



# **Universidad Autónoma de Querétaro**

Facultad de Química

## **Prevalencia de microorganismos patógenos en ambientes de producción hortofrutícola en Querétaro: coocurrencia, distribución y estacionalidad**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**Presenta**

Ing. Marisol Verdín García

**Dirigida por**

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Querétaro, Qro. Noviembre del 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Prevalencia de microorganismos patógenos en  
ambientes de producción hortofrutícola en Querétaro:  
coocurrencia, distribución y estacionalidad

**por**

Marisol Verdín García

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-255481



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**Prevalencia de microorganismos patógenos en ambientes de producción  
hortofrutícola en Querétaro: coocurrencia, distribución, y estacionalidad**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta

Ing. Marisol Verdín García

Dirigida:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Ynes Ortega

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

M. en C. Marla Goethe Leal Cervantes

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Juan Fernando García Trejo

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. María Guadalupe Flavia Loarca Piña

Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre del 2023

México

*“Lo que la mente del hombre puede  
concebir y creer, es lo que la mente  
puede crear” – Napoleon Hill*

Dedico esta tesis a Dios, a mi familia, especialmente a mi abuelito Fidel.

## AGRADECIMIENTOS

- A mi comité de tesis por sus valiosas aportaciones: Dra. Sofi, Dr. Juanfer, M.C. Marla, Dra. Ynes, pero sobre todo a la Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, por su paciencia e invaluable apoyo.
- A los productores que me permitieron el acceso, que me brindaron su apoyo y conocimientos. Gracias Jesús, Chío, Ivette, Javier, Asael, Tete, Adán, y Francisco.
- Al equipo de trabajo del Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA), principalmente a Marla Goethe Leal Cervantes, y a la estimada Sra. Martha Andrade.
- Te agradezco Juan R, porque sin tu apoyo nunca hubiera podido realizar este proyecto. Gracias por las desveladas, por las palabras de aliento, por llevarme por medio Querétaro, por ayudarme a muestrear, por siempre estar pendiente de que comiera, que me recogieras a las 10-11 pm del laboratorio, gracias por tu amor y ser el mejor compañero de vida.
- A los estudiantes de servicio que me apoyaron durante el proyecto Orlando, y Aritza y también a mi amiga Andrea Vazquez y esas conversaciones mientras analizábamos después de las 5 pm en el laboratorio.
- A mi familia por su amor inquebrantable y por enseñarme que la palabra “rendición” no existe en nuestro vocablo. Por demostrarme con el ejemplo que la vida no es sencilla, pero siempre hay que dar nuestra mejor cara y ser perseverantes.
- Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) 2022, por el apoyo y otorgarnos recurso para la ejecución del proyecto: FOPER-2022-FQU02627.
- Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo brindado para la realización de la maestría.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>II. Antecedentes</b>	<b>4</b>
<i>II.I. Importancia del consumo de frutas y hortalizas en la dieta del ser humano</i>	<i>4</i>
2.1.1 La dieta del mexicano y el consumo de frutas y hortalizas	5
<i>II.II. Tomate rojo</i>	<i>5</i>
2.2.1 Cultivo del tomate rojo	6
2.2.2 Producción y exportación del cultivo de tomate rojo en México	8
<i>II.III. Lechuga</i>	<i>9</i>
2.3.1 Cultivo de la lechuga	10
2.3.2 Producción y exportación del cultivo de la lechuga	11
<i>II.IV. Fresa</i>	<i>13</i>
2.4.1 Cultivo de la fresa	13
2.4.2 Producción y exportación de la fresa en México	14
<i>II.V. Enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas</i>	<i>15</i>
2.5.1 Brotes asociados con el consumo de tomate rojo fresco	16
2.5.2 Brotes asociados con el consumo de lechuga fresca	17
2.5.3 Brotes asociados con el consumo de la fresa	17
<i>II.VI. Contaminación microbiana de frutas y hortalizas</i>	<i>18</i>
2.6.1 Principales patógenos	21
2.6.2 Sistemas de riego	24

2.6.3	Suelo	31
II.VII.	<i>Sistemas empleados para el aseguramiento de inocuidad de productos hortofrutícolas</i>	34
<b>III.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>37</b>
III.I.	<i>Objetivo general</i>	37
III.II.	<i>Objetivos específicos</i>	37
<b>IV.</b>	<b>Metodología</b>	<b>38</b>
IV.I.	<i>Equipos, materiales, reactivos, medios de cultivo y cepas de referencia</i>	38
4.1.1	Equipos	38
4.1.2	Materiales	38
4.1.3	Reactivos	38
4.1.4	Medios de cultivo	39
4.1.5	Cepas de referencia	40
IV.II.	<i>Metodología</i>	41
4.2.1	Descripción de los sitios de producción	41
4.2.2	Monitoreo de las condiciones ambientales	42
4.2.3	Nivel de cumplimiento de BPA	43
4.2.4	Recolección de muestras y preparación	43
4.2.5	Análisis microbiológicos	45
4.2.6	Caracterización de cepas de microorganismos patógenos aislados de los materiales analizados.	50
4.2.7	Cuantificación de coliformes fecales y <i>E. coli</i> en agua y productos hortofrutícolas.	52
4.2.8	Correlación entre la aplicación de BPA y la contaminación microbiana de frutas y hortalizas producidas en Querétaro.	52
4.2.9	Análisis estadístico	53
<b>V.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>53</b>
V.I.	<i>Condiciones ambientales y nivel de cumplimiento de BPA en cuatro sitios de producción de frutas y hortalizas.</i>	53
V.II.	<i>Prevalencia de <i>S. enterica</i>, <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i></i>	58
V.III.	<i>Caracterización de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de agua y suelo</i>	61
V.IV.	<i>Calidad microbiológica del agua y productos hortofrutícolas en función de</i>	

<i>la concentración de coliformes fecales y E. coli.</i>	69
<i>V.V. Correlación entre la aplicación de BPA, el nivel de tecnología de los sitios de producción con la contaminación microbiana de frutas y hortalizas.</i>	74
<b>VI. Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>VII. Referencias</b>	<b>80</b>
<b>VIII. Anexos</b>	<b>95</b>
<i>VIII.I. Anexo 1. Formato de inspección en función a las BPA (BPA-22-01.00)</i>	95
<i>VIII.II. Anexo 2. Etiquetado de muestras</i>	99



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos patógenos involucrados en brotes de fresa en EUA de 1998 al 2019. ....	18
Tabla 2. Características de los principales microorganismos patógenos asociados a brotes de productos hortofrutícolas.....	20
Tabla 3. Límites máximos permitidos con base en la NOM-EM-034-FITO-2000 ...	36
Tabla 4. Descripción de los sitios de producción agrícola.....	42
Tabla 5. Secuencias de los iniciadores para la detección de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	48
Tabla 6. Secuencias de los iniciadores para la detección de <i>L. monocytogenes</i> ...	49
Tabla 7. Parámetros ambientales y fisicoquímicos obtenidos en los cuatro sitios de producción agrícola durante las cuatro estaciones. ....	55
Tabla 8. Cumplimiento de buenas prácticas agrícolas (BPA) en cuatro sitios de producción agrícola durante las cuatro estaciones del año. ....	57
Tabla 9. Prevalencia de <i>S. enterica</i> in suelo, agua agrícola, y productos hortofrutícolas recolectados en los 4 sitios de producción agrícola en Querétaro durante las cuatro estaciones del año.....	60
Tabla 10. Tasa de inactivación específica de los aislados de <i>S. enterica</i> a 60, 55 y 50 °C.....	62
Tabla 11. Valores D de los aislados de <i>S. enterica</i> a 60, 55 y 50 °C .....	65
Tabla 12. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados de <i>S. enterica</i> de suelo y agua recolectados en los cuatro sitios de producción agrícola. ....	68
Tabla 13. Prevalencia y concentraciones de coliformes fecales en agua y productos hortofrutícolas en los cuatro sitios de producción de frutas y hortalizas en el estado de Querétaro, durante las cuatro estaciones del año .....	70
Tabla 14. Prevalencia y concentraciones de <i>E. coli</i> en agua y productos hortofrutícolas en los cuatro sitios de producción de frutas y hortalizas en el estado de Querétaro, durante las cuatro estaciones del año .....	72
Tabla 15. Perfil microbiológico de la calidad del agua con base en la regla de inocuidad de los productos, basado en el contenido de <i>E. coli</i> en cuatro sitios de producción agrícola.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Botánica de la planta del tomate rojo y estadíos de la planta. ....	8
Figura 2. Botánica de la planta de la lechuga y estadíos. ....	10
Figura 3. Principales tipos de lechugas cultivadas en México. ....	12
Figura 4. Botánica de la planta de la fresa y estadíos. ....	14
Figura 5. Fuentes de contaminación microbiana de productos alimenticios listos para consumo durante la cadena del campo a la mesa. ....	19
Figura 6. Principales sistemas de riego aplicados en México. ....	26
Figura 7. Agua en Querétaro, 2017. ....	30
Figura 8. Superficie por tipo de uso de suelo en México, en 2014, en km <sup>2</sup> . ....	33
Figura 9. Muestreo en campo del fruto, agua superficial y suelo. ....	44
Figura 10. Gráfica de efecto de interacción entre la temperatura y los aislados de <i>S. enterica</i> ( $p= 0.023$ ). C+3: <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028. ....	63
Figura 11. Gráficas de superficie 3D que ilustran la relación entre factores que influyen en la contaminación y la presencia de indicadores microbianos y <i>S. enterica</i> en los SP. ....	76
Figura 12. Ubicación geográfica de los SP y los reservorios de AgWA y suelos contaminados con <i>Salmonella</i> . ....	78

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

AgWA	Agua de uso agrícola
ACS	Agar McConkey Sorbitol
ACV	Acriflavina-cefsulodina-vancomicina
AK	Amikacina
AMP	Ampicilina
$a_w$	Actividad de agua
BLEB	Caldo de enriquecimiento de <i>Listeria</i>
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
CB	Carbencilina
CDC	Centro de Control de Enfermedades
CEP	Cefalotina
CFX	Cefotaxima
CLBVB	Caldo lactosa bilis verde brillante
CLT	Caldo Lauril Triptosa
CLT2	Caldo Lauril Triptosa 2X
CHL	Cloranfenicol
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
D	Dextrosa
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente invasiva
DBO <sub>5</sub>	Demanda bioquímica de oxígeno a los 5 días
DQO	Demanda química de oxígeno
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
CE	Conductividad eléctrica
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
Ensanut	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatógena

ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica
EUA	Estados Unidos de América
FAO	La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos
FSMA	Ley de Modernización de Inocuidad Alimentaria
GEN	Gentamicina
GM	Media Geométrica
ha	Hectárea
K <sub>c</sub>	Coeficiente de cultivo
LECRIMA	Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos
LIA	Agar lisina, hierro
Mal	Maltosa
Man	Manitol
mBPWp	Agua peptonada tamponada modificada con piruvato
MOX	agar modificado Oxford
NET	Netilmicina
NFT	Nitrofurantoína
NMP	Número más probable
NOF	Norfloxacin
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador fosfato salino
PH	Producto(s) hortofrutícola(s)
PSR	Norma de Inocuidad de los Productos Frescos
R	Ramnosa
RCE	Reglamento de la Comisión Europea
RVS	Rappaport-Vassiliadis
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SST	Sólidos Suspendidos Totales
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
VUE	Valor Umbral Estadístico
STX	Trimetoprima-sulfametoxazol
t	Toneladas
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
AST	Agar Soya Trypticasa
CSTEL	Caldo Soya Trypticasa con extracto de levadura
TSI	Triple azúcar, hierro
TT	Tetracionato
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CU	Preenriquecimiento universal
VTEC	<i>E. coli</i> verotoxigénica
WMQP	Perfil Microbiano de la Calidad de Agua
X	Xilosa
X-gal	Galactopiranosidasa
SB	Agar sulfito de bismuto
SP	Sitio de producción

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:** Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

*Marisol Verdín*

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la asociación entre las buenas prácticas agrícolas (BPA), el nivel tecnológico y la estacionalidad, con la prevalencia de bacterias patógenas al humano en cuatro sitios de producción agrícola (SP) en Querétaro, México. Los SP fueron un campo a cielo abierto (SP1), un invernadero (SP2) y dos invernaderos hidropónicos (SP3 y SP4), cuyos niveles tecnológicos fueron bajo, medio, medio y alto, respectivamente. Se visitó cada SP dos veces durante las cuatro estaciones y se registró la temperatura (ambiente, suelo y agua), humedad (ambiente y suelo), pH (suelo y agua) y el cumplimiento de BPA. Se analizaron muestras de suelo (n=11), agua agrícola (AgWA, n=30), lechuga iceberg (n=24), tomate Roma (n=18), fresa (n=24) y tomate *cherry* (n=24) para detectar *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Se cuantificaron coliformes fecales (CF) y *E. coli* genérica en agua/AgWA (n=57) y productos hortofrutícolas (PH, n=90). La temperatura fue igual en primavera (24°C) y verano (20°C); y en otoño (17°C) e invierno (15°C) ( $p \leq 0.05$ ); la temperatura del suelo y agua, humedad y pH fueron iguales ( $p > 0.05$ ) El cumplimiento de BPA en SP1, SP2, SP3 y SP4 fue 20%, 45%, 42% y 93%, respectivamente. No se encontró *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, pero si se detectó *S. enterica* en tres muestras de AgWA de SP1, SP2 y SP3 y una de suelo de SP2 (4/131, 3%). Se encontraron CF y *E. coli* en AgWA (57%, 43%) y lechuga (71%, 29%) de SP1, AgWA (91%, 45%) y tomate Roma (6%, 0%) de SP2, AgWA de SP3 (63%, 50%) y SP4 (60%, 0%). Se observó una correlación positiva entre las BPA y el nivel tecnológico ( $r=0.97$ ), y negativa entre las BPA y la prevalencia de *E. coli* en AgWA ( $r=-0.54$ ). Se aislaron cepas de *S. enterica* (n=7) y se evaluó tolerancia térmica (50, 55 y 60°C) y resistencia antimicrobiana (12 antibióticos); los aislados mostraron mayor susceptibilidad a 60°C ( $p \leq 0.05$ ) y multirresistencia a antibióticos. Las BPA promueven la inocuidad durante la producción, sin embargo, se deben reforzar estrategias de control para prevenir la contaminación de AgWA.

