to at 4 °C.

The type III secretion system (T3SS) is a key virulence factor encoded on large plasmids. It is a complex nanomachine that allows bacteria to secrete effector proteins across eukaryotic membranes (Cornelis, 2006). EHEC O157:H7 colonizes the leaf surface via flagella and the T3SS (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009). Similarly, Shaw *et al.* (2008) documented that *E. coli* O157:H7 present the gene to encode T3SS for the adhesion to spinach and lettuce leaves, and also EspA filaments that allow the surface attachment of bacteria.

Once bacteria adhere to a plant surface, it begins a recognition process on the plant surface. In a study by Cooley *et al.* (2003), the inoculation of *E. coli* into the soil, showed the microbe's ability to migrate up the stem and along the surface of *Arabidopsis thaliana*. At the end of this experiment, the bacterium was able to be recovered from leaves and flowers. This indicates that *E. coli* can easily migrate along the whole surface plant under controlled conditions. However, some researchers suggest that pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7 can survive for short periods on the plant surface and may even move into the tissues (Erickson, 2012).

Continuous exposure to stress, may enable

Por otra parte, estas proteínas bacterianas localizadas en la membrana externa, como intimina y su receptor traslocado intimina (Tir), son necesarias para la adhesión entre la célula hospedera y *E. coli* para producir la lesión de “adhesión y borrado” (A/E). Estas bacterias A/E tienen una característica esencial; la formación de un pedestal rico en actina que le confiere la habilidad para mantener una estrecha unión. La intimina es codificada por el gen *eaeA*, de la membrana externa y es uno de los factores de virulencia más importante de *E. coli*. La intimina está implicada en el proceso de fijación de *E. coli* O157:H7 y por mucho tiempo fue considerada el único factor de colonización, antes de descubrir otras adhesinas como las fimbriales y afimbriales (Farfán y Torres, 2012). La intimina se regula por el locus LEE (Kendall *et al.*, 2007). Su expresión se puede regular con el fin de responder a factores externos como la osmolaridad y pH (Torres *et al.*, 2007). En un estudio realizado por Carey *et al.* (2009) en lechuga, la regulación del gen *eaeA* de *E. coli* O157:H7 se redujo durante el almacenamiento a 15 °C, en comparación con el almacenamiento a 4 °C.

El sistema de secreción tipo III (SST3) es un factor de virulencia clave codificado en plásmidos grandes. Es una compleja nanomaquinaria que les permite a las bacterias secretar proteínas efectoras a través de la membrana de las células eucariotas (Cornelis, 2006). Así, ECEH O157:H7 coloniza la superficie de la hoja mediante sus flagelos y el SST3 (Xicohtencatl-Cortés *et al.*, 2009). También, Shaw *et al.* (2008) documentó que *E. coli* O157:H7 presenta el gen que codifica para T3SS propiciando su adhesión en hojas de espinaca y lechuga, así como los filamentos EspA que le permiten a la bacteria unirse a la cutícula vegetal.

Una vez que las bacterias se adhieren a una planta, inicia un proceso de reconocimiento en la superficie de la misma. Un estudio realizado por Cooley

bacteria to survive under such conditions and may also enhance their tolerance to these conditions. Carey *et al.*, (2009) reported that *rpoS*, the gene encoding for sigma S an alternative signal factor for stress response; and *sodB* Superoxide encoding for iron superoxide dismutase B, were up-regulated at 4 °C and down-regulated after prolonged storage at 15 °C, when bacteria were inoculated into lettuce. Many genes are under *rpoS* control and are involved with stress factors, such as to pH, temperature, or oxidative stresses (Dodd and Aldsworth, 2002).

Ultra violet (UV) radiation is one of the major factors limiting bacterial survival in the phyllosphere. Nevertheless, *E. coli* possess the gene *rulAB* (resistance to UV radiation) (Brandl, 2006), which has been reported to confer DNA repair capabilities and increases UV tolerance (Feil *et al.*, 2005). Therefore, *E. coli* has the ability of withstand UV radiation.

On the other hand, biofilms are well-organised, structured communities of surface-associated cells enclosed in a polymer matrix that contains open water channels (Donlan and Costerton, 2002). Biofilms were first described in the late 1600s by Antonie van Leeuwenhoek (Donlan and Costerton, 2002). When Leeuwenhoek used acetic acid to destroy the dental plaque on his dentures; he noticed that only the free-swimming cells were killed. Till recently (c. 30 y ago), these early findings of microbial communities has been largely ignored, giving more attention to the bacteria itself.

Pathogens in biofilms live in a self-produced matrix. This matrix, integrated by polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids (Flemming and Wingender, 2010) allows bacteria to withstand long periods on plant surfaces and to be highly resistant to antimicrobial agents. Biofilm, by its nature, can be a source of secondary contamination which can shelter human pathogens, plant pathogens and symbionts. Thus, biofilm is a basic component of

et al. (2003), demostró la capacidad de *E. coli* para migrar desde el suelo inoculado con el patógeno hacia el tallo y superficies de *Arabidopsis thaliana*. En este experimento, después de un tiempo la bacteria pudo ser aislada de hojas y flores. Esto indica que la bacteria puede moverse con facilidad en toda la superficie de la planta bajo condiciones controladas. Sin embargo, algunos investigadores sugieren que bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir por períodos cortos de tiempo en la superficie de la planta y podría pasar al tejido (Erickson, 2012).

La exposición a condiciones de estrés permite a las bacterias sobrevivir bajo estas condiciones, e incluso mejorar su tolerancia. Carey *et al.*, (2009) reportó que *rpoS*, que codifica para el factor sigma S relacionado con la respuesta al estrés en la fase estacionaria; y *sodB* (gen que codifica para la superóxido dismutasa B) fueron regulados positivamente a 4 °C y negativamente después de almacenamiento prolongado a 15 °C, cuando las bacterias se inocularon en lechuga. Muchos genes son controlados por *rpoS* y están relacionados con la resistencia a factores de estrés, tales como el pH, la temperatura o estrés oxidativo (Dodd y Aldsworth, 2002).