**Palabras clave:** suelo, agua, productos hortofrutícolas, enteropatógenos, BPA.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the association of Good Agricultural Practices (GAP), technological level, seasonality, and prevalence of foodborne pathogens at four agricultural production sites (APS) located in Queretaro, Mexico. The study was conducted in an open field farm (APS1), a greenhouse (APS2) and two hydroponic greenhouses (APS3 and APS4), having technological levels of low, medium, medium, and high, respectively. Each APS was visited twice during the four seasons; temperature (ambient, soil, water), humidity (ambient, soil), pH (soil, water), and GAP compliance were registered. Samples of soil (n=11), agricultural water (AgWA, n=30), iceberg lettuce (n=24), Roma tomato (n=18), strawberry (n=24), and cherry tomato (n=24) were collected for *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* detection. In AgWA (n=57) and fresh produce (FP, n=90), fecal coliforms (FC) and generic *E. coli* were quantified. The median value of temperature was similar in spring (24°C) and summer (20°C), and in autumn (17°C) and winter (15°C) ( $p \leq 0.05$ ); there were no differences in soil and water temperature, humidity, and pH ( $p > 0.05$ ). GAP compliance in APS1, APS2, APS3, and APS4 were 20%, 45%, 42%, and 93%, respectively. *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were absent, whereas *S. enterica* was detected in three AgWA samples collected at APS1, APS2, and APS3 and in one APS2 soil sample (4/131, 3%). FC and *E. coli* were found in AgWA (57%, 43%) and lettuce (71%, 29%) from APS1, AgWA (91%, 45%) and Roma tomato (6%, 0%) from APS2, AgWA from APS3 (63%, 50%) and APS4 (60%, 0%). A positive correlation was observed between GAP compliance and technological level ( $r=0.97$ ), whereas the opposite in AgWA between GAP compliance and *E. coli* prevalence ( $r=-0.54$ ) was observed. *S. enterica* strains (n= 7) were isolated, and thermal tolerance (50, 55, and 60 °C) and antimicrobial resistance (12 antibiotics) were evaluated; the isolates survived less at 60°C ( $p \leq 0.05$ ) and showed multidrug resistance. GAP benefits produce safety, however, control strategies to prevent AgWA contamination must be reinforced.

**Keywords:** soil, water, fresh produce, foodborne pathogens, GAP.

## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el consumo de productos hortofrutícolas ha ido en incremento, debido a que los consumidores se preocupan más por su dieta, e incluyen alimentos más saludables y con menor procesamiento (McDaniel & Jadeja, 2019). En el año 2020, la dieta básica de los mexicanos adultos mayores a 20 años se compuso en su mayoría por verduras y frutas (50.5 %) (Sharmah-Levy et al., 2021).

Se ha documentado ampliamente que las frutas y verduras, como hojas verdes, hierbas y brotes, pueden ser vehículos de microorganismos patógenos. Debido a que la mayoría de estos productos se consumen en fresco, si las prácticas sanitarias durante su producción son ineficientes, se puede generar una potencial de contaminación, sobrevivencia de los microorganismos y por ende riesgo de afectación de la salud del consumidor (Kisluk & Yaron, 2012).

De 1999 a 2019, el consumo de verduras fue la causa más común de brotes transmitidos por alimentos en Europa (34 %) y América del Norte (47 %) (Aiyedun et al., 2021). Específicamente en Estados Unidos entre 1996 y 2014, un tercio de los brotes transmitidos por alimentos estuvieron asociados con el consumo de productos frescos, de los cuales el 80% fueron causados por productos importados (Li et al., 2018). Se ha documentado ampliamente que los microorganismos patógenos al humano pueden ingresar a este tipo de alimentos durante la cadena de producción, incluido el crecimiento y la cosecha de los cultivos y que el suelo y el agua pueden ser una fuente importante de contaminación (Aiyedun et al., 2021; Carstens et al., 2019).

México tiene una relación comercial estrecha con EUA, siendo la exportación de frutas y verduras una de las principales actividades dentro del comercio agroalimentario. En 2013, los principales países de destino de las frutas mexicanas fueron EUA (85.05%), Japón (3.87%) y Canadá (3.61%); y de las hortalizas EUA: (94.1%), Canadá (1.87%) y Guatemala (0.94%) (Sánchez-Gómez, 2019). La



elevada cantidad de productos que se exportan a EUA incrementa la probabilidad de que algunos brotes de enfermedad que ocurren en ese país se asocien a productos contaminados producidos en México.

Pese a que las prácticas agrícolas se llevan a cabo en todo el planeta, éstas varían ampliamente dado que cada país tiene criterios y requerimientos legales específicos, en función de la calidad de producción, la calidad del agua usada para la producción y preparación (Machado-Moreira et al., 2019). Un mecanismo general para asegurar la inocuidad y la seguridad de los alimentos a lo largo de la cadena de suministro, pero, sobre todo en el campo (cultivo, cosecha y actividades postcosecha), ha sido a través de la implementación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). El término de BPA fue definido por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el cual menciona que son “un conjunto de acciones o prácticas que se realizan en una explotación agrícola, tendientes a reducir los peligros químicos, físicos y microbiológicos. Están orientadas a obtener productos inocuos (sanos-limpios), mejorar las condiciones de los trabajadores (salud y bienestar) y proteger el medio ambiente, con métodos ecológicamente seguros, higiénicamente aceptables y económicamente factibles” (FAO, 2016; Vásquez, 2020). Sin embargo, una de las principales desventajas que enfrentan los productores actualmente son las pérdidas económicas y productivas debido al cambio climático.

El cambio climático y el impacto que éste ejerce sobre la distribución de especies microbianas en los ambientes es un aspecto importante y poco estudiado (Brouwer et al., 2018; Walker, 2018). Las condiciones climáticas extremas no sólo impactan en la cantidad de agua disponible y la temperatura, sino que también están acompañadas de cambios en las comunidades microbianas y sus interacciones, que pueden afectar tanto a la producción agrícola, como a la salud humana (Misiou & Koutsoumanis, 2021; Walker, 2018). Se estima que el número de enfermedades transmitidas por el agua aumentará en las próximas décadas debido al cambio climático, complicando el esfuerzo aplicado en mitigar los brotes asociados al agua y a los productos hortofrutícolas. Algunos patógenos bacterianos vinculados con el incremento de dichos brotes podrían ser *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*

*enterica* y *Listeria monocytogenes* (McDaniel & Jadeja, 2019; Walker, 2018).

En México, la información que existe sobre la prevalencia y distribución de microorganismos patógenos en ambientes de producción hortofrutícola es escasa, y con frecuencia se recurre a la información generada en EUA para la toma de decisiones relacionadas con la inocuidad de frutas y hortalizas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia y distribución de bacterias patógenas al humano en agua de uso agrícola, suelo y productos hortofrutícolas seleccionados, cultivados en cuatro sitios de producción con diferentes niveles de tecnología e implementación de BPA ubicados en el estado de Querétaro a lo largo de un año. Adicionalmente, se determinó la calidad microbiológica del agua de uso agrícola, en función de la concentración de coliformes fecales y *E. coli*.

## II. ANTECEDENTES

### II.I. Importancia del consumo de frutas y hortalizas en la dieta del ser humano

Las frutas y las verduras contienen una gran variedad de nutrientes que favorecen la salud de los seres humanos (Kaplan et al., 2007). Por ejemplo, los antioxidantes como la vitamina C y carotenoides, ejercen un papel fundamental protegiendo al cuerpo humano contra el estrés oxidativo, ya que si limita su consumo se puede generar la progresión de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades crónico-inflamatorias, arterosclerosis, algunos tipos de cáncer, depresión, entre otros padecimientos. Por otro lado, las vitaminas hidrosolubles como la B y la C, y minerales como el zinc, el calcio y el magnesio, ejercen un papel fundamental en el buen funcionamiento cognitivo y emocional (Raison & Miller, 2011).

Diversos estudios han señalado que las personas que consumen mayor cantidad de frutas y verduras suelen presentar menor incidencia de desórdenes mentales, menores niveles de depresión, mayor optimismo y satisfacción personal. Sin embargo, también se sabe que la relación entre el estado mental y la ingesta de frutas y verduras es dependiente de la cantidad ingerida, del estilo de vida, de aspectos económicos y sociales, entre otros (Bishwajit et al., 2017; Brookie et al., 2018; Ford et al., 2013; Gopinath et al., 2016; Jacka et al., 2010; Mikolajczyk et al., 2009; Trichopoulou et al., 2003).

Tanto el cáncer como las enfermedades cardiovasculares son dos de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se ha demostrado con evidencia científica, que la ingesta de cinco o más porciones de fruta, verdura y legumbres al día (~400 g) pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Liu et al., 2021). Lo anterior, ha generado un incremento en la ingesta de este grupo de alimentos en los últimos años (Carstens et al., 2019; Machado-Moreira et al., 2019; Possas et al., 2021). En consecuencia, los consumidores actualmente tienen mayor conciencia de su salud y, por lo tanto, incorporan dentro de la dieta, frutas y verduras más naturales, frescas y listas para su consumo. Mas aún, esta tendencia no se observa solamente en adultos, sino que también, padres de familia están sustituyendo de la

dieta de sus hijos, productos altamente procesados por fruta y verdura (McDaniel & Jadeja, 2019).

Desafortunadamente, dado que este tipo de alimentos principalmente son consumidos crudos y rara vez se someten a algún proceso que inactive microorganismos antes de su consumo, con frecuencia son vehículos de microorganismos patógenos para el humano (Possas et al., 2021)

#### 2.1.1 La dieta del mexicano y el consumo de frutas y hortalizas

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) en México, sirve como un referente del sistema de salud del país y permite, de manera representativa, evaluar la evolución en la nutrición y salud del mexicano en los sectores urbano y rural. Durante el año 2020 existían 82,792,979 adultos mayores a 20 años a nivel nacional, de los cuales se encuestaron a 761 personas para conocer los perfiles de consumo de diferentes grupos de alimentos. Después del agua (89%), los principales alimentos consumidos fueron las carnes no procesadas (65%), las frutas (51%) y verduras (50%); las nueces y semillas fueron el grupo de alimentos de menor consumo (4.9%) (Sharmah-Levy et al., 2021) Con base en el Panorama Agroalimentario de México en el año 2021, el consumo de algunos productos hortofrutícolas per cápita, se distribuyó de la siguiente manera: naranja (35.3 Kg), papa (16 Kg), tomate (12.4 Kg), cebolla (7.9 Kg), nopal (6.3 Kg), fresa (1.6 Kg) y lechuga (2.2 Kg) (SIAP, 2022). Las cifras anteriores revelan que el consumo de frutas y verduras son fundamentales en la dieta del mexicano y, por lo tanto, procurar su inocuidad debe ser una labor prioritaria.

#### II.II. Tomate rojo

El tomate rojo (*Lycopersicon esculentum L.* o *Solanum lycopersicum*) forma parte de la familia *Solanaceae* y es el segundo vegetal más consumido a nivel mundial, seguido de la papa (FAOSTAT, 2008). La planta del tomate rojo tiene origen en la región Andina, sin embargo, fue domesticado y cultivado en México por los aztecas (Blancard et al., 2011).

Las variedades de tomate se caracterizan por ser frutos rojos con gran variabilidad en la calidad, forma, intensidad en el color del fruto, morfología de la hoja, entre otros (Waheed et al., 2019). El tomate rojo ejerce un papel importante en la dieta de los seres humanos, puesto que es una fuente importante de vitamina C, potasio, ácido fólico, calcio, magnesio, fósforo y carotenoides como el licopeno. El tomate rojo se considera un alimento nutracéutico ya que sus nutrientes se han asociado con la prevención de enfermedades crónicas como las del corazón y/o algunos tipos de cáncer (Li et al., 2021; Rapa et al., 2021; Tan et al., 2021). Este alimento suele incluirse como base o guarnición de gran cantidad de platillos y su consumo puede ser tanto crudo, como cocinado (principalmente en salsas) (Blancard et al., 2011). En EUA, el tomate representó la segunda hortaliza de mayor consumo per cápita en el año 2020, con 8.76 Kg (Li et al., 2021; Shahbandeh, 2021), mientras que, en México el consumo anual per cápita es de 12.4 Kg (SIAP, 2022).

### 2.2.1 Cultivo del tomate rojo

El tomate es un cultivo de crecimiento relativamente rápido, su periodo abarca entre 90 y 150 días. La temperatura óptima para desarrollo oscila entre 18-25°C en el día y 10-20°C durante la noche, por lo cual, entre mayor sea la diferencia de temperatura entre el día y la noche, mayor será el perjuicio en el rendimiento del cultivo (Waheed et al., 2019). Temperaturas superiores a 35°C en el día con alta humedad y viento fuerte, afectan el rendimiento del cultivo (Florido & Álvarez, 2015). Al mismo tiempo, una temperatura mayor a 20°C en la noche, acompañado por alta humedad conducen a una vegetación excesiva y menor producción de fruto. Se reporta que, a mayor humedad relativa, existe una mayor incidencia de plagas, enfermedades en la planta y pudrición del fruto. Además, para conseguir mayor rendimiento en la cosecha, el cultivo se debe de rotar con otros tipos de cultivo, tales como maíz, col, entre otros que favorecerán en una menor incidencia de plagas y enfermedades (FAO, 2022).

El tomate rojo, se puede cultivar en una amplia gama de suelos (Florido & Álvarez, 2015); sin embargo, se prefiere un suelo franco liviano, relación 80:15:5,

arena:lino:arcilla, con pH entre 5.5 a 6.8 y bien drenado (Waheed et al., 2019)(Waheed et al., 2019). El cultivo de tomate rojo presenta moderada sensibilidad al contenido de salinidad presente en el suelo, especialmente durante la germinación y el desarrollo temprano de la planta, por lo que normalmente el suelo es sometido a procesos de lixiviación mediante un riego previo o un riego en exceso, durante la aplicación del riego inicial (FAO, 2022).

El tomate rojo es un arbusto pequeño perenne de altura aproximada de 1 a 3 m; produce flores amarillas que luego se convierten en el fruto (Figura 1A). Sintetiza a modo de mecanismo de defensa, un olor y sabor irritante y desagradable para evitar que las aves e insectos lo ingieran (Waheed et al., 2019). La semilla generalmente se siembra en viveros en hileras, con una distancia entre planta y planta de 10 cm. Luego las plántulas se trasplantan en el campo posterior a los 25-35 días, cuyo espaciamiento oscila entre 0.3-0.6 x 0.6-1 m, con un tamaño de población de ~40,000 plantas/ha. La Figura 1B muestra las etapas del cultivo del tomate rojo y los coeficientes de cultivo ( $K_c$ ) para la gestión del agua (FAO, 2022).

Otro factor que afecta el rendimiento del cultivo es el tipo de riego. Comúnmente se aplica el sistema de riego superficial por surcos, para el cultivo del tomate rojo, dado que el riego por aspersión favorece, debido a las salpicaduras, la aparición de enfermedades fúngicas, el cancro bacteriano y bacterias que afectan hojas, tallos, flor y frutos de la planta, que pueden conducir a la muerte de la planta. El riego por aspersión, además, puede generar un aumento en la pudrición de la fruta y si el agua es de mala calidad se producen quemaduras en las hojas de la planta. Se puede considerar un buen rendimiento del cultivo de tomate rojo, cuando la cosecha oscila entre 45 a 65 t de tomate/ha (FAO, 2022).

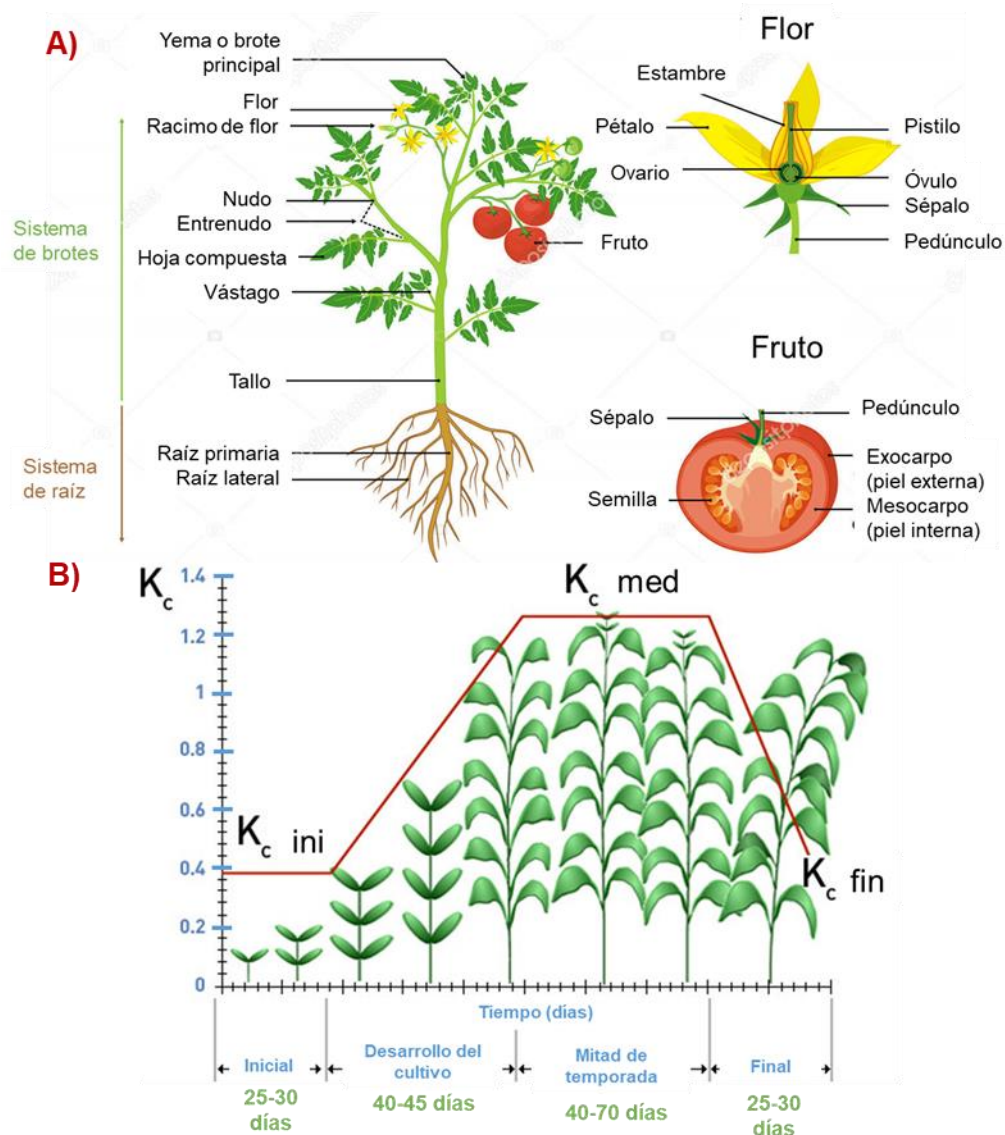


Figura 1. Botánica de la planta del tomate rojo y estadios de la planta.

A) Partes de la planta; B) Etapas del cultivo de tomate rojo con los coeficientes de cultivo ( $K_c$ ) para la gestión del agua. Tomado y modificado de: (FAO, 2022)

### 2.2.2 Producción y exportación del cultivo de tomate rojo en México

En México, el cultivo del tomate rojo representa la hortaliza de mayor producción y se cultiva para atender tanto las necesidades del mercado nacional, como

internacional. Durante el 2021, se cultivaron más de 3,300 millones de t siendo Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco y Baja California Sur las principales entidades federativas productoras (SIAP, 2022).

El cultivo del tomate rojo presenta disponibilidad media a lo largo del año y en los meses de octubre y noviembre se localiza la producción más alta. México se posiciona como el noveno productor a nivel mundial, siendo China el principal país productor. México exporta dicha hortaliza principalmente a EUA con un valor aproximado de 1.9 mil millones de dólares americanos; otros países de destino son Canadá, Japón, Emiratos Árabes Unidos y Singapur (SIAP, 2022).

### II.III. Lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es otro vegetal popular, originario de Europa o Asia y se ha cultivado desde hace 2,000 años (Capinera, 2020). Es una planta herbácea anual, la cual pertenece a la familia *Asteraceae* (Ushiña Simbaña, 2020). Posee una raíz gruesa, que puede tener hasta 60 cm de profundidad. Durante la etapa reproductiva, un tallo simple termina en inflorescencia, que contienen de 12-20 floretes, los cuales contienen pétalos amarillos con 5 dientes (Figura 2A y 2B) (Saavedra et al., 2017).

Esta hortaliza por lo general es de color verde intenso en la punta de las hojas, con disminución de su tonalidad en dirección al tallo (Kim et al., 2016; Saavedra et al., 2017; SIAP, 2018a). Presenta gran diversidad que permite la clasificación en seis principales tipos de lechugas, basados en la forma de la hoja, textura, tamaño, formación de la cabeza y el tipo de tallo de la hoja. Éstos son: lechuga iceberg (var. *capitata* L. *nidus jaggeri* Helm) (1); lechuga mantecosa (2); lechuga romana o cos (3); lechuga de hojas o de corte (4); lechuga de tallo (5) y lechuga Latina (6) (Kim et al., 2016).

La lechuga, debido a su suave y refrescante sabor, es ingerida en una gran variedad de recetas, principalmente se usa como base para ensaladas mixtas, lo que permite una importante contribución de nutrientes para el ser humano (Ushiña Simbaña, 2020).





Figura 2. Botánica de la planta de la lechuga y estadíos.

A) Partes de la planta de la lechuga; B) Estadíos de la planta de lechuga (de izquierda a derecha): plántula, roseta, encabezamiento y etapa reproductiva.

Modificado de: Saavedra, 2017; SIAP, 2018<sup>a</sup>; Saavedra, 2017; SIAP, 2018<sup>a</sup>

Es, además, fuente importante de carbohidratos de baja digestibilidad, por tanto, es baja en calorías. Su consumo provee fibra dietaria, que está asociado con beneficios a la salud, es decir, un aumento en la fibra dietaria contribuye en la pérdida de peso, y como consecuencia se disminuye el riesgo asociado con las enfermedades cardiovasculares y el cáncer de colon (Kim et al., 2016). Finalmente, la lechuga es fuente importante de minerales, compuestos bioactivos, como carotenoides y fenólicos, vitaminas, entre otros, que le otorgan propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes (Ushiña Simbaña, 2020).

En EUA durante el año 2017, el consumo de lechuga de las variedades iceberg, mantecosa, white Boston y Bibb, fue de 5.99 Kg per cápita (Bentley, 2019); mientras que en México el consumo per cápita fue de 2.2 Kg, para el año 2021 (SIAP, 2022).

### 2.3.1 Cultivo de la lechuga

La lechuga es una hortaliza de clima frío, con una ligera tolerancia a las heladas en las etapas iniciales de cultivo; cerca de la cosecha las hojas externas pueden sufrir quemaduras, siendo susceptibles a enfermedades (Saavedra et al., 2017).

Para que el cultivo de lechuga presente un alto rendimiento, requiere de buen suelo, bastante agua, temperatura durante el día de 18-25°C y temperatura nocturna de 10-15°C. En promedio, la temperatura óptima de crecimiento es entre 15-18°C, bajo estas condiciones se produce una cabeza más compacta. La temperatura mínima ideal de crecimiento es 12°C, puesto que a una temperatura inferior la planta no crece, mientras que, temperaturas superiores a 24°C generan un deterioro (Saavedra et al., 2017).

El crecimiento de la lechuga puede ser dividido en cuatro estadios: plántula, roseta, encabezamiento, dependiendo del tipo de la lechuga y del ciclo reproductivo (Figura 2B). Tanto el ancho como el largo de las hojas varían en función de la intensidad lumínica. Los días con alta intensidad lumínica (principalmente en primavera) dan como resultado hojas más anchas. Por el contrario, una baja intensidad lumínica (en invierno), se favorece el alargamiento de las hojas. Este tipo de cultivo se puede llevar a cabo en diferentes sistemas de producción, el cual depende primordialmente del clima o época del año, no obstante, la producción a campo abierto suele ser la más común (Saavedra et al., 2017).

### 2.3.2 Producción y exportación del cultivo de la lechuga

En México, durante el 2021, se cultivaron más de 509,000 t siendo las principales entidades federativas productoras de lechuga Guanajuato, Zacatecas, Puebla, Aguascalientes y Baja California; en el séptimo lugar se ubicó Querétaro con 20,808 t producidas (SIAP, 2022).

El cultivo de la lechuga presenta poca disponibilidad en los meses de noviembre y diciembre, la disponibilidad media ocurre en enero, marzo, mayo, junio, septiembre y octubre, mientras que la mayor disponibilidad es en los meses de febrero, abril, julio y agosto.

México se posiciona como el séptimo productor a nivel mundial, siendo China el

principal país productor (Kim et al., 2016; SIAP, 2022). México exporta dicha hortaliza principalmente a EUA con un valor aproximado de 259 millones de dólares americanos; también se exporta a otros países como Canadá, Belice, Costa Rica, Guatemala y Emiratos Árabes Unidos (SIAP, 2022).

Desde el 2014, México siembra principalmente cuatro tipos y/o variedades: baby leaf, escarola, romana e iceberg. Las lechugas baby leaf, “baby” se traduce como pequeño, y son brotes que son cosechados cuando su tamaño es pequeño entre 8-12 cm (Figura 3A). Este tipo de lechuga tiene mayor preferencia en el mercado gourmet, debido a su textura y colores variados; principalmente se cultiva en Baja California. La lechuga escarola, presenta un ligero sabor amargo que le brinda un sabor característico, con alto contenido de ácido fólico (Figura 3B); principalmente se cultiva en CDMX. Por otra parte, la lechuga romana tiene hojas largas que envuelven al tallo, con una textura crujiente y color verde oscuro (Figura 3C) y se cultiva primariamente en Puebla y Guanajuato. Finalmente, la variedad iceberg es la variedad más cultivada, tiene forma de ovillo compacta, similar a una col, sus hojas son redondas, de sabor suave. En la gastronomía mexicana, se usa este tipo de lechuga como complemento en los sándwiches, tacos dorados y tostadas, entre otros (Figura 3D); los principales estados asociados con la producción de la lechuga iceberg son Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes (SIAP, 2018a).

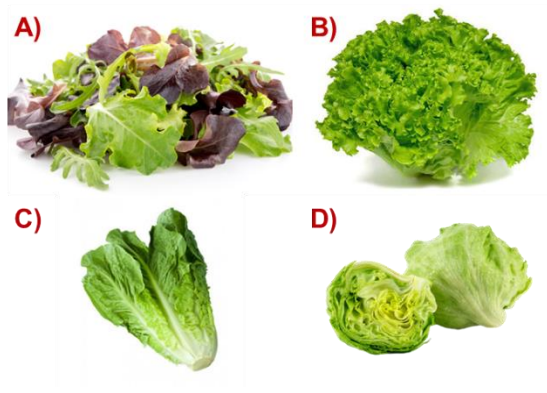


Figura 3. Principales tipos de lechugas cultivadas en México.

A) Lechuga baby leaf; B) Lechuga escarola; C) Lechuga romana; D) Lechuga

iceberg. Modificado de: Saavedra, 2017; SIAP, 2018<sup>a</sup>; Saavedra, 2017; SIAP, 2018<sup>a</sup>

#### II.IV. Fresa

La fresa (*Fragaria ananassa D.*) es una fruta que pertenece a la familia de las bayas y fue descubierta por los europeos en el año 1588. La fresa era usada como una planta medicinal, sin embargo, Carlos Lineo la introdujo como una fruta comestible (Samia et al., 2019). Los franceses fueron los primeros en cultivar la fresa, debido a las propiedades nutricionales aportadas por dicha fruta, es decir, alto contenido en vitamina C, A y E,  $\beta$ -caroteno, licopeno, quercetina, tocoferol, antocianinas y demás compuestos bioactivos que reducen la incidencia en cáncer y enfermedades coronarias, además de vitaminas, potasio, fibra que poseen efecto antiinflamatorio, antioxidante (Samia et al., 2019).

Aunque la fresa no es originaria de México, se ha convertido en uno de los principales cultivos de importancia tanto de exportación como de consumo nacional, incorporando dicha baya en un sinfín de platillos como atole, tamales, mermeladas y diversos postres (Larousse, 2022).

El consumo anual per cápita durante el 2021 en México fue de 1.6 Kg (Ornelas et al., 2020), mientras que en EUA para el 2020 fue de aproximadamente 3.8 Kg (Shahbandeh, 2022).

##### 2.4.1 Cultivo de la fresa

La planta es del tipo herbáceo pequeño, se compone tanto de raíces como de raicillas (fasciculado) poco profundas de 40 cm, encontrándose el 90% del sistema radicular en los primeros 25 cm. Las hojas son compuestas (trifoliadas). El tiempo de producción de las fresas, dura aproximadamente 2 años. El tallo se encuentra constituido por un eje corto de forma cónica, llamado corona. Las inflorescencias se pueden desarrollar a partir de una yema terminal de la corona o de las yemas terminales de las hojas (Figura 4A) (Loeza, 2018).