La radiación ultravioleta (UV) es uno de los principales factores que limitan la sobrevivencia de la bacteria en la filósfera. No obstante, *E. coli* posee el gen *rulAB* que le confiere resistencia a la radiación UV (Brandl, 2006), el cual confiere a la bacteria la capacidad para reparar DNA y para aumentar su tolerancia a los rayos UV (Feil *et al.*, 2005). Por lo tanto, *E. coli* tiene la capacidad de soportar la radiación UV.

Por otra parte, las biopelículas son comunidades bien estructuradas y organizados de células asociadas a la superficie dentro de una matriz de polímeros que contiene canales de agua abiertos (Donlan y Costerton, 2002). Las biopelículas fueron descri-

many plant-microbe interactions.

E. coli has several mechanisms related to adhesion that allows it to attach to surfaces, which are well documented. However, much is still unknown about the pathogen's signaling and recognition mechanisms that allow it to establish and survive in non-host organisms. Further, it remains unclear how it can attach to abiotic surfaces such as steel, glass and polystyrene.

INTERACTION AND INTERNALIZATION IN PLANTS

Saldaña *et al.* (2011) reported that *E. coli* O157:H7 uses a specific T3SS effector to open the stomatal guard cells of spinach leaves. This action allows internalization of the bacterium in plant tissues.

Other studies have demonstrated that *E. coli* O157:H7 can internalize within the seeds and roots, and then migrate to other tissues (Ávila-Quezada *et al.*, 2010). The movement can be upwards from the roots to the lettuce foliage, as was shown in an experiment carried out by Solomon *et al.* (2002). In this experiment, the soil contained contaminated manure, and after two days, the bacterium was isolated from the edible lettuce leaf tissue.

The introduction of this human pathogen at early stages of plant development has been documented by Jablasone *et al.* (2005). They reported that *E. coli* O157:H7 was internalized in seedlings. They also suggested that this bacterium preferentially colonizes the root junctions. Since root junctions are sites that release exudates, they are potential gateway to start the bacteria internalization process. Lugtenberg *et al.* (2001) suggested that bacterial cell may have greater access to nutrients at root junctions, than those located more distantly, and therefore, when bacteria persist on plants, these facilitate internalization in developing seedlings.

tas por primera vez a finales de 1600 por Anton van Leeuwenhoek (Donlan y Costerton, 2002). Cuando Leeuwenhoek utilizó ácido acético para destruir la placa dental en su dentadura, observó que sólo murieron las bacterias que se movían libremente. Hasta hace relativamente poco tiempo (últimos 30 años) se le prestó mayor importancia a aquellos primeros hallazgos sobre comunidades bacterianas que habían sido ignorados, poniendo mayor atención a las propias bacterias.

En una biopelícula, los patógenos viven dentro de una matriz autoproducida. Esta matriz formada por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Flemming y Wingender, 2010) permite que las bacterias resistan durante períodos prolongados en la superficie de plantas, y les confiere una alta resistencia a agentes antimicrobianos. Las biopelículas por su naturaleza, pueden ser una fuente de contaminación secundaria, la cual puede albergar bacterias patógenas a plantas, a humanos así como simbioses. Por lo tanto, las biopelículas son un componente básico para muchas interacciones planta-microorganismo.

E. coli presenta mecanismos bien documentados relacionados con la adhesión que le permiten unirse a las superficies. Sin embargo, aún hay mucho por estudiar acerca de los mecanismos de señalización y reconocimiento que le permiten al patógeno establecerse y sobrevivir en organismos no hospedantes. Además, aún no está claro cómo este patógeno logra adherirse a superficies abióticas como el acero, vidrio y poliestireno.

INTERACCIÓN E INTERNALIZACIÓN EN PLANTAS

Saldaña *et al.* (2011) reportan que *E. coli* O157:H7 utiliza el sistema de secreción tipo III, efector específico T3SS, para abrir las células guarda de los estomas de hojas de espinaca. Esta acción

Several studies have shown that *E. coli* O157:H7 is able to enter by natural openings in the plant surface, such as the sub-stomatal cavities in leaves (Brandl, 2008; Erickson, 2012; Kroupitski *et al.*, 2009). Once the bacteria are inside the plant, following closure of the guard cells, they are protected from most superficial sanitisers (Gomes *et al.*, 2009). Hence, special health risks are created when a human pathogen is able to enter the plant tissues (Deering *et al.*, 2012; Warriner *et al.*, 2003 a, b), since it is protected from washing and from many industrial sanitisers (Burnett and Beuchat, 2000).

Bacteria are usually found in low numbers on food plants but, under the right conditions, in a few hours a small number of bacteria cells can multiply to hundreds of thousands (Haas *et al.*, 2014). For instance, the population of *E. coli* O157:H7 increased exponentially after inoculation into apple fruit tissue, where an inoculum of 2.5×10^2 CFU/wound, increased 3 log units during the first 48 h following inoculation (Janisiewicz *et al.*, 1999).

Although *E. coli* O157:H7 has been found to internalize in many different plants, sometimes the bacteria do not succeed in becoming internalized. Host chemical properties, such as acidity, and oil, sugar and water contents, are relevant to the colonization and survival of such microorganisms. Nevertheless, high acidity in some fresh produce, does not necessarily affect the survival of pathogenic bacteria. Also, there are factors such as the strain or serovar of bacteria, the route of contamination, weather conditions, type of surface and the age of the plant, that together influence the probability of internalization of a human pathogenic bacterium within a plant.

ADAPTATION TO NEW ENVIRONMENTS

It has been proposed that genes of *Archaea*

permite la internalización de la bacteria al tejido vegetal.

Otros estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 puede internarse dentro de las semillas y raíces, y luego migrar a otros tejidos (Ávila-Quezada *et al.*, 2010). El movimiento puede ser desde las raíces hacia el follaje, como se demostró en un experimento realizado por Solomon *et al.* (2002) en lechuga. En este experimento el suelo contenía estiércol contaminado y después de dos días, la bacteria pudo ser aislada del tejido foliar de la lechuga.