Las etapas del desarrollo de la planta de la fresa son: vegetativa, productiva y reproductiva (Figura 4B). En la etapa vegetativa las yemas principales comienzan a crecer, ocurre el desarrollo de las hojas. En la etapa reproductiva ocurre la aparición del órgano floral y la etapa de la floración, y en la etapa productiva, el fruto se forma y madura (Loeza, 2018).

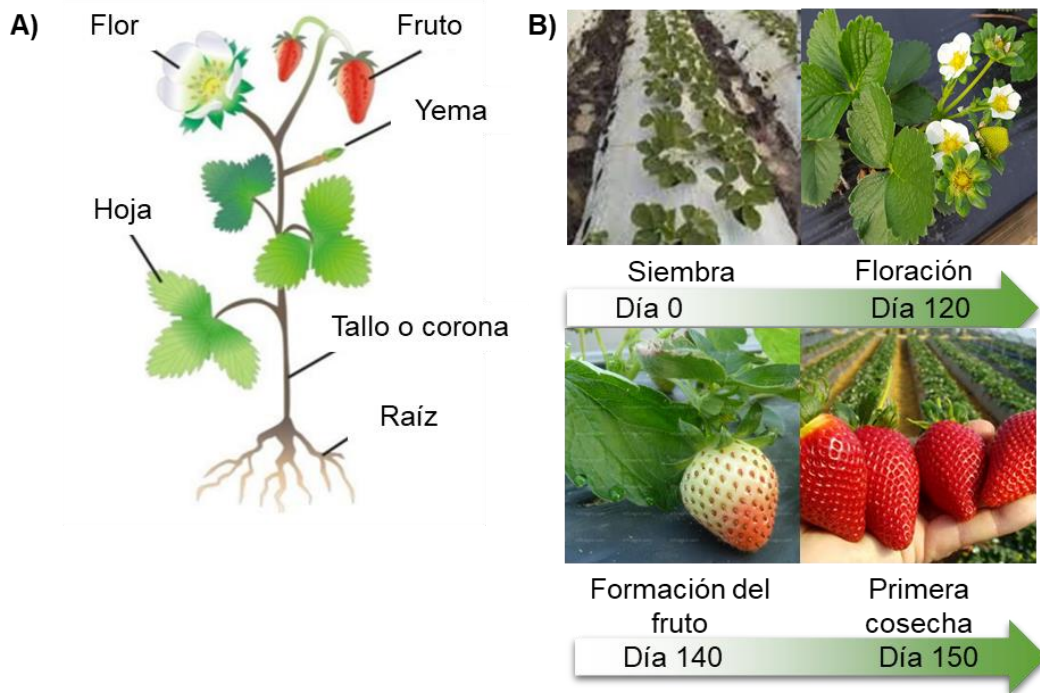


Figura 4. Botánica de la planta de la fresa y estadíos.

A) Partes de la planta de la fresa; B) Estadíos del desarrollo de la planta de la fresa.

#### 2.4.2 Producción y exportación de la fresa en México

En México, el cultivo de la fresa representa una de las bayas de mayor producción y se cultiva para atender tanto las necesidades del mercado nacional, como internacional. Durante el 2021, se produjeron 543 millones de t siendo Michoacán, Guanajuato, Baja California, México y Baja California Sur las principales entidades federativas productoras (SIAP, 2022).

El cultivo de la fresa presenta mayor disponibilidad en los meses de enero, mayo y

junio; sin embargo, también existe (aunque con menor disponibilidad) en los meses de febrero, marzo, abril y julio. México se posiciona como el cuarto productor a nivel mundial. El principal país a donde México exporta dicha fruta es a EUA con un valor aproximado de 1,100 millones de dólares americanos; otros países de destino son Canadá, Kuwait, Arabia Saudita, Hong Kong, Guatemala, Emiratos Árabes Unidos, Japón, Reino Unido, Panamá y Qatar (SIAP, 2022).

#### II.V. Enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas

El incremento en el consumo de frutas y verduras se asocia también, con una mayor incidencia de enfermedades transmitidas por los alimentos (Carstens et al., 2019).

Debido a que los productos hortofrutícolas (PH) frescos son productos mínimamente procesados, es decir, son sometidos a procesos de lavado, desinfección y empaclado, no existe un proceso que garantice la completa eliminación de microorganismos patógenos (Carstens et al., 2019). Lo anterior resulta de gran importancia no solamente en materia de salud pública, sino que también repercute en la pérdida de productividad, comercio y turismo (Shimizu, 2022).

Las enfermedades transmitidas por los productos hortofrutícolas incluyen un amplio espectro de padecimientos, que pueden ir desde una diarrea, hasta el desarrollo de cáncer, sin embargo, generalmente se relacionan con padecimientos gastrointestinales (Shimizu, 2022).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), de entre ellas la diarrea, se considera como un problema primordial, debido a su alta incidencia y mortalidad en todos los países del mundo, independientemente del nivel de desarrollo (Hadjilouka & Tsaltas, 2020; Shimizu, 2022). No obstante, existe una prevalencia en los países subdesarrollados, debido a la falta de infraestructura de saneamiento para el agua, y a que existe mayor población vulnerable (niños menores a 5 años, adultos mayores, entre otros) (Hadjilouka & Tsaltas, 2020; Shimizu, 2022). La diarrea es considerada como la segunda causa de muerte en niños menores a 5 años. Durante el 2015, 1.3 millones de personas murieron de diarrea de las cuales 525,000 fueron menores a 5 años; cifra que ha mostrado ser constante anualmente (Brouwer et al.,

2018; Hadjilouka & Tsaltas, 2020).

En EUA durante el periodo de 1996 a 2014, el consumo de productos hortofrutícolas contaminados ocasionó un tercio del número total de brotes reportados, de los cuales, el 80% se vincularon a productos importados (Li et al., 2018).

#### 2.5.1 Brotes asociados con el consumo de tomate rojo fresco

En EUA, a lo largo del tiempo, el consumo del tomate fresco se ha asociado con múltiples casos de enfermedad y brotes. Entre los brotes asociados a matrices complejas de alimentos que incluyeron tomate como ingrediente, destaca el reportado en EUA en 1979 en Massachusetts en un hospital debido al consumo de una ensalada que contenía lechuga, apio y tomate rojo. Se identificó a *Listeria monocytogenes* como el agente etiológico que afectó a 20 personas de las cuales 5 fallecieron. En agosto del 2004, en Washington se reportó un brote en el que resultaron infectadas seis personas con *Escherichia coli* O157:H7 y el alimento implicado fue el consumo de una salsa en un restaurante. Un año después, ocurrió otro brote causado por *E. coli* O157:H7 debido al consumo de salsa, de igual manera en un restaurante, reportando tres personas infectadas. Finalmente, en mayo del 2016 en Colorado, se volvió a identificar a *E. coli* O157:H7 como el agente etiológico de un brote en un restaurante asociado con el consumo de una ensalada que contenía tomate, lechuga y pepino, reportando 9 casos (Krug et al., 2020).

Dentro de los principales brotes en donde se logró confirmar que el tomate era el vehículo de *Salmonella*, destacan varios brotes multiestatales en los EUA. En 2002, 2005, 2006, 2007, 2010 y 2011 se identificó a *S. Newport* como el agente etiológico, a tomate consumido en restaurantes o en el hogar con 952 personas enfermas de salmonelosis. Otros serotipos también se han visto involucrados con brotes multiestatales: *S. Baildon* en 1998, en el cual se reportaron 86 enfermos y 3 decesos; en el 2000 *S. Thompson* originó un brote que afectó a 43 personas que consumieron tomate en el hogar; en 2005 se identificó a *S. Braenderup* debido al consumo de tomate en un restaurante enfermando a 84 personas; en 2006 *S. Typhimurium* infectó a 192 personas; en 2010, se identificó a *S. Javiana* con 30

personas; afectadas en 2013 se detectó a *S. Saintpaul* en 131 personas, y en 2015, 19 personas fueron afectadas debido al consumo de jitomate contaminado de *S. Hartford* en un restaurante (Krug et al., 2020).

#### 2.5.2 Brotes asociados con el consumo de lechuga fresca

La lechuga es otro alimento implicado en múltiples brotes de enfermedad en EUA. En el periodo de 2010 al 2017 ocurrieron cinco brotes asociados al consumo de lechuga romana, en los cuales se identificó a *E. coli* patógena como el agente etiológico. De éstos cinco brotes, cuatro se vincularon con el serotipo O157:H7. De la misma manera, ensalada empaquetada que contenía lechuga, estuvo involucrada en otro brote multiestatal que afectó a 9 estados de julio 2015 a enero 2016. La lechuga se encontraba contaminada con *L. monocytogenes*; los 19 casos reportados tuvieron que ser hospitalizados y se registró un fallecimiento (Carstens et al., 2019).

Recientemente, de junio a agosto del 2021, el Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) reportó un brote multiestatal de salmonelosis en el cual 31 personas resultaron afectadas; con base en la investigación, varias presentaciones de ensalada empacada estaban contaminadas con *S. Typhimurium* (CDC, 2021).

#### 2.5.3 Brotes asociados con el consumo de la fresa

De acuerdo con la información recabada por el Sistema Nacional de Reportes de Brotes (NORS, por sus siglas en inglés) del CDC, la fresa ha sido implicada en varios brotes (Tabla 1).



Tabla 1. Microorganismos patógenos involucrados en brotes de fresa en EUA de 1998 al 2019.

<b>Año</b>	<b>Agente patógeno</b>	<b>Enfermos</b>	<b>Hospitalizados</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Lugar</b>
2011	<i>E. coli</i> O157:H7	21	8	Fresas; sandía	Hogar
2003; 2019	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i>	110	22	Fresas	Hogar; tienda

Tomado de: CDC, 2022.

#### II.VI. Contaminación microbiana de frutas y hortalizas

Cuando se estudia la inocuidad de frutas y verduras a lo largo de la cadena de producción desde el campo hasta la mesa, se puede evidenciar que la contaminación microbiológica puede ocurrir en múltiples etapas del proceso. Es decir, puede ocurrir en el cultivo y/o en la cosecha, identificando de manera relevante al suelo y el agua como los principales reservorios de microorganismos. También puede ocurrir durante la preparación o el lavado postcosecha, en las cadenas de transporte o distribución, en los puntos de venta, o en la etapa final de preparación en donde el manejo higiénico de los alimentos por los consumidores es determinante (Figura 5) (Possas et al., 2021).

Se ha observado que existe una relación entre la prevalencia de los microorganismos patógenos en los productos hortofrutícolas y la época del año en la cual se cultiva. Dicha dependencia varía en función de factores extrínsecos, tales como la humedad, la temperatura y la radiación solar. No obstante, la sobrevivencia de los microorganismos patógenos en el producto depende de las condiciones climáticas, el tipo de cultivo y las características intrínsecas de los microorganismos patógenos (Machado-Moreira et al., 2019).

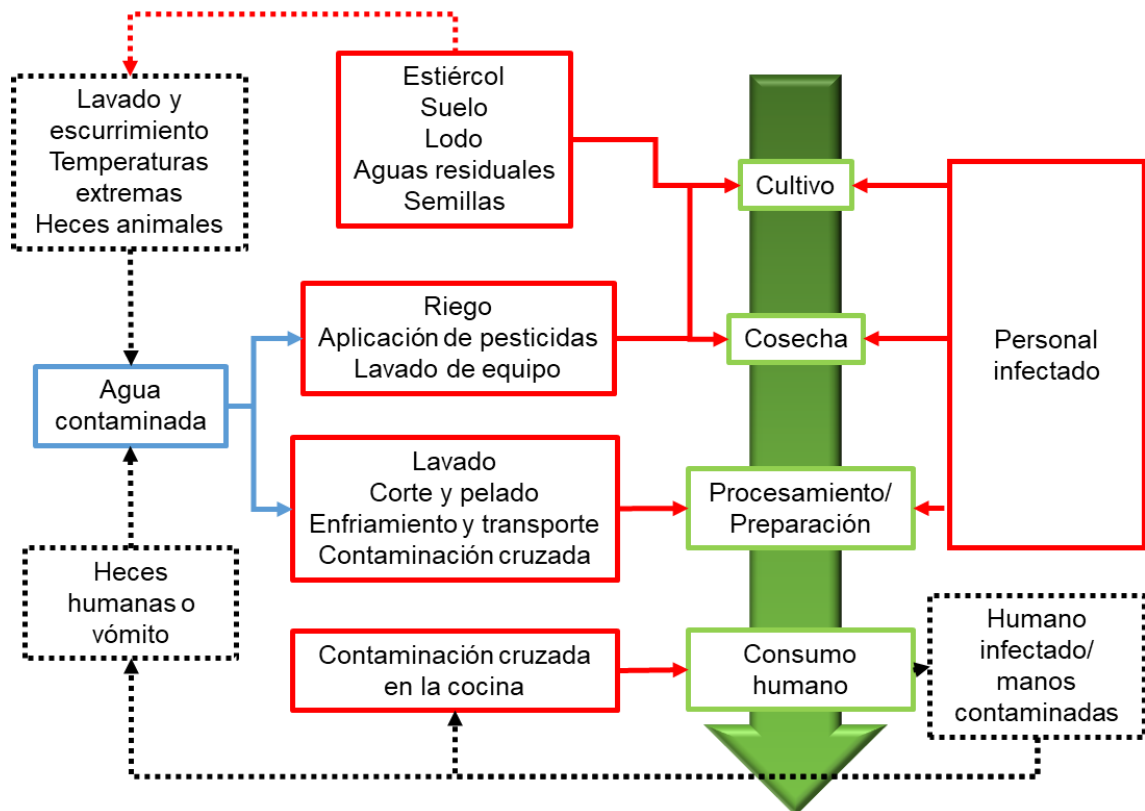


Figura 5. Fuentes de contaminación microbiana de productos alimenticios listos para consumo durante la cadena del campo a la mesa.

Cuadros verdes: pasos involucrados para la obtención del alimento, desde el campo hasta la mesa. Cuadros rojos: posibles eventos de contaminación durante la producción. Cuadro azul: contaminación transmitida por el agua. Líneas discontinuas: fuentes de contaminación microbiana de agua o del personal.

Tomado de: Machado-Moreira et al., 2019

Dado que la mayoría de los PH crecen bajo suelo o cerca de éste, los microorganismos que habitan en el suelo, el agua y la vegetación, pueden estar también presentes en ellos. Se ha determinado que la carga microbiana presente en PH antes de su procesamiento mínimo oscila entre  $10^3$ - $10^9$  UFC/g y posterior a este entre  $10^3$ - $10^6$  UFC/g (Carstens et al., 2019). Los tres principales

microorganismos patógenos de origen bacteriano de mayor importancia, debido a su alta prevalencia en estos productos son: *S. enterica*, *E. coli* y *L. monocytogenes* (Tabla 2) (Banach & van der Fels-Klerx, 2020; Carstens et al., 2019; McDaniel & Jadeja, 2019).

Tabla 2. Características de los principales microorganismos patógenos asociados a brotes de productos hortofrutícolas.

Patógeno	Dosis infectante (UFC)	Periodo de incubación	Fuentes o mecanismos de transmisión
<i>S. enterica</i>	<10-10 <sup>7</sup>	5 a 72 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos contaminados con materia fecal humana o animal.</li> <li>• Agua.</li> <li>• Alimentos contaminados con materia fecal humana o animal.</li> </ul>
<i>E. coli</i> O157:H7	10-1000	1 a 10 días	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua.</li> <li>• Contaminación cruzada durante la preparación de alimentos.</li> </ul>
<i>L. monocytogenes</i>	10 <sup>1</sup> -10 <sup>7</sup>	1 día a 4 semanas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua, agua de desecho, suelo, vegetación, ambientes de procesamiento de alimentos.</li> </ul>

Tomado de: Banach & van der Fels-Klerx, 2020; Williams-Woods et al., 2014

### 2.6.1 Principales patógenos

#### *Salmonella enterica*

*S. enterica* es un microorganismo patógeno Gram negativo; en forma de bastón; anaerobio facultativo; no formador de esporas. Se ha observado que los serotipos de este patógeno pueden desarrollar en un rango de temperatura de 8 a 45°C, a pH de 4.0 hasta 9.5 y sobrevivir a  $A_w=0.94$ . La materia fecal de animales y humanos puede contener a dicho patógeno, lo cual puede generar la contaminación de suelo y agua. El cuadro clínico provocado por *Salmonella* se denomina salmonelosis; normalmente se manifiesta con episodios de gastroenteritis o fiebres entéricas, siendo de principal interés la gastroenteritis, cuyos síntomas se manifiestan en un tiempo de incubación de 5 a 72 h (Carstens et al., 2019).

Existen seis subespecies de *S. enterica*, las cuales son: (I) *enterica*, (II) *salamae*, (IIIa) *arizonae*, (IIIb) *diarizonae*, (IV) *houtanae* e (V) *indica*, siendo que *S. enterica* subsp. *enterica* (I) alberga la mayor cantidad de serovares patógenos para el humano (Carstens et al., 2019).

En EUA, se estima que el 94% de las infecciones de *S. enterica*, no tifoidea, son transmitidas por los alimentos (Carstens et al., 2019). Durante 2010 al 2015, *Salmonella* spp. fue el segundo principal agente etiológico, involucrado en 197 brotes, equivalente al 19.9% (Li et al., 2018). De todos los serotipos, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*), es uno de los más prevalentes en países en vías de desarrollo, incluido México (Kisluk & Yaron, 2012). Se estima que cada año en EUA, un millón de personas se enferman de salmonelosis, de los cuales el 27.2% son hospitalizados (Carstens et al., 2019).

#### *Escherichia coli*

Es un microorganismo coliforme, Gram negativo, en forma de bastón, anaerobio facultativo y forma parte de la microbiota intestinal en animales y seres humanos, motivo por el cual es usado como un microorganismo indicador para evidenciar la exposición del agua y/o suelo contaminado con materia fecal (Carstens et al., 2019;

Rani et al., 2021). Algunas cepas de *E. coli* pueden proliferar a temperaturas bajas (7°C) o altas (46°C), no obstante, la temperatura óptima de desarrollo es de 37°C. De manera importante, se ha podido observar que este microorganismo puede persistir en el ambiente con 6% de cloruro de sodio (NaCl) y pH >5.4. Existen cepas patógenas de *E. coli* que pueden ser vehiculizadas por alimentos. De acuerdo con su patogenicidad, se clasifican en seis diferentes patotipos (Carstens et al., 2019):

1. *E. coli* enteropatógena (EPEC): asociado principalmente a niños, aunque también puede infectar a adultos en dosis infectantes de  $10^8$ - $10^{10}$  UFC.
2. *E. coli* productora de toxina Shiga/ *E. coli* enterohemorrágica (STEC/ EHEC), también referida como *E. coli* verotoxigénica (VTEC): VTEC es capaz de producir infecciones con dosis infectantes bajas de <1,000 UFC. El serovar de STEC de mayor prevalencia en brotes asociados al consumo alimentos es el O157:H7. Sin embargo, hay otros de relevancia epidemiológica (*big six*) en EUA O26, O45, O103, O111, O121 y O145. Mientras que, en Europa los serotipos más frecuentes son O91 y O145 (Hunt, 2010).
3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): su cuadro clínico puede parecerse o confundirse con una infección ocasionada por *Shigella*, con una dosis infectante de  $10^6$ - $10^8$  UFC.
4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC): es uno de los principales agentes etiológicos, responsable de cuadros de diarrea en viajeros con dosis infectantes de  $10^{10}$  UFC.
5. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC): otro de los principales agentes etiológicos, responsable de cuadros de diarrea en viajeros con dosis infectantes elevadas ( $10^8$  UFC).
6. *E. coli* difusamente invasiva (DAEC): de mayor persistencia en niños, con cuadros de diarrea.

Cualquiera de estos seis patotipos pueden ocasionar cuadros agudos de diarrea. Sin embargo, *E. coli* O157:H7 es considerada como una de las cepas más patógenas del género *Escherichia*, cuya dosis mínima infectante es  $10^1$ - $10^2$  UFC

(Rani et al., 2021). Dicho microorganismo patógeno puede transmitirse a través de los alimentos; con contacto de persona a persona; contacto con animales infectados e ingiriendo agua contaminada. Los principales síntomas asociados con la infección generada por *E. coli* O157:H7 son: gastroenteritis, diarrea sanguinolenta, colitis, síndrome urémico hemolítico que incluso puede llegar a ocasionar la muerte (Carstens et al., 2019).

Entre 1982 y 2006 este serotipo estuvo involucrado en 350 botes, de los cuales el 52% estuvo vinculado con alimentos, principalmente ensaladas y el 9% con agua (Rani et al., 2021). En el año 2020 en el Reino Unido, el pepino fue el principal vehículo transmisor de la cepa *E. coli* O157:H7, donde 36 personas resultaron enfermas (Possas et al., 2021). Se estima que cada año en EUA, ocurren 63,153 casos de *E. coli* O157:H7 transmitido por alimentos, con un índice de hospitalización del 46.2%, lo cual genera un costo aproximado de 255 millones de dólares (Carstens et al., 2019).

### *Listeria monocytogenes*

Microorganismo patógeno Gram positivo, en forma de bastón, anaerobio facultativo, no formador de esporas, con ubicuidad en el ambiente. La temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 30-37°C, aunque, también puede crecer en un rango de -2 hasta 45°C; con valores de pH de 4.0–9.5 y concentración de NaCl de hasta 10%. Lo anterior es de importancia, dado que no solamente puede persistir, sino proliferar a temperaturas óptimas de refrigeración (3 a 4°C); posee con una gran capacidad de formación de biopelículas, lo que les otorga resistencia a factores de estrés ambiental, complicando su eliminación en procesos de lavado y desinfección. La principal vía de exposición a *L. monocytogenes* es mediante la ingesta de alimentos contaminados (Carstens et al., 2019).

Se han identificado al menos doce serovares, los cuales se encuentran distribuidos en cuatro categorías llamados linajes. El linaje I comprende los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, y 4e, los cuales están principalmente asociados en brotes de listeriosis por

consumo de alimentos. Por otra parte, el linaje II contiene los serovares 1/2a, 4a, 1/2c, 3a, y 3c, que son menos frecuentes. Los linajes III y IV son poco frecuentes en la naturaleza (Carstens et al., 2019).

El cuadro clínico de listeriosis puede ser asintomático, causar gastroenteritis o bien una enfermedad sistémica. Una infección invasiva causada por *L. monocytogenes* puede derivar en: casos de septicemia, meningoencefalitis, inflamación del cerebro y los tejidos adyacentes a causa de una infección y abortos. La listeriosis presenta un alto índice de letalidad (entre 20 y 30%), con un periodo de incubación de hasta 70 días (Carstens et al., 2019).

Cada año en EUA, se estima que ocurren 1,600 casos de listeriosis, que, si bien la incidencia de este microorganismo patógeno es baja, presenta un alto índice de hospitalización (94%), de los cuales se estima que 260 personas fallecen (Carstens et al., 2019; McDaniel & Jadeja, 2019). De acuerdo con el CDC, la enfermedad de listeriosis es la tercera causa de muerte asociada a brotes alimentarios de origen bacteriano (McDaniel & Jadeja, 2019). Anteriormente se relacionaba a *L. monocytogenes* con productos procesados de origen animal, identificando el serovar 4b como el agente etiológico. No obstante, a partir del 2008 se han registrado brotes vinculados a productos frescos: melón cantaloupe en 2011, manzanas acarameladas en 2014, entre otros, reportando principalmente los serotipos 1/2a y 1/2b (Garner & Kathariou, 2016).

### 2.6.2 Sistemas de riego

El agua es uno de los recursos naturales más importantes para la vida. Es esencial para humanos e indispensable en los ecosistemas (Canizalez-Roman et al., 2019; Machado-Moreira et al., 2019). En este sentido, el término “agua agrícola” (AgWA) se destina al agua que se usa para el riego de los cultivos; sin embargo, el agua también se usa para la aplicación de plaguicidas, pesticidas, control de heladas, entre otros.

En el contexto de la Ley de Modernización de la Inocuidad de EUA se considera agua de uso agrícola a: “*el agua utilizada en actividades cubiertas por la Norma en*

*productos cubiertos por la Norma, donde el agua está destinada a, o es probable que tenga contacto con los productos agrícolas frescos cubiertos por la Norma o con superficies de contacto con alimentos, incluyendo el agua utilizada en las actividades de producción (incluyendo el agua de riego que se aplica usando métodos de aplicación directa, agua utilizada para preparar aspersiones en el cultivo y agua utilizada para el cultivo de germinados) y en actividades de cosecha, empaque y almacenamiento (incluyendo el agua utilizada para lavar o enfriar los productos agrícolas frescos cosechados y el agua utilizada para evitar la deshidratación de los productos agrícolas frescos cubiertos por la Norma)” (FDA, 2023)*

Las principales fuentes de AgWA son: el agua superficial, el agua profunda y el agua de lluvia (CDC, 2016; Subedi, 2022). Dentro del agua superficial, se incluyen a los ríos, arroyos, canales abiertos, acequias, lagos y estanques; el agua subterránea se concentra en pozos, mientras que el agua de lluvia se almacena en cisternas o barriles de lluvias (CDC, 2016).

Tanto el agua profunda, como el agua de lluvia, se podrían considerar hasta cierto punto seguras, dado que presentan una menor probabilidad de contaminación con microorganismos patógenos (Banach & van der Fels-Klerx, 2020). Sin embargo, debido al cambio climático, la disponibilidad de agua de buena calidad se ha convertido en un reto, incrementando la necesidad del uso de agua de menor o baja calidad, la cual puede presentar materia orgánica y contaminación fecal, derivado de la actividad humana y ganadera, que pueden acarrear un sinnúmero de microorganismos patógenos, incluidos los mencionados anteriormente en el apartado 2.5 de este documento (Kisluk & Yaron, 2012).

El riego consiste en el proceso de aplicación de agua al suelo, durante la producción agrícola; esta práctica ayuda a maximizar el rendimiento del cultivo, sobre todo en periodos de escasez de lluvias (Subedi, 2022). La vía de administración del agua de riego, es otro aspecto relevante; la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), en el año 2007 publicó



la primera edición del Manual de Buenas Prácticas Agrícolas, donde se describen los diferentes sistemas de riego, el cual se elige con base en el tipo de cultivo, la necesidad de agua, frecuencia de riego, estadio de la planta, condiciones climáticas de la zona, entre otros (Banach & van der Fels-Klerx, 2020; Red de BPA, 2015). Los principales tipos de riego son: por goteo, por aspersión, por gravedad, entre otros (Figura 6) (SIAP, 2018b).

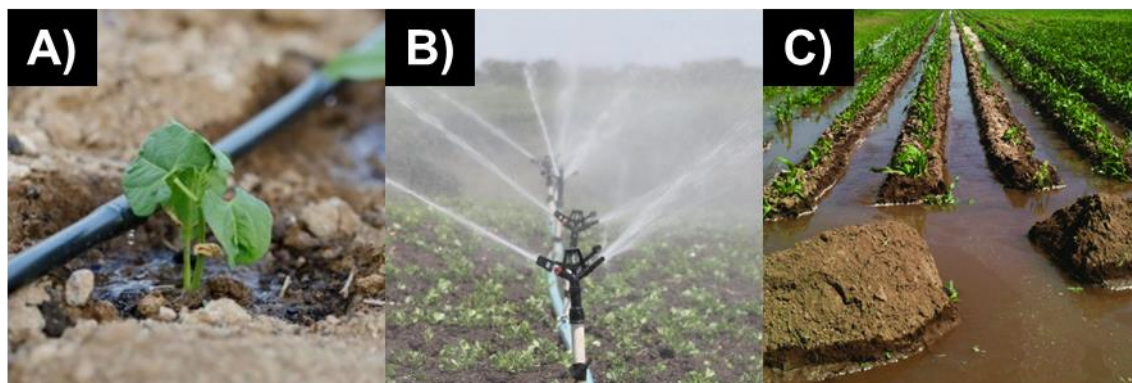


Figura 6. Principales sistemas de riego aplicados en México.

A) Riego por goteo; B) Riego por aspersión y C) Riego por gravedad. Tomado de: SIAP, 2018b

En el riego por goteo mediante un sistema de válvulas, tuberías y mangueras, se suministra la cantidad de agua necesaria para cada planta, la cual cae directamente sobre el suelo (SIAP, 2018). De esta forma hay un mejor aprovechamiento del agua, hay mayor uniformidad de riego, menor problema de maleza, y el contacto con la parte comestible del cultivo es mínimo (Red de BPA, 2015).