La introducción de este patógeno humano en las primeras etapas de desarrollo de la planta ha sido documentado por Jablason *et al.* (2005). En este trabajo *E. coli* O157:H7 logró internarse en las plántulas. Los autores reportaron que la bacteria coloniza preferentemente las uniones de la raíz. Puesto que las uniones de raíz son sitios que liberan exudados, se convierten en posibles puertas para que las bacterias inicien el proceso de internalización. Lugtenberg *et al.* (2001) sugiere que en las zonas de unión en la raíz, las bacterias pueden tener más acceso a los nutrientes que otros sitios, y por lo tanto cuando las bacterias se mantienen por un largo periodo sobre las plantas, las posibilidades de ingresar a la plántula en desarrollo incrementan.

Muchos estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 es capaz de entrar por las aberturas naturales en la epidermis de la planta, tales como las cavidades sub-estomatales de las hojas (Brandl, 2008; Erickson, 2012; Kroupitski *et al.*, 2009). Una vez que las bacterias se encuentran dentro de la planta, y las células de guarda se cierran, las bacterias quedan protegidas de la mayoría de los sanitizantes superficiales (Gomes *et al.*, 2009). Por lo tanto, mientras un patógeno posee la capacidad de entrar en los tejidos vegetales, los riesgos a la salud humana están latentes (Deering *et al.*, 2012; Warriner *et al.*, 2003a, b) puesto que el patógeno está protegido del proceso de lavado y de muchos desinfectantes industriales (Burnett and Beuchat, 2000).

species are present in the genome of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 (Faguy, 2003) which may confer a range of capabilities for adaptation to new environments. Genes of the core genome such as the metabolic genes can be transferred and can improve fitness of the strain under certain environmental conditions. For instance, a few strains of *E. coli* can ferment glucose and the acquisition of these genes can improve its adaptation to a new environment (van-Overbeek *et al.*, 2014).

A study by Szmolka and Nagy (2013) suggested that human pathogens may also acquire genes from other plant-associated bacterial species. This situation leads to new phenotypes of increased persistence in plants and broadens the utilization spectra of nutrients available on plants (van-Overbeek *et al.*, 2014). The appearance of these new features, which are encrypted in the genome of the bacterium, help to improve its fitness in a food plant.

OUTBREAKS

Once *E. coli* O157:H7 has been established in fruits or vegetables, it does not lose its capacity for virulence to humans. This is proven by all the incidents linked to this pathogen and associated with the consumption of contaminated fruits and vegetables (Mukhopadhyay *et al.*, 2014). This bacterium was first recognized as a human pathogen in 1982, it was linked with meat products. Over the next ten years, however, a range of food-produce associated outbreaks occurred (Rangel *et al.*, 2005).

Outbreaks caused by *E. coli* O157:H7 are more common in the western hemisphere, but are certainly not confined to this part of the world, since one of the most notable cases was in Asia in 1996 (Michino *et al.*, 1999). Here, the outbreak was caused by white radish consumption in Sakai City, Osaka, Japan,

Las bacterias se encuentran generalmente en baja concentración en las hortalizas, pero, bajo las condiciones adecuadas, en pocas horas el número de células bacterianas puede multiplicarse a cientos de miles (Haas *et al.*, 2014). Por ejemplo, la población de *E. coli* O157:H7 incrementó exponencialmente después de su inoculación en tejido de manzanas, donde el inóculo de 2.5×10^2 UFC/herida, aumentó tres log en las primeras 48 horas después de la inoculación (Janisiewicz *et al.*, 1999).

Aunque se ha encontrado que *E. coli* O157:H7 puede internarse en diversas plantas, algunas veces la bacteria no tienen éxito al tratar de ingresar. Las propiedades químicas del hospedante, tales como la acidez y el contenido de aceite, azúcares y agua, son condicionantes para la colonización y la sobrevivencia de los microorganismos. Sin embargo, la acidez de algunas frutas y hortalizas frescas, no necesariamente afecta la sobrevivencia de las bacterias patógenas. También existen factores como el tipo de cepa o serotipo bacteriano, la ruta de contaminación, condiciones climáticas, el tipo de superficie y la edad de la planta, que en conjunto influyen en la probabilidad de internalización de los patógenos en la planta.

ADAPTACIÓN A UN NUEVO ENTORNO

Se ha descrito que los genes de especies *Archaea* están presentes en el genoma de *E. coli* O157:H7 cepa EDL933 (Faguy, 2003), los cuales pueden conferir a la bacteria gran variedad de capacidades de adaptación a nuevos ambientes. Los genes nucleares como son los genes metabólicos pueden ser transferidos y mejorar la condición de la cepa bajo ciertas condiciones ambientales. Por ejemplo, pocas cepas de *E. coli* tiene la capacidad de fermentar glucosa, y la adquisición de estos genes puede mejorar la adaptación a nuevos ambiente (van-Overbeek *et al.*, 2014).

where more than 6000 schoolchildren were affected (Watanabe *et al.*, 1996). Approximately 1000 of them were hospitalised with severe gastrointestinal symptoms, and about 100 had complications of HUS (haemolytic uraemic syndrome), which resulted in three deaths.

Many outbreaks have been reported in the United States (US), Canada and Great Britain. Fresh-produce associated outbreaks in the US are now one of the main vehicles linked to *E. coli* O157:H7, and represent 34 % of all foodborne outbreaks (Rangel *et al.*, 2005).

A multi-state outbreak caused by packaged spinach occurred in 2006. It affected people of 26 States in the US and resulted in 183 confirmed infections and three deaths (Center for Disease Control and Prevention, 2006). The same year, epidemiological studies detected EHEC in spinach (Center for Disease Control and Prevention, 2006).

More recently, the Center for Disease Control and Prevention (2014) reported a four State outbreak of *E. coli* STEC O157:H7 infections linked to ready-to-eat salads, where 33 persons were infected, no deaths were reported. Therefore, in the past 25 years many outbreaks have been associated with the presence of this pathogen on the surface or internalized in food plants and fruits. Based on the above, it is reasonable to ask if this human pathogen has always possessed such an intrinsic ability to extend its life in the environment (soil, water, plant) without losing its human pathogenicity, or has this capacity been developed more recently?