En la técnica de riego por aspersión, el agua llega al cultivo mediante tuberías y aspersores, que humedecen el suelo de una manera análoga a la lluvia, teniendo contacto el agua de riego con la planta antes que con el suelo. Finalmente, en el riego por gravedad, también conocido como de superficie, el agua se distribuye a lo largo del cultivo mediante canales o surcos. Este tipo de riego solamente se puede llevar a cabo cuando el agricultor cuenta con un estanque grande y el declive del

terreno lo permite (SIAP, 2018b).

Con el fin de evaluar el sistema de riego que ofrece mayor seguridad e inocuidad, en un estudio se experimentó con un cultivo de lechuga donde se comparó el sistema de riego por goteo y por aspersión usando agua contaminada con *E. coli* como microorganismo indicador. Las lechugas que se regaron con la técnica de goteo presentaron hasta  $2 \log_{10}$  UFC menos que las lechugas regadas por aspersión. Los autores concluyeron que entre más contacto tenga la planta con el agua de riego, mayor es la probabilidad de que se contamine el alimento (Banach & van der Fels-Klerx, 2020).

#### *Principales fuentes de abastecimiento de agua en Querétaro*

En México, la producción de frutas y verduras principalmente se lleva a cabo en estados con mayor precipitación pluvial, como: Veracruz, Tabasco, Nayarit, Michoacán, Oaxaca, Guerrero y Chiapas. Para las regiones desérticas y semidesérticas como Baja California norte y Sur, Sinaloa, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas y Guanajuato, tuvo que ocurrir una especialización de la tierra y del agua, es decir, dejar de producir en gran cantidad cultivos de hortalizas y frutas, que requieren gran cantidad de agua y/o sembrar cultivos de mayor importancia económica (Sánchez-Gómez, 2019).

Con relación a Querétaro, en base a los datos de precipitación pluvial de 1981 al 2010, la precipitación media anual en el estado fue de 609 mm, y varía desde los 400 mm en la región semidesértica, hasta 1,500 mm en la ladera de barlovento del macizo oriental de la Sierra Gorda. Los meses de junio a septiembre, son los que presentan mayor cantidad de lluvias; sin embargo, más de la mitad de la superficie del estado presenta clima semiseco o seco, lo que convierte a Querétaro en un productor agrícola minoritario (CONAGUA, 2018; SEMARNAT, 2009).

Querétaro posee cinco regiones hidrológicas, presas, las cuales son: El Centenario, Hidalgo, Divino Redentor, El Tepozán y la Venta. Los ríos Ayutla y Jalpan, además los afluentes del Río Santa María, al norte del estado, son las zonas en donde

concentra la mayor disponibilidad de agua superficial (Figura 6A) (CONAGUA, 2018).

Para contrarrestar los periodos de sequía, el gobierno federal otorga concesiones para la extracción de agua de fuentes profundas. En Querétaro, la extracción de agua subterránea constituye la principal fuente de abastecimiento de agua. De acuerdo con la CONAGUA, en el año 2017, le fue concesionado a Querétaro la extracción de 1,013 hm<sup>3</sup> (1 hectómetro cúbico ó hm<sup>3</sup> = 1,000,000 m<sup>3</sup>) de agua subterránea, de las cuales 641.7 hm<sup>3</sup> fueron destinadas a uso agrícola (Figura 6B) (CONAGUA, 2018; SEMARNAT, 2009). Por otra parte, durante el 2010 en México, el 5.4% de las aguas residuales generadas se destinaron para el riego de cultivos (Leonel & Tonetti, 2021).

Un distrito de riego, además, es una zona geográfica delimitada, que está conformado por los usuarios, áreas de cultivo, fuentes de abastecimiento (tanto superficial como subterránea, aunque normalmente es una presa), la infraestructura del sistema de riego (plantas de bombeo, canales, drenes, caminos), drenajes y edificios que administran el agua. En Querétaro, el distrito de riego se denomina San Juan del Río, el cual en el año 2017 contaba con 2,321 usuarios, con una superficie total de 9,285 h (CONAGUA, 2018).

#### *Microbiología del agua de riego en Querétaro*

El agua superficial de ríos, canales, estanques, entre otros, pueden ser reservorio de microorganismos patógenos para el humano (Machado-Moreira et al., 2019). Dado que están en contacto directo con el ambiente, la composición del agua es variable en función del tiempo y el lugar (Banach & van der Fels-Klerx, 2020). Además, los países de climas cálidos, como México, debido al aumento de la temperatura ambiental, también se incrementa la temperatura del agua almacenada durante el día, y si este recurso contiene materia orgánica, la carga microbiana también incrementa. Por lo tanto, es necesario realizar monitoreos frecuentes para evaluar la calidad microbiológica del agua. Si se llegara a usar este recurso sin

ningún tipo de tratamiento, el riesgo de que se produzcan aerosoles que repercutan en la salud de los trabajadores es alto, además de los daños a la salud ocasionados debido al consumo de productos hortofrutícolas contaminados (Walker, 2018).

El análisis de la calidad del agua consiste en la determinación y/o caracterización de propiedades físicas, químicas y microbiológicas del agua, para determinar cómo se encuentra con respecto a las normas oficiales y los estándares de calidad. Durante el 2017, la Red Nacional de Monitoreo, realizó muestreos en más de 5,000 sitios agua, localizados en zonas con alta influencia antropogénica, para evaluar la calidad de dicho recurso, con base en cuatro indicadores: demanda bioquímica de oxígeno a los 5 días ( $DBO_5$ ), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales (SST) y coliformes fecales (CF). Tanto  $DBO_5$  como DQO son indicadores de la materia orgánica en el agua, que evidencian contaminación con aguas residuales; la primera se refiere a la materia orgánica biodegradable, mientras que la segunda indica el total de materia orgánica. Los SST miden la cantidad de materia sedimentable; altos niveles de SST indican la poca capacidad que tiene el agua para soportar diversidad. Finalmente, los CF son ubicuos de los intestinos de animales y personas, los cuales se excretan por medio de las heces y dicho grupo de microorganismos es usado como un indicador, para evidenciar la presencia de contaminación de aguas residuales. Así pues, los resultados con respecto a la calidad del agua superficial en Querétaro mostraron que de las 54 muestras analizadas el 48.1% se encontraba en la categoría fuertemente contaminadas con coliformes fecales ( $>10,000$ ) (Figura 7C). En relación con la prueba de  $DBO_5$  el 33.3% de las muestras fueron de excelente calidad, mientras que, en la DQO el 31.5% se encontraban contaminadas. Finalmente, la mitad de las muestras de agua presentaron excelente calidad con respecto a los SST (CONAGUA, 2018).

El grado de salinización es otro parámetro que sirve para evaluar la calidad del agua subterránea: si el agua contiene  $<1,000$  mg/L, es considerada como dulce; si está entre 1,000 a 2,000 mg/L, es un agua ligeramente salobre; entre 2,000 y 10,000

mg/L se denomina salobre y concentraciones mayores a 10,000 mg/L, son aguas salinas. De las 54 muestras tomadas de agua subterránea, el 94.14% son consideradas como dulce, mientras que el 5.88% son ligeramente salobres (CONAGUA, 2018).

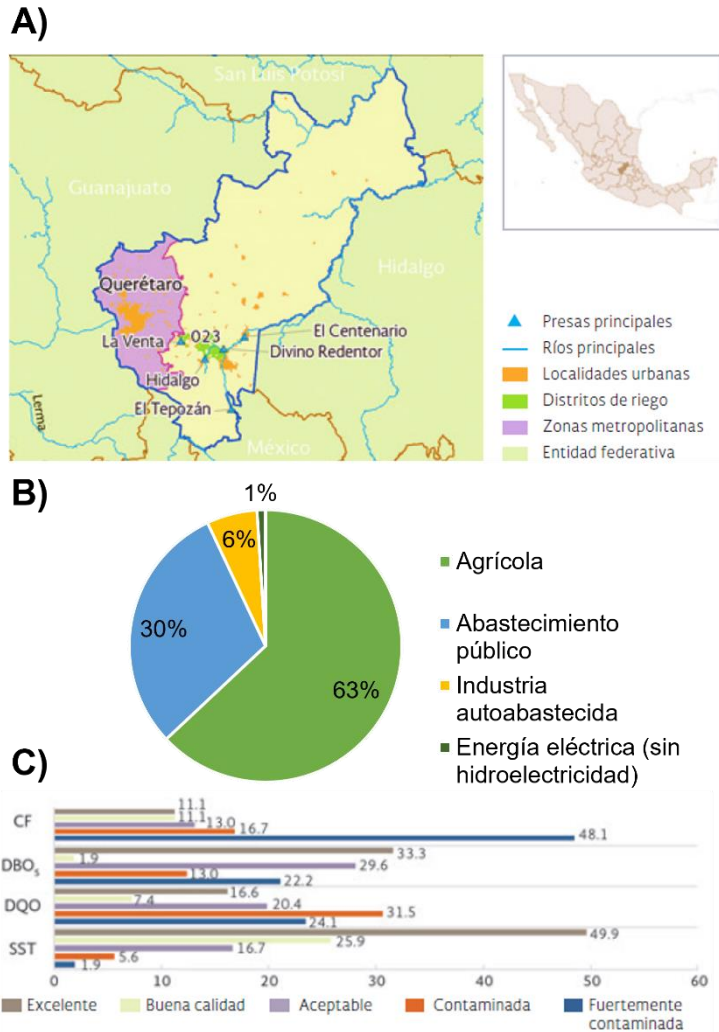


Figura 7. Agua en Querétaro, 2017.

A) mapa de Querétaro de la infraestructura hidráulica; B) usos del agua en Querétaro (hm<sup>3</sup>/año); C) distribución de los 54 sitios de producción por indicador y clasificación (%). Tomado de: CONAGUA, 2018

### *Microbiología del agua de lavado postcosecha*

El lavado postcosecha es una actividad demandante donde se requiere de gran cantidad de agua para su procesamiento y que varía en función del tipo de alimento, sin embargo, en promedio se requieren 10 L de agua/Kg producto. El reciclaje del agua es una práctica común en la industria agrícola, que tiene el objetivo de minimizar el gasto del agua, traduciéndose en beneficios económicos y ecológicos. Sin embargo, puede ser ineficiente para la remoción de microorganismos por varias razones: a) al transcurrir el tiempo, la concentración de materia orgánica, como el suelo y tejido de la planta, incrementan, haciendo que la eficacia de agentes desinfectantes se vea alterada o impedida (Machado-Moreira et al., 2019); b) los microorganismos patógenos pueden adherirse a la planta y en algunos casos internalizarse al fruto comestible, limitando su accesibilidad (López-Gálvez et al., 2019; Machado-Moreira et al., 2019).

Generalmente, el agua que se emplea para lavar las frutas y hortalizas se dispone en tanques grandes lo que puede favorecer la propagación de microorganismos patógenos vehiculizados por medio del agua, del producto contaminado al producto inocuo, a lo cual se le conoce como contaminación cruzada (Machado-Moreira et al., 2019). Existen factores que pueden mitigar o prevenir la contaminación cruzada en el agua de lavado postcosecha, pero dependen del sistema de lavado, el tipo de producto y su calidad, la relación agua:producto, el tipo de tratamiento antimicrobiano y su concentración. Además, la concentración del desinfectante debe estar constantemente monitoreada, para prevenir la contaminación cruzada entre los PH (López-Gálvez et al., 2019; Machado-Moreira et al., 2019).

#### 2.6.3 Suelo

El suelo es considerado como uno de los ecosistemas más complejos, constituido principalmente de hojarasca, roca inorgánica erosionada y materia orgánica. Para estudiarlo desde una perspectiva microbiológica, se deben conocer sus características fundamentales como: el tipo de suelo, el contenido de humedad y la materia orgánica presente. La salud del suelo es determinada por las interacciones

entre las propiedades físicas (como la capacidad de retención de agua), químicas (como el pH) y biológicas (Toor et al., 2021). Se estima que en un gramo de suelo pueden coexistir  $10^{12}$  especies microbianas diferentes (Brooks, 2015).

El suelo puede ser referido también como un “sustrato fértil”; no obstante, no todos los suelos son aptos para el cultivo agrícola. Para que un suelo pueda considerarse de buena calidad para la producción agrícola, debe de contener entre 0.5 a 2 mm de arena; 0.002 a 0.05 mm de limo y arcilla  $<0.002$ ; éstos últimos tres constituyen la textura de un suelo. Además de la textura (45%), el suelo debe contener materia orgánica (5%), y el espacio poroso (50%) que es ocupado por aire y/o agua (FAO, 2020a). Estos cuatro factores regulan el grado de retención y drenaje del agua; la cantidad disponible de oxígeno en la raíz y la disponibilidad de nutrientes, sin mencionar que el suelo, es el soporte físico de las plantas (Parikh & James, 2012). El rango de pH del suelo que permite la mayor disponibilidad de nutrientes para la planta oscila entre 5.5 a 7.5. Lo anterior es fundamental e impacta en el desarrollo y el rendimiento del cultivo (FAO, 2020a).

Por lo tanto, el productor o agrónomo, deberá implementar las BPA para minimizar la erosión del suelo, que normalmente es la capa superficial donde las plantas toman sus nutrientes (Parikh & James, 2012). La erosión es una de las principales amenazas que tiene el suelo y a pesar de que es un proceso natural, debido a la actividad antropocéntrica, la eliminación de la capa superficial del suelo ya sea por medio del agua, de la labranza o el viento, se ha visto acelerada (FAO, 2020b).

En México, durante el año 2014, la superficie de suelo destinada a la agricultura de temporal abarcó más de 226,000 km<sup>2</sup>; mientras que la agricultura de riego abarcó 102,000 km<sup>2</sup> (Figura 8A). En cuanto a Querétaro, la tendencia observada fue similar, siendo la agricultura de temporal la que presenta mayor superficie de suelo, seguido por la agricultura de riego (Figura 8B).