SOURCES OF CONTAMINATION

Reports identify manure as the major source of contamination in the field, followed by untreated irrigation water (Aruscavage *et al.*, 2006; Castro-Ibáñez *et al.*, 2015; Ceuppens *et al.*, 2015; de

Un estudio realizado por Szmolka y Nagy (2013) sugiere que los patógenos de humanos pueden adquirir genes de otras especies bacterianas asociadas a plantas. Esta situación permite a nuevos fenotipos incrementar su persistencia en plantas y amplía el espectro de utilización de nutrientes disponibles en las plantas (van-Overbeek *et al.*, 2014). La aparición de nuevas características encriptadas en el genoma bacteriano, le ayudan a mejorar su condición física cuando se encuentran en frutas y hortalizas.

BROTOS

Cuando *E. coli* O157:H7 se establece sobre frutas u hortalizas, no pierde su capacidad de ser virulenta a humanos. Esto se demuestra por todos los incidentes de este patógeno, asociados con el consumo de frutas y hortalizas contaminadas (Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Esta bacteria fue reconocida por primera vez como un patógeno humano en 1982, asociada con productos cárnicos. Pero, en los siguientes diez años, ocurrieron casos asociados a una gran variedad de productos comestibles (Rangel *et al.*, 2005).

Los brotes causadas por *E. coli* O157:H7 son más comunes en el hemisferio occidental, pero sin duda no se limitan a esta parte del mundo, ya que uno de los casos más notables se produjo en Asia en 1996 (Michino *et al.*, 1999). Este brote fue provocado por el consumo de rábano blanco en la ciudad de Sakai, Osaka, Japón, donde se vieron afectados más de 6000 niños en edad escolar (Watanabe *et al.*, 1996). Aproximadamente 1000 de ellos fueron hospitalizados con síntomas gastrointestinales graves, y alrededor de 100 presentaron complicaciones de HUS (síndrome urémico hemolítico), lo que lamentablemente resultó en tres muertes.

Muchos brotes epidemiológicos se han registrado en Estados Unidos, Canadá e Inglaterra. En Estados Unidos son las frutas y hortalizas frescas

Quadros *et al.*, 2014; Erickson *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012). Manure used as organic fertilizer can significantly increase total coliform contamination as well as increasing the presence of *E. coli* (de Quadros *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2006). Pathogens such as *E. coli* (VTEC) O157:H7 and pathotypes of diarrhoeagenic *E. coli* are transmitted through water and organic fertilisers (Oliveira *et al.*, 2012).

Several studies have pointed to flies (Talley *et al.*, 2009), arthropods, birds, wild mammals and reptiles (Wright *et al.*, 2013) as other major sources of pathogen transmission. It has been shown that if fresh produce is grown near livestock, these vectors can easily carry faecal contaminants to plants (Doyle and Erickson, 2012; Fletcher *et al.*, 2013; Wasala *et al.*, 2013). Also, flies can pick up *E. coli* O157:H7 from manure and deposit it onto the phylloplane of plants, where the bacteria can then colonise and multiply (Talley *et al.*, 2009). Despite such reports, the dissemination of this bacterium by flies to fresh produce requires further investigation, for it would seem to conflict with reports suggesting that *E. coli* O157:H7 can survive for only two to four days on a leaf surface (Wasala *et al.*, 2013). Other studies report that this pathogen can survive on the phylloplane of spinach leaves for 14 days (Mitra *et al.*, 2009). These authors also claim that leaf surface bacterial colonization can increase over time. Meanwhile, Wasala *et al.* (2013) suggest that leaf surface colonization, by the strain ATCC4388, does not increase when exposure time increases (vegetal tissue-bacteria).

On the other hand, it has been reported that the survival of *E. coli* O157:H7 in soil is inversely related to the microbial community diversity already present. Hence bacteria levels can greatly vary over time in such habitats (van Elsas *et al.*, 2011).

Many faecal contamination studies have

el principal vehículo asociado a *E. coli* O157:H7, y representan el 34 % de todos los brotes de origen alimentario (Rangel *et al.*, 2005).

Un brote multiestatal asociado a espinaca se produjo en el 2006. Este, afectó a personas de 26 estados de Estados Unidos con 183 casos confirmados y tres muertes (Center for Disease Control and Prevention, 2006). El mismo año, estudios epidemiológicos detectaron EHEC en espinacas (Center for Disease Control and Prevention, 2006).

Recientemente el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos (2014) reportó un brote de *E. coli* STEC O157:H7 en 33 personas de cuatro estados, y asociado con el consumo de ensaladas “listas para consumo” (RTE). En los últimos 25 años muchos brotes se han ligado a la presencia de este patógeno en la superficie o internalizado en hortalizas y frutas. Por lo anterior, es importante preguntarse si esta bacteria patógena de siempre ha tenido la capacidad intrínseca para extender su vida en el medioambiente (suelo, agua, planta) sin perder su patogenicidad hacia el humano, o si esta capacidad ha sido desarrollada recientemente?

FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Muchos trabajos de investigación identifican al abono a base de estiércol como la principal fuente de contaminación en el campo, seguido por agua de riego no tratada (Aruscavage *et al.*, 2006; Castro-Ibáñez *et al.*, 2015; Ceuppens *et al.*, 2015; de Quadros *et al.*, 2014; Erickson *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012). El estiércol utilizado como abono orgánico puede aumentar significativamente los niveles de coliformes totales, así como de *E. coli* (de Quadros *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2006). También Oliveira *et al.* (2012) reportaron que patógenos como *E. coli* (VTEC) O157:H7 y patotipos de *E. coli* diarreogénicos se transmiten a través fertilizantes orgánicos y agua.

been carried out around the world. For example, recent work in South America has recorded the microbiological quality of fruits and leaf vegetables. In Venezuela pre- and post-harvest, strawberries, guavas and peaches were apparently within the permissible limits for sanitary quality (Gil *et al.*, 2011). While in Brazil faecal coliforms were detected in lettuce, but no *E. coli* O157 was found in this study of 36 samples (de Quadros *et al.*, 2014).

Studies in Mexico have shown that plant products are usually free of *E. coli*. The sampling included chipotle pepper (Ávila-Quezada *et al.*, 2009), Starkimson apple, Golden Delicious apple, peach, California pepper, jalapeño pepper, Serrano pepper, saladette tomatoes, grape tomatoes and cantaloupe (Ávila-Quezada *et al.*, 2008), and habanero pepper (Lugo-Jiménez *et al.*, 2010). Moreover, Rivera *et al.* (2009) reported the presence of faecal coliforms in parsley, lettuce and radish in 36.8 % of the samples analyzed. Of these samples, 24 % were positive for *E. coli*. Muñoz *et al.* (2013) assessed faecal contamination in cabbage, lettuce and spinach, vegetables which are commonly involved in *E. coli* outbreaks. They found that cabbage and spinach were the most contaminated vegetables, and these often exceeded the regulatory limits for faecal coliforms.

The presence of faecal coliforms, without the identification of *E. coli*, suggests this indicator is not always carrying this bacterium, or not been detected due to its ability to enter in a dormant state (van Elsas *et al.*, 2011). Strictly, vegetables not eaten raw, should not be part of this pathogen's transmission route; nevertheless, hand-to-mouth transfer during handling and food preparation is still possible. It is commonly thought, pathogens are removed by washing but it has been shown that significant numbers may remain after conventional washing and so can persist on fresh produce (Ginestrea *et al.*, 2005). Hence it is recommended,

Por otra parte, muchos estudios han encontrado que las moscas (Talley *et al.*, 2009), artrópodos, aves, mamíferos silvestres y reptiles (Wright *et al.*, 2013) son otras fuentes importantes de transmisión de patógenos. Se ha demostrado que si las hortalizas se cultivan cerca de ganado, estos vectores pueden acarrear la contaminación fecal a las plantas (Doyle y Erickson, 2012; Fletcher *et al.*, 2013; Wasala *et al.*, 2013). Además, las moscas pueden recoger *E. coli* O157:H7 del estiércol y depositarla en el filoplano de las plantas, donde puede posteriormente colonizar el tejido y multiplicarse (Talley *et al.*, 2009). A pesar de estos resultados, la diseminación de la bacteria por medio de las moscas requiere más investigación, debido a que otros autores reportan que *E. coli* O157:H7 solo puede sobrevivir de dos a cuatro días en la superficie de una hoja (Wasala *et al.*, 2013). Otros estudios reportan que este patógeno puede sobrevivir en el filoplano de hojas de espinaca durante 14 días (Mitra *et al.*, 2009). Estos autores afirman que la posibilidad de colonización bacteriana en la superficie de la hoja puede aumentar con el tiempo de exposición. Mientras que Wasala *et al.* (2013) sugieren que la probabilidad de colonización de la hoja, por la cepa ATCC4388, no se ve incrementada al aumentar el tiempo de exposición (tejido vegetal - bacteria).

Por otra parte, se ha documentado que la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 inoculada en el suelo mostró una relación inversa con la diversidad de la comunidad microbiana ya presente. Por lo tanto, la concentración de la bacteria puede variar mucho en el tiempo en este tipo de hábitat (van Elsas *et al.*, 2011).

Muchos estudios de contaminación fecal se han realizado en todo el mundo. Por ejemplo, estudios recientes en Sudamérica han registrado la calidad microbiológica de frutas y hortalizas. En un estudio en Venezuela, las fresas, guayabas y duraznos en pre y postcosecha se encontraron aparentemente dentro de los límites permisibles de calidad sani-

that harvest and handling procedures be examined throughout the supply chain (Berger *et al.*, 2010).

For food handlers, the most recurrent deficiency in sanitary practice is the lack of adequate hand-washing (Ávila-Quezada *et al.*, 2009). Furthermore, the efficacy of many disinfectants for destroying microorganisms has come into question in recent years, so their frequent use does not necessarily constitute safe practice.

When a vegetable is exposed to bacteria, they tend to stick to the surface. However, firm attachment usually takes a few hours. Only then, does attachment becomes sufficiently strong to resist conventional washing, rendering their removal more difficult. The situation can be aggravated by persistent wetness, as this allows polymer synthesis and hence biofilm formation (Avila-Quezada *et al.*, 2010; Flemming and Wingender, 2010).

PREVENTION EFFORTS

As we have seen, the presence of *E. coli* O157:H7 in a food practically guarantees a disease outbreak. It is generally true that effective actions designed to prevent pathogen entry to fruits and vegetables, are more desirable than actions designed to remove or inactivate them. Thus, methods used to ensure food safety should be based on the adoption of Good Agricultural Practices (GAP), Good Manufacturing Practices (GMP), and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP). Nevertheless, even these do not absolutely eliminate pathogen contamination.

Throughout the world, most cases of enteric disease are attributable to the consumption of contaminated food. However, the sources are not always properly identified, so often remain as mere, overstated assumptions. This is probably done by authorities to minimize public alarm. The fact that an outbreak linked to fruit or plant product

taria (Gil *et al.*, 2011). Mientras que en un estudio en Brasil con 36 muestras de lechuga se detectaron coliformes fecales, aunque no se detectó *E. coli* O157:H7 (de Quadros *et al.*, 2014).

Estudios realizados en México han demostrado que los productos vegetales están comúnmente libres de *E. coli*. Estos estudios incluyeron chile chipotle (Ávila-Quezada *et al.*, 2009), manzana Starkinson, manzana Golden Delicious, durazno, pimiento California, chile jalapeño, chile serrano, tomate saladette, tomates y melón (Ávila-Quezada *et al.*, 2008), y el chile habanero (Lugo-Jiménez *et al.*, 2010).

Por otra parte, Rivera *et al.* (2009) reportaron la presencia de coliformes fecales en perejil, lechuga y rábano en el 36.8 % de las muestras analizadas. De estas muestras, el 24 % fueron positivos para *E. coli*. Muñoz *et al.* (2013) evaluaron la contaminación fecal en repollo, lechuga y espinacas, hortalizas que habitualmente están relacionadas con los brotes de *E. coli*. Los autores encontraron que la col y la espinaca son las hortalizas más contaminadas, y estas a menudo exceden los límites reglamentarios para coliformes fecales.