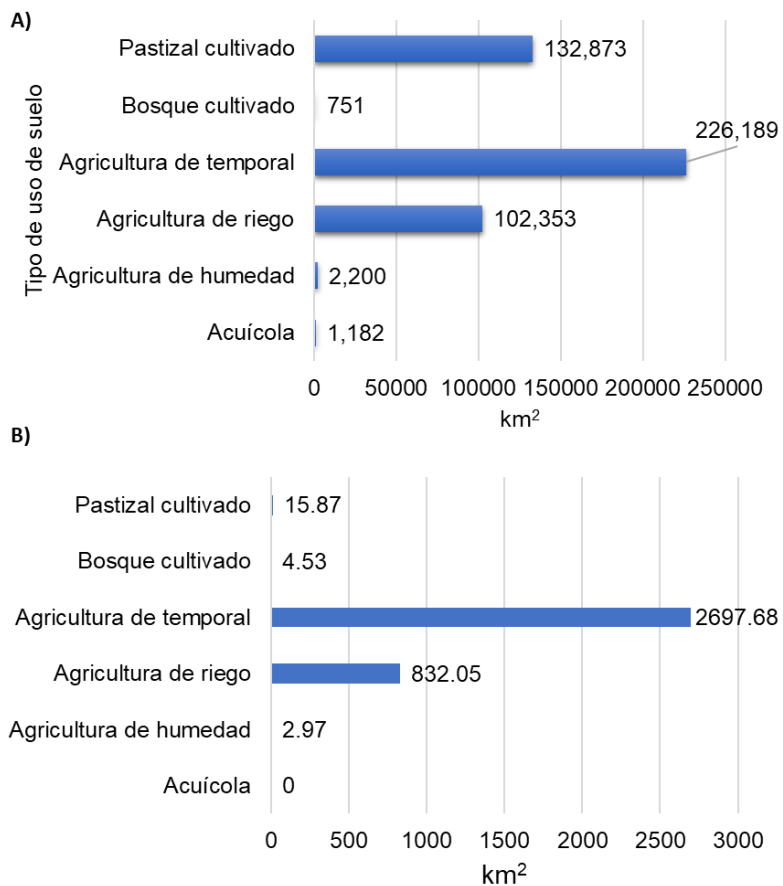


Figura 8. Superficie por tipo de uso de suelo en México, en 2014, en km<sup>2</sup>.

A) En México; B) En Querétaro. Tomado de: CONABIO, 2014.

### *Microbiología del suelo de uso agrícola*

Con el fin de garantizar el mayor rendimiento del cultivo, se requieren de ciertas concentraciones de micro y macronutrientes. Una práctica común para fertilizar el suelo de producción agrícola es, usar estiércol que además de ser una fuente rica en nutrientes, es económicamente viable; sin embargo, contiene elevadas concentraciones de microorganismos patógenos para el humano (Machado-Moreira et al., 2019).

De la misma manera, regar el cultivo con aguas negras o residuales, tanto



deficientemente tratadas, como no tratadas, puede introducir agentes contaminantes (Leonel & Tonetti, 2021). Otro posible mecanismo de contaminación de microorganismos, desde el suelo contaminado hasta el cultivo es mediante salpicadura de gotas de agua del riego (Machado-Moreira et al., 2019).

El manejo de un suelo contaminado incrementa la probabilidad de transferencia de los microorganismos patógenos a las manos de los trabajadores. Erickson et al. (2008) demostraron que patógenos como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, persisten en los guantes de nitrilo y de látex, después de su transferencia con la savia de lechuga contaminada, si no son desinfectados frecuentemente.

## II.VII. Sistemas empleados para el aseguramiento de inocuidad de productos hortofrutícolas

Pese a que las prácticas agrícolas se desarrollan en todo el planeta, estas varían ampliamente. Cada país tiene criterios y requerimientos legales específicos, en función de la calidad de producción, la calidad del agua usada para la producción y preparación (Machado-Moreira et al., 2019).

De acuerdo con la Comisión Europea (REC), en la regulación 852/2004 que es en referencia a la buena higiene en los alimentos, se especifica que deben implementarse las BPA durante el cultivo de los alimentos.

En el año del 2015 en EUA como parte de la Ley de Modernización de Inocuidad Alimentaria (FSMA, por sus siglas en inglés) de la FDA publicó la Norma para la Inocuidad de Productos frescos (PSR, por sus siglas en inglés) en el documento “Estándares para el crecimiento, cosecha, empaque y almacenamiento, de productos para consumo humano”. El documento establece las reglas a seguir, con el objetivo de obtener productos frescos inocuos. La norma está compuesta por las siguientes secciones: A) Disposiciones generales, B) Requisitos generales, C) Certificación y capacitación del personal, D) Salud e higiene, E) Agua de uso agrícola, F) Mejoradores biológicos de suelo de origen animal y desechos humanos, I) Animales domésticos y silvestres, K) Actividades de cultivo, cosecha, empaque y almacenamiento, L) Equipo, herramientas, edificios y saneamiento, M) Germinados,

N) Métodos analíticos, O) Registros, P) Variaciones, Q) Cumplimiento y aplicación de la norma, y R) Retiro de la exención calificada (FDA, 2016; Havelaar et al., 2017). Para asegurar una buena calidad en el agua para cosecha y postcosecha, Havelaar et al. (2017) sugiere inspeccionarla al menos una vez al año, cuyo resultado deberá ser: ausente o no detectada la presencia de *E. coli* genérica, en una muestra de 100 mL de agua (Banach & van der Fels-Klerx, 2020).

Uno de los requisitos que establece la PSR con respecto a la calidad del agua para riego, es: *“si se usa agua superficial para cultivos, mientras no sean brotes o germinados, se tiene que hacer un perfil microbiano de la calidad de agua (denominado MWQP) de al menos 20 muestras en un periodo de 2 a 4 años”*. Para analizar los resultados se usan dos parámetros para valorar la calidad microbiológica del agua de riego o producción: 1) La media geométrica (GM), que no debe de exceder de 126 UFC/100 mL y 2) el valor umbral estadístico (VUE), que es el valor del percentil 90 y no debe de exceder los 410 UFC/100 mL. Durante la cosecha y actividades postcosecha, no deberá detectarse *E. coli* genérica en 100 mL de agua analizada. Si el agua después de analizarse no cumple con los criterios microbiológicos, el agricultor deberá aplicar medidas correctivas, para poderla usar (Banach & van der Fels-Klerx, 2020; Havelaar et al., 2017).

Por otra parte, cuando la parte comestible del cultivo entra en contacto con el agua de riego durante su producción, o cuando se sospecha que la fuente de pudo haberse contaminado, se tienen que realizar al menos 3 análisis de agua durante la temporada de cultivo o 5 estudios del agua anualmente (Banach & van der Fels-Klerx, 2020).

Por su parte, México establece en la NOM-EM-034-FITO-2000, la cual es una Norma Oficial Mexicana con carácter de emergencia, los requisitos y especificaciones para la aplicación y certificación de BPA, en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas. En él se establecen las especificaciones microbiológicas, químicas y físicas para el agua de riego, el agua para manejo postcosecha y el suelo (Tabla 3) (DOF, 2000).

Tabla 3. Límites máximos permitidos con base en la NOM-EM-034-FITO-2000

Parámetro	Agua de riego (mg/L)	Agua para manejo postcosecha (mg/L)	Suelo (Kg/ha)
Materia flotante	Ausente		
Arsénico	0.2	0.025	41
Cadmio	0.05	0.005	39
Cianuro	2	0.07	-
Cobre	4	2	1500
Cromo	0.5	0.05	3000
Mercurio	0.005	0.001	17
Níquel	2		420
Plomo	5	0.01	300
Zinc	10	5	2800
Coliformes fecales	2000 NMP/100 mL	Ausencia en 100 mL	<1000 NMP/g seco
Huevos de helminto	1 a 5	-	<10
Color		20 unidades	-
Olor y sabor		Agradable	-
Turbiedad		5 UTN	-
Cloro libre residual		0.2 a 1.5 mg/L	-

(-): Valor no indicado en la norma. Tomado de: DOF, 2000

### III. OBJETIVOS

#### III.I. Objetivo general

Determinar la prevalencia, distribución y estacionalidad de bacterias patógenas al humano en agua agrícola, suelo y frutas y hortalizas seleccionadas, cultivadas en el estado de Querétaro.

#### III.II. Objetivos específicos

- 1) Monitorear las condiciones ambientales y la aplicación de BPA, en cuatro sitios de producción de frutas y hortalizas en Querétaro durante un año.
- 2) Determinar la prevalencia de *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en muestras de suelo, agua y frutas y hortalizas obtenidas en los cuatro sitios de producción durante un año.
- 3) Aislar y caracterizar las cepas de los microorganismos patógenos presentes en los materiales muestreados con base en su resistencia a temperatura y antimicrobianos.
- 4) Determinar la calidad microbiológica del agua y productos hortofrutícolas en función de la concentración de coliformes fecales y *E. coli*.
- 5) Establecer la correlación entre la aplicación de BPA, el nivel de tecnología de los sitios de producción, con la contaminación microbiana de frutas y hortalizas.

## IV. METODOLOGÍA

### IV.I. Equipos, materiales, reactivos, medios de cultivo y cepas de referencia

#### 4.1.1 Equipos

Balanza analítica digital, 120 g x 0.0001 g (BJ 1200C)

Baño circular de agua (19 L; Thermo Scientific, Waltham, MA)

Bomba lubricada de bajo vacío (Felisa, México)

Cámara de electroforesis (myGEL Mini, Accuris Instruments)

Campana de bioseguridad tipo II, tipo A/B3 (LABCONCO)

Centrífuga EBA 20C (Hettich, Germany)

Cuenta colonias (Reichert Quebec)

Espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch&Lomb)

Fotodocumentador de luz UV (MiniBIS Pro, Bio-Imaging Systems)

Homogenizador (Vórtex Gene 2)

Homogenizador mecánico Stomacher (BagMixer, Interscience)

Incubadora a 104 °C (Felisa, México)

Incubadoras de precisión 25, 30, 35 °C (Thermo Scientific)

Potenciómetro Orion 410<sup>a</sup> (Thermo Scientific, Waltham, MA)

Termobañó de precisión a 50, 55, 60 °C (Felisa, México)

Termobloque seco a 95 °C (MYBLOCK series, Benchmark Scientific)

Termociclador (Verity, Applied Biosystems)

Termómetro Mini IR IR400 (Extech Instruments)

Ultracongelador a -70 °C (BM/BMT, Froilabo)

#### 4.1.2 Materiales

Membranas de nylon de 47 mm y 0.22 µm (Whatman)

Micropipetas de 0.5-10 µL (Transferpette® S, Brand y MicroPette Plus)

Transportadores de agua de 5 galones (Coleman)

Unidades de filtración esterilizables de 250 y 500 mL (Nalgene, Thermo Scientific)

#### 4.1.3 Reactivos

Ácido nalidíxico (sal de sodio) (Millipore)  
Acriflavina-cefsulodina-vancomicina (Millipore)  
Agarosa ultrapura (Bioline)  
Agua estéril libre de DNAsa o RNAsa (Invitrogen)  
Alcohol etílico absoluto (Macron)  
Amortiguador Butterfield pH 7.2 ± 0.2 (Sigma-Aldrich)  
Amortiguador TBE 1x, pH 8.2 (Tris-Borato-EDTA)  
Cloruro de sodio (J.T. Baker)  
Dextrosa (Wöhler)  
Ehrlich reactivo Kovac (HYCEL)  
Gel de tinción para DNA (SYBR Safe, Invitrogen)  
Glicerol (Sigma-Aldrich)  
HCl (Millipore)  
KOH al 40% (J.T. Baker)  
Maltosa (Meyer)  
Manitol (Wöhler)  
Marcador de peso molecular 100-1,013 pb (HyperLadder, Meridian Bioscience)  
Master Mix GoTaq Green (Promega)  
Multidiscos para bacterias gram negativas PT-35 (Multibac I.D.)  
Piruvato de sodio (Thermo Scientific)  
Ramnosa (Millipore)  
Rojo de metilo (HYCEL)  
Tiosulfato de sodio al 10 % (CTR Scientific)  
Xilosa (Meyer)  
 $\alpha$ -naftol (Meyer)

#### 4.1.4 Medios de cultivo

Agar BD Mueller Hinton II (BD)  
Agar Citrato de Simmons (Bioxon)  
Agar Eosina Azul de Metileno (Neogen)

Agar Lisina, Hierro (DIBICO)  
Agar MacConkey Sorbitol (Neogen)  
Agar SIM (Bioxon)  
Agar Soya Trypticasa (Neogen)  
Agar sulfito de bismuto (Neogen)  
Agar triple azúcar, hierro (BD Bioxon)  
Agar xilosa, lisina, desoxicolato (BD Difco)  
Agua peptonada tamponada (Neogen)  
Caldo base (Britania Lab)  
Caldo de enriquecimiento de *Listeria* (Neogen)  
Caldo EC (Neogen)  
Caldo lactosa bilis verde brillante (Millipore)  
Caldo Lauril Tryptosa (Neogen)  
Caldo Rappaport-Vassiliadis (DIFCO)  
Caldo Rojo de Metilo Vogues Proskauer (Millipore)  
Caldo soya tripticasa (Neogen)  
Caldo Tetrionato (DIFCO)  
Caldo universal de preenriquecimiento (Neogen)  
Extracto de levadura (Dibico)  
Peptona de caseína (Dibico)

#### 4.1.5 Cepas de referencia

*E. coli* ATCC 25922

*E. coli* O157:H7 ATCC 35150

*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

*Listeria monocytogenes* ATCC 19115

*Listeria innocua* ATCC 33090

## IV.II. Metodología

### 4.2.1 Descripción de los sitios de producción

El estudio se llevó a cabo en cuatro sitios de producción ubicados en el estado de Querétaro: tres invernaderos y un rancho a cielo abierto. Las características de los sitios de producción se describen en la Tabla 4. Los sitios de producción agrícola (SP) con base en su infraestructura se les asignaron niveles de tecnología: bajo, medio y alto. Durante otoño (noviembre-diciembre de 2022), invierno (enero-marzo de 2023), primavera (marzo-mayo de 2023) y verano (junio-julio de 2023), cada SP se visitó dos veces, con excepción del SP2 que durante el invierno detuvo la producción de tomate Roma. En cada visita se registraron los factores ambientales (sección 4.2.2), el nivel de cumplimiento de BPA (sección 4.2.3), y se colectaron muestras de suelo, agua y productos hortofrutícolas (PH) (sección 4.2.4) para determinar la prevalencia de microorganismos patógenos al humano (sección 4.2.5) y la caracterización de los aislados microbianos (sección 4.2.6). Adicionalmente, se estimó la concentración de coliformes fecales y *E. coli* genérica en AgWA y los PH (sección 4.2.7).



Tabla 4. Descripción de los sitios de producción agrícola

Característica	Sitios de producción agrícola (SP)			
	SP1	SP2	SP3	SP4
Ubicación	Corregidora, Qro.	El Marques, Qro.	Amealco, Qro.	Colon, Qro.
Sistema de producción agrícola	Campo abierto	Invernadero	Invernadero hidropónico con sustrato	Invernadero hidropónico con sustrato
Tipo de cultivo	Lechuga iceberg	Tomate Roma	Fresa	Tomate <i>cherry</i>
Nivel de tecnología	Bajo	Medio	Medio	Alto
Fuente de agua	Pozo	Pozo	Superficial	Pozo
Tratamiento aplicado al agua agrícola	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Cloración o radiación UV
Sistema de riego	Gravedad	Goteo	Goteo	Goteo
Consumo	Nacional	Nacional	Nacional	Exportación

#### 4.2.2 Monitoreo de las condiciones ambientales

Durante las visitas se registró la fecha de muestreo, la temperatura del ambiente, del suelo y del agua con un termómetro. Las temperaturas mínimas y máximas del ambiente, así como la humedad relativa (HR) del día del muestreo se obtuvieron de la plataforma *The Weather Company* (<https://weather.com/>). El pH del suelo se determinó usando la metodología descrita por Gaete et al. (2020). Brevemente, se realizó una suspensión de suelo:agua desionizada (1:10 p/v), se agitó con vórtex y se dejó reposar 25 min para dejar que la solución se asentara. El pH del agua se

obtuvo midiendo directamente en la muestra, ambos usando un potenciómetro. Se determinó la humedad del suelo mediante la metodología descrita por Brooks, (2015).

#### 4.2.3 Nivel de cumplimiento de BPA

Durante cada visita se realizaron inspecciones para documentar el nivel de cumplimiento de las BPA. Se llenó el formato BPA-22-01.01 (Anexo 1) (DIA, 2010), el cual constó de 9 puntos de control: 1) Sistema de gestión de BPA, 2) Trazabilidad y retiro, 3) Manejo de aguas, 4) Suelo, 5) Abonos, 6) Manejo integrado de plagas, 7) Cultivo, cosecha y transporte, 8) Limpieza e higiene en el campo y 9) Autoinspección y monitoreo. En total se verificaron 40 reactivos (criterios), cuyas respuestas se catalogaron como “sí”, “no” y “no aplica”.

#### 4.2.4 Recolección de muestras y preparación

En cada visita a los SP se recolectaron de manera aséptica (con guantes de nitrilo) muestras de suelo (n= 1), AgWA (n= 3) y PH maduros (n=90). Las muestras se colocaron dentro de bolsas estériles y se dispusieron dentro de hieleras con refrigerantes (<10 °C), se transportaron al laboratorio LECRIMA y se analizaron el mismo día, no excediendo 2 h posteriores a la recolección (Agrolab, 2014) para determinar la prevalencia de *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.

**Suelo.** Se recolectaron muestras compuestas de suelo (~100 g), escogiendo tres puntos al azar dentro del campo de cultivo siguiendo un patrón de zigzag. Para ello, se retiró la basura de la superficie del punto de muestreo y se usó una barrena de acero inoxidable para muestreo de suelo a una profundidad de 15 cm (Figura 9A, 9C) (Agrolab, 2014; Brooks, 2015; Tnau Agritech Portal, 2013). Para el SP1 cuyo sistema de riego es por gravedad, la muestra de suelo se recolectó del surco y no de la parte superior de la fila (Agrolab, 2014; Brooks, 2015; Tnau Agritech Portal, 2013). El suelo se mezcló con una solución amortiguadora de fosfato salino (1:1 p/v) y se agitó 2 h a 150 rpm. El suelo se sedimentó por centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante para los análisis microbiológicos.

**Agua.** Las muestras de agua se clasificaron como: agua no agrícola (usada para

diversas actividades humanas) y AgWA (usada para el crecimiento de productos frescos, cosecha y actividades post-cosecha) (PSR, 2023). En SP1, SP2 y SP3 solamente usan AgWA, mientras que SP4 tiene tanto agua no agrícola como AgWA. Para investigar la presencia de *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* las muestras de agua y AgWA se colectaron en transportadores de agua estériles de 5 galones, con base en el protocolo descrito por la agencia de protección ambiental de EUA (EPA, por sus siglas en inglés) (U.S. Environmental Protection Agency, 2016). A las muestras de agua que habían sido tratadas con cloro, se les adicionó tiosulfato de sodio (10%) como inhibidor (Agrolab, 2014). En el caso de aguas superficiales, el colector de agua se sumergió a contracorriente a una profundidad de 15 a 30 cm (Figura 9B), evitando zonas de la orilla, de la superficie o del fondo. Si la muestra provenía de pozo profundo, el orificio de salida se limpió con una gasa estéril y solución de hipoclorito de sodio a 100 mg/L. Se abrió la válvula y se dejó correr el agua al menos 3 min antes de tomar la muestra. Adicionalmente, se usaron frascos estériles (100 mL) para recolectar agua no agrícola y AgWA para la enumeración de coliformes fecales y *E. coli* genérica. Las muestras se etiquetaron y se colocaron dentro de hieleras con gel refrigerante (Agrolab, 2014; U.S. Environmental Protection Agency, 2016).

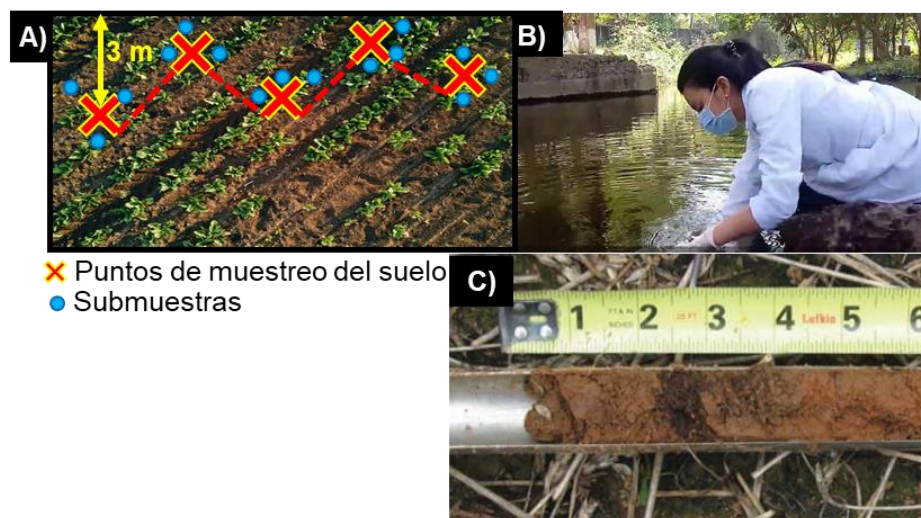


Figura 9. Muestreo en campo del fruto, agua superficial y suelo.

A) Las muestras de suelo, lechuga, tomate y fresa se obtuvieron usando el patrón zigzag; B) Muestreo de agua superficial a una profundidad de 15 cm; C) Representación visual de una barrena para muestreo a una profundidad de 15 cm. Tomado de: Agrolab, 2014; Brooks, 2015; TNAU AGRITECH PORTAL, 2013

En el laboratorio y bajo condiciones asépticas, las muestras de AgWA colectadas para determinar la prevalencia de *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* se dividieron en tres alícuotas (cada una de 6L) y se filtraron mediante membranas de nylon (0.22 µm).

**Productos hortofrutícolas.** Para el SP1, la parcela se dividió en cuadrantes y en el centro de tres cuadrantes se colectó la muestra siguiendo un desplazamiento en movimientos de zigzag (Figura 9A). En los SP restantes, los PH fueron cosechados por el personal de cada SP y trasladados a la bodega de almacenamiento, en donde se tomaron al azar tres muestras de cada PH. Las unidades de muestreo fueron: una pieza de lechuga iceberg, una pieza de tomate Roma, una almeja de fresa y tres piezas de tomate *cherry*. Las muestras se etiquetaron indicando: el tipo de muestra, la fecha, hora y lugar de muestreo y el nombre del responsable (Anexo 2).

#### 4.2.5 Análisis microbiológicos

**Detección de *Salmonella enterica*.** La detección de *S. enterica* se llevó a cabo mediante la metodología descrita por el Manual Analítico Bacteriológico (BAM, por sus siglas en inglés) de la FDA con algunas modificaciones (Hammack et al., 2022). Brevemente, una alícuota (1 mL) del sobrenadante de las muestras de suelo (sección 4.2.4) se transfirió a 5 mL de caldo de Luria Bertani (LB) y se incubó a 30 °C a por 24 h (Gaete et al., 2020). Las muestras de PH (25 g de lechuga, 1 pieza de tomate Roma, 25 g de fresa, 3 piezas de tomate *cherry*) se pre enriquecieron en caldo Universal de pre-enriquecimiento (UP) 1:10 (p/v) y las membranas del AgWA se transfirieron a 125 mL UP y se incubaron a 35 ± 0.2 °C por 24 ± 2 h a 35 °C. A partir de los caldos de preenriquecimiento de LB y UP se transfirió 0.1 mL del caldo a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS) y 1 mL a 10 mL de caldo de

Tetracionato (TT) y se agitó en un vortex. Se incubaron los tubos con caldo RVS a  $42 \pm 0.2$  °C/24 h  $\pm$  2 h en un termobañó de precisión y los tubos con caldo TT a  $35 \pm 0.2$  °C/ 24 h. Al término de la incubación se tomaron 100  $\mu$ L de cada caldo de enriquecimiento, se inocularon en 1 mL de caldo soya tripticasa (CST) y se incubaron a  $35 \pm 0.2$  °C por 24 h. A partir de los cultivos de CST se realizó la confirmación de *S. enterica* mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se realizó la extracción de ADN mediante calentamiento en el termobloque a 95 °C/15 min, seguidos de enfriamiento a 4 °C durante 10 min. Se usaron los iniciadores para detectar el gen *InvA* (F: 5' – CTGTTGAACAACCCATTTGT-3' / R: 5' – CGGATCTCATTAAATCAACAAT-3') (Godínez-Oviedo et al., 2022). Se llevaron a cabo reacciones de 12  $\mu$ L usando Master Mix (Green GoTaq, Promega, Madison, USA), los iniciadores a 5  $\mu$ M de concentración final, 1  $\mu$ L de ADN molde, y el volumen restante de agua de grado molecular. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador el cual se programó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de amplificación: desnaturalización 95 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C por 90 s y extensión a 72 °C por 60 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto obtenido de la PCR (6  $\mu$ L) se transfirió a un gel de agarosa al 1%, conteniendo 0.004% de gel de tinción para DNA SYBR Safe en amortiguador TBE 1X. Se usó el marcador de peso molecular 100 pb y junto con las muestras, el gel se corrió a 100 V durante 15 min, en la cámara de electroforesis. El gel se visualizó en el fotodocumentador de luz UV y el tamaño del amplicón esperado fue de 437 pb (Godínez-Oviedo et al., 2022). A los caldos de enriquecimiento (RVS y TT) positivos a *Salmonella* mediante PCR, se introdujo un asa de 3 mm (10  $\mu$ L) y se estriaron en placas con agar de sulfito de bismuto (SB) y agar de xilosa, lisina y desoxicolato (XLD) y se incubaron a  $24 \pm 2$  h a  $35 \pm 0.2$  °C. Se seleccionaron todas las colonias presuntivas de cada medio, se purificaron mediante pases consecutivos en placas de agar soya tripticasa (AST), y de las colonias puras en AST se realizaron pruebas bioquímicas (agar hierro y triple azúcar y agar hierro, lisina) (Hammack et al., 2022).

Finalmente se realizó la confirmación por PCR de aislados seleccionados como se mencionó previamente en esta sección.

**Detección de *E. coli* O157:H7.** Se llevó a cabo mediante la metodología de BAM con modificaciones (Jinneman et al., 2020). Las muestras de suelo y de PH, se pre-enriquecieron en agua peptonada tamponada modificada con piruvato (mBPWp). Las membranas de AgWA previamente filtrada, se colocaron en 125 mL de mBPWp y se incubaron a  $37 \pm 1$  °C durante 5 h. Posteriormente, se adicionó el suplemento de acriflavina-cefsulodina-vancomicina (ACV) y se incubaron a  $42 \pm 1$  °C h durante 18 h. Se realizó una PCR múltiple confirmatoria del serotipo O157:H7 con los iniciadores descritos en la Tabla 5. Para ello a partir de un cultivo fresco de CST de 24 h proveniente del mBPWp, se tomó una alícuota de 1 mL se calentó durante 15 min a 95 °C en el termobloque y posteriormente se enfrió a 4 °C durante 10 min. La PCR se llevó a cabo con una etapa de acondicionamiento a 95 °C por 5 min; luego 25 ciclos de 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C durante 5 min para la extensión final. Se examinaron los amplicones generados en un gel de electroforesis de agarosa al 2%, usando 1X amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA) a pH 8.2 con 0.004% de gel Sybr Safe, a 100 V dentro de una cámara de electroforesis durante 25 min. Se usó marcador de peso molecular estándar de DNA de 100 pb a 1,000 pb y se observaron las bandas con un fotodocumentador de luz UV (Jinneman et al., 2020).

Tabla 5. Secuencias de los iniciadores para la detección de *E. coli* O157:H7

Gen	No. iniciador	Nombre del iniciador	Secuencia (5' – 3')	Ubicación (pb)
<i>stx1</i>	1	LP30	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348
	2	LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG	
<i>stx2</i>	3	LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	584
	4	LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	
+93	5	PT-2	GCGAAACTGTGGAATTGGG	252
<i>uidA</i>	6	PT-3	TGATGCTCCATCACTTCCTG	
$\gamma$ -	7	AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	397
<i>eaeA</i>	8	AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT	
<i>ehxA</i>	9	MFS1Fb	GTTTATTCTGGGGCAGGCTC	166
	10	MFS1R	CTTCACGTCACCATACATAT	

Tomado de: Jinneman et al., 2020

En las muestras positivas a *E. coli* O157:H7 mediante PCR, a partir del desarrollo en mBPWp se estriaron placas de agar MacConkey con Sorbitol (ACS) y se incubaron a 35 °C ± 1 °C durante 18-24 h. Las colonias características se purificaron mediante pases consecutivos en placas de agar Soya Trypticase con extracto de levadura (ASTEL) y se incubaron 18-24 h a 35 °C ± 1 °C. A partir