La presencia de coliformes fecales, sin detectar a *E. coli* en la misma muestra, sugiere que este indicador no siempre incluye a la bacteria, o no ha sido detectada debido a su capacidad para entrar a un estado latente (van Elsas *et al.*, 2011). Definitivamente, las hortalizas que no se consumen crudas, no deberían ser parte de la ruta de transmisión de este patógeno; sin embargo, la transferencia de la mano a la boca durante la manipulación y preparación de alimentos, es una posibilidad. Generalmente se piensa que los patógenos se eliminan mediante el proceso de lavado, pero se ha demostrado que un número significativo de bacterias pueden permanecer y persistir en frutas y hortalizas después de un lavado convencional (Ginestrea *et al.*, 2005). Por lo tanto se recomienda analizar los procesos de co-

occurs indicates that the outbreak is the result of an occasional contamination event, which can be very difficult to identify if proper records are not available for traceability.

A number of antimicrobial treatments have been tried to control *E. coli* O157:H7 but, significant reductions in bacterial contamination of vegetables can be very difficult to achieve.

FUTURE RESEARCH

A number of interesting questions arise from the above. These include: How are the bacterial effectors delivered to the inside of the non-host plant cells? What is the nature of the communication pathway between the microbe and the plant cell? How does protein regulation induce signaling and recognition?

Future work will address these questions through biological systems studies using postgenomic. This approach should allow understanding of gene and protein expression during recognition and internalization of *E. coli* in food plants. A better understanding of the interaction of this human pathogen with food plants is expected to provide important new scientific information, useful for developing new and improved strategies for minimising consumer risk.

LITERATURE CITED

- Aruscavage D, Lee K, Miller S and LeJeune JT. 2006. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of Food Science* 71:89-99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00157.x>
- Aruscavage D, Miller SA, Lewis IML, Lee KEN and LeJeune JT. 2008. Survival and dissemination of *Escherichia coli* O157: H7 on physically and biologically damaged lettuce plants. *Journal of Food Protection* 71:2384-2388. http://www.oardc.ohio-state.edu/sallymiller/images/Food_Safety-Aruscavage_2008.pdf
- Ávila-Quezada GD, Islas-Valenzuela CI, Muñoz-Márquez E and Sánchez-Chávez E. 2009. Physical and microbiological

secha y en general el manejo en toda la cadena de producción (Berger *et al.*, 2010).

La deficiencia más recurrente de las personas que manipulan los alimentos es la falta de un adecuado lavado de manos (Ávila-Quezada *et al.*, 2009). Por otra parte, la eficacia de muchos desinfectantes para destruir microorganismos ha sido cuestionada en los últimos años, por lo que su uso frecuente no necesariamente constituye una práctica segura.

Cuando una hortaliza está expuesta a bacterias, éstas tienden a unirse a la superficie de la hortaliza. Una adhesión firme generalmente toma un par de horas. Sólo entonces, la adhesión se vuelve lo suficientemente fuerte como para resistir el lavado convencional, haciendo que su remoción sea mucho más difícil. La situación puede agravarse si la humedad persiste, ya que esta condición permite la síntesis de polímeros y por lo tanto la formación de biopelículas (Ávila-Quezada *et al.*, 2010; Fleming y Wingender, 2010).

ESFUERZOS DE PREVENCIÓN

Como ya se ha abordado, la presencia de *E. coli* O157:H7 en un alimento, prácticamente garantiza un brote de enfermedad. Las acciones diseñadas para prevenir la presencia de los patógenos en las frutas y hortalizas son más deseables que las acciones diseñadas para eliminar o inactivar a los patógenos. Por lo tanto, los métodos utilizados para garantizar la seguridad alimentaria deben basarse en la adopción de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manejo (BPM) y en un Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP). Incluso estas prácticas pueden no eliminar totalmente la contaminación microbiológica.

A nivel mundial, la mayoría de los casos de enfermedades entéricas se atribuyen al consumo de alimentos contaminados. Las fuentes de contami-

- contamination of the smoked “Chipotle” pepper during dehydration. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:225-231. <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/32-3/7a.pdf>
- Ávila-Quezada GD, Sánchez E, Gardea-Béjar AA and Acedo-Félix E. 2010. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*: survival and growth in plant tissue. *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science* 38:47-55. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671003767834>
- Ávila-Quezada GD, Sánchez E, Muñoz E, Martínez LR y Villalobos E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 77:129-136. <http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol77/AVILA-QUE.pdf>
- Bavaro MF. 2012. *E. coli* O157: H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution. *Current Gastroenterology Reports* 14:317-323. <http://dx.doi.org/10.1007/s11894-012-0264-6>
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P and Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12:2385-2397. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- Brandl MT. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology* 44:367-392. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143359>
- Brandl MT. 2008. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Applied Environmental Microbiology* 74:5285-5289. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01073-08>
- Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ and Kjelleberg S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied Environmental Microbiology* 72:3916-3923. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03022-05>
- Burnett SL and Beuchat LR. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25:281-287. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000106>
- Burnett SL, Chen J and Beuchat LR. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4679-4687. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.11.4679-4687.2000>
- Carey CM, Kostrzynska M and Thompson S. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression on romaine lettuce using comparative real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 77:235-242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.02.010>
- Castro-Ibáñez I, Gil MI, Tudela JA, Ivanek R and Allende A. 2015. Assessment of microbial risk factors and impact of meteorological conditions during production
- nación no siempre se identifican adecuadamente, por lo que a menudo permanecen como simples suposiciones. Algunas veces presuntamente declaradas por autoridades para minimizar una alarma pública. El hecho de que ocurra un brote vinculado al consumo de frutas o productos vegetales, indica que el brote es el resultado de un evento de contaminación ocasional, y puede ser muy difícil identificar su origen si no se cuenta con los registros adecuados que apoyen su rastreabilidad.
- Un gran número de tratamientos antimicrobianos se han probado para controlar *E. coli* O157:H7 pero, es muy difícil lograr una reducción significativa de la contaminación bacteriana en hortalizas.

FUTUROSTRABAJOSDEINVESTIGACION

Una serie de preguntas interesantes surgen de lo antes expuesto. Estas preguntas son: ¿Cómo los efectores bacterianos son entregados al interior de las células vegetales no hospedantes?—¿Cuál es la naturaleza de la ruta de comunicación entre el microorganismo patógeno y la célula vegetal? ¿De qué manera la regulación de proteínas induce la señalización y el reconocimiento?

Trabajos futuros abordarán estas preguntas con estudios de los sistemas biológicos por medio de postgenómica. Este enfoque permitiría entender la expresión genética y proteica durante el reconocimiento y la internalización de *E. coli* en las hortalizas. Una mejor comprensión de la interacción de este patógeno humano con las plantas generará información científica útil para el desarrollo de estrategias eficaces para minimizar el riesgo a la salud de consumidor.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~



- of baby spinach in the southeast of Spain. *Food Microbiology* 49:173-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.004>
- Center for Disease Control and Prevention. 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach – United States, September 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 55:1045-1046. <http://dx.doi.org/10.1037/e550322006-004>
- Center for Disease Control and Prevention. 2014. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ready-to-Eat Salads (Final Update). [http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html?s\\_cid=cs\\_002](http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html?s_cid=cs_002)
- Ceuppens S, Johannessen GS, Allende A, Tondo EC, El-Tahan F, Sampers I, Jacxsens L and Uyttendaele M. 2015. Risk factors for *Salmonella*, shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* occurrence in primary production of leafy greens and strawberries. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12:9809-9831. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph120809809>
- Cooley MB, Chao D and Mandrell RE. 2006. *Escherichia coli* O157: H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection* 69:2329-2335. <http://naldc.nal.usda.gov/download/22497/PDF>
- Cooley MB, Chao D and Mandrell RE. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce; environmental investigations in the Salinas region of pre-harvest contamination. *Phytopathology* 97:S138. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2007.97.7.S131>
- Cooley MB, Miller WG and Mandrell RE. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied Environmental Microbiology* 69:4915-4926. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.8.4915-4926.2003>
- Cornelis GR. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* 4:811-825. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1526>
- de Quadros RR, Loiko MR, de Paula CMD, Hessel CT, Jacxsens L, Uyttendaele M, Bender RJ and Tondo EC. 2014. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control* 42:152-164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.043>
- Deering AJ, Mauer LJ and Pruitt RE. 2012. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International* 45:567-575. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.058>
- Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T and Finlay BB. 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:3597-3602. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400326101>
- Dodd CER and Aldsworth TG. 2002. The importance of *rpoS* in the survival of bacteria through food processing. *International Journal of Food Microbiology* 74:187-194. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00679-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00679-1)
- Donlan RM and Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15:167-193. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>
- Donnenberg MS, Tacket CO, Losonsky G, Frankel G, Nataro JP, Dougan G and Levine MM. 1998. Effect of prior experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection on illness following homologous and heterologous rechallenge. *Infection and Immunity* 66:52-58. <http://iai.asm.org/content/66/1/52.full>
- Doyle MP and Erickson MC. 2012. Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *International Journal of Food Microbiology* 152:54-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.037>
- Erickson M. 2012. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology* 3:283-310. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101211>
- Erickson MC, Webb CC, Díaz-Pérez JC, Phatak SC, Silvoy JJ, Davey L, Payton AS, Liao J, Ma L and Doyle MP. 2010. Surface and internalized *Escherichia coli* O157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection* 73:1023-1029. <http://205.251.124.92/NorthAmerica/Documents/SCIENCE%20BRIEFS/Food%20Safety%20Briefs%20June%202010%20Final.pdf>
- Faguy DM. 2003. Lateral gene transfer (LGT) between Archaea and *Escherichia coli* is a contributor to the emergence of novel infectious disease. *BMC Infectious Diseases* 3:13. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/13/>
- Farfan MJ and Torres AG. 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity* 80:903-913. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.05907-11>
- Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S, Nolan M, Goltsman E, Thiel J, Malfatti S, Loper JE, Lapidus A, Detter JC, Richardson PM, Kyrpides NC, Ivanova N and Lindow SE. 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11064-11069. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504930102>
- Ferens WA and Hovde CJ. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:465-487. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0673>
- Flemming HC and Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fletcher J, Leach JE, Eversole K and Tauxe R. 2013. Human pathogens on plants: Designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology* 103:306-315. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-09-12-0236-ia>
- Franz E, Visser AA, Van Diepeningen AD, Klerks MM, Termorshuizen AJ and Van Bruggen AH. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International Journal*

- of Food Microbiology 24:106-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.002>
- Freedman DJ, Tacket CO, Delehanty A, Maneval DR, Nataro J and Crabb JH. 1998. Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Journal of Infectious Diseases 177:662-667. <http://dx.doi.org/10.1086/514227>
- Gil A, Morón de Salim A y Gaesrte Y. 2011. Calidad microbiológica en frutas de conchas comestibles expandidas en mercados populares de los municipios Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 30:24-28. <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v30n1/art06.pdf>
- Ginestrea M, Rincón G, Romero S, Harris B, Castellano M y Colina G. 2005. Especies de Aeromonas en vegetales frescos que se expenden en un mercado popular de Maracaibo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 25:229-235. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416579007>
- Gomes C, Da Silva P, Moreira RG, Castell-Pérez E, Ellis EA and Pendleton M. 2009. Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. International Journal of Food Microbiology 135:238-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.026>
- Haas CN, Rose JB and Gerba CP. 2014. Quantitative Microbial Risk Assessment. Second Edition. John Wiley & Sons Publication. New York, USA. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118910030>
- Hughes DT and Sperandio V. 2008. Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their host. Nature Reviews Microbiology 6:111-120. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1836>
- Jablasone J, Warriner K and Griffiths M. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. International Journal of Food Microbiology 99:7-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.011>
- Janisiewicz WJ, Conway WS, Brown MW, Sapers GM, Fratamico P and Buchanan RL. 1999. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. Applied and Environmental Microbiology 65:1-5. <http://aem.asm.org/content/65/1/1.full>
- Kendall MM, Rasko DA and Sperandio V. 2007. Global effects of the cell-to-cell signalling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infection and Immunity 75:4875-4884. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00550-07>
- Kessler R, Nisa S, Hazen TH, Horneman A, Amoroso A, Rasko DA and Donnenberg MS. 2015. Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes. Pathogens and Disease 73:ftv076. <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftv076>
- Kroupitski Y, Golberg D, Belausov E, Pinto R, Swartzberg D, Granot D and Sela S. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. Applied and Environmental Microbiology 75:6076-6086. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01084-09>
- Lai Y, Rosenshine I, Leong JM and Frankel G. 2013. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Cellular Microbiology 15:1796-1808. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12179>
- Lugo-Jiménez N, Carballo-Bautista M, Sauri-Duch E, Centurión-Yah A y Tamayo-Canúl E. 2010. Efecto del sistema de cultivo sobre la calidad microbiológica del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) después de su cosecha. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 11:171-179. <http://www.redalyc.org/exportar cita.oa?id=81315809009>
- Lugtenberg BJJ, Dekkers L and Bloemberg GV. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. Annual Review of Phytopathology 39:461-490. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.461>
- Macarasin D, Patel J, Bauchan G, Giron JA and Sharma VK. 2012. Role of curly and cellulose expression in adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach leaves. Foodborne Pathogens and Disease 9:160-167. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.1020>
- Machado DC, Maia CM, Carvalho ID, da Silva NF, Dantas MC and Andre PB. 2006. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. Brazilian Journal of Microbiology 37:538-544. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822006000400025>
- McWilliams BD and Torres AG. 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. Microbiology Spectrum 2:EHEC-00032013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013
- Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A and Yanagawa H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. American Journal of Epidemiology 150:787-796. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010082>
- Mitra R, Cuesta-Alonso E, Wayadande A, Talley J, Gilliland S and Fletcher J. 2009. Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach. Journal of Food Protection 72:1521-1530. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681281>
- Mukhopadhyay R, Ukuku DO, Juneja V and Fan X. 2014. Effects of UV-C treatment on inactivation of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on grape tomato surface and stem scars, microbial loads, and quality. Food Control 44:110-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.027>
- Muñoz S, Vilca M, Ramos D and Lucas J. 2013. Frequency of enterobacteria in fresh vegetables of raw consumption sold in four markets in Lima, Peru. Revista de Investigación Veterinaria del Perú 24:300-306. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-911720130003000006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-911720130003000006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Olaimat AN and Holley RA. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. Food Microbiology 32:1-19. [VOLUMEN 34, NÚMERO 1, 2016](http://dx.doi.org/10.1016/j.</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

- fm.2012.04.016
- Oliveira M, Viñas I, Usall J, Anguera M and Abadias M. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuces leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology* 156:133-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.014>
- Prigent-Combaret C, Prensier G, Thi TTL, Vidal O, Lejeune P and Dorel C. 2000. Development pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: Role of flagella, curli and colonic acid. *Environmental Microbiology* 2:450-464. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x>
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM and Swerdlow DL. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases* 11:603-609. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1104.040739>
- Reineke K, Sevenich R, Hertwig C, Janßen T, Fröhling A, Knorr D, Wieler LH and Schlüter O. 2015. Comparative study on the high pressure inactivation behavior of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 and O157: H7 outbreak strains and a non-pathogenic surrogate. *Food Microbiology* 46:184-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.017>
- Riley LW, Remis RS and Helgerson D. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine* 308:681-685. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198303243081203>
- Rivera JM, Rodríguez C y López J. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26:45-48. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342009000100009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342009000100009&script=sci_arttext)
- Saldaña Z, Sánchez E, Xicohtencatl-Cortés J, Puente JL and Giron JA. 2011. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology* 2:119. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00119>
- Shaw RK, Berger CN, Feys B, Knutton S, Pallen MJ and Frankel G. 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2908-2914. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02704-07>
- Solomon EB, Yaron S and Matthews KR. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68:397-400. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.1.397-400.2002>
- Szmolka A and Nagy B. 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact in public health. *Frontiers in Microbiology* 4:258. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00258>
- Talley JL, Wayadande AC, Wasala LP, Gerry AC, Fletcher J, DeSilva U and Gilliland SE. 2009. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves by houseflies (Diptera: Muscidae). *Journal of Food Protection* 72:1547-1552. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681284>
- Teunis PFM, Ogden ID and Strachan NJC. 2008. Hierarchical dose response of *E. coli* O157: H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiology and Infection* 136:761-770. <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268807008771>
- Torres AG, Millflores-Flores L, García-Gallegos JG, Patel SD, Best A, La Ragione RM, Martínez-Laguna Y and Woodward MJ. 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157: H7. *International Journal of Medical Microbiology* 297:177-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.005>
- Tzschoppe M, Martin A and Beutin L. 2012. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 152:19-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.009>
- van Elsas JD, Semenov AV, Costa R and Trevors JT. 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal* 5:173-183. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
- van-Overbeek LS, van Doorn J, Wichers JH, van Amerongen A, van Roermund HJW and Willemsen PTJ. 2014. The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5:104. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00104>
- Wang F, Yang Q, Kase JA, Meng J, Clotilde LM, Lin A and Ge B. 2013. Current trends in detecting non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Foodborne Pathogens and Disease* 10:665-677. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1448>
- Wan-Ying X, Jian-Qiang S and Yong-Guan Z. 2015. Phyllosphere bacterial community of floating macrophytes in paddy soil environments as revealed by illumine high-throughput sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 81:522-532. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03191-14>
- Warriner K, Ibrahim F, Dickinson M, Wright C and Waites WM. 2003a. Internalization of human pathogens within growing salad vegetables. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 20:117-134. DOI:10.1080/02648725.2003.10648040
- Warriner K, Spaniolas S, Dickinson M, Wright C and Waites WM. 2003b. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal of Applied Microbiology* 95:719-727. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02037.x>
- Wasala L, Talley JL, DeSilva U, Fletcher J and Wayadande A. 2013. Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach by house flies, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Phytopathology* 103:373-380. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO-09-12-0217-FI>
- Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K and Tamura K. 1996. Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

O157:H7 infection by two different genotype strains. The Lancet 348:831-832. [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(05\)65257-9/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(05)65257-9/abstract)

Wright KM, Chapman S, McGeachy K, Humphris S, Campbell E, Toth IK and Holden NJ. 2013. The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification and internal localization in roots. *Phytopathology* 103:333-340. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-08-12->

0209-FI

Xicohtencatl-Cortes J, Sánchez-Chacon E, Saldana Z, Freer E and Giron JA. 2009. Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *Journal of Food Protection* 72:1531-1537. [iafp/jfp/2009/00000072/00000007/art00025](http://iafp/jfp/2009/00000072/00000007/art00025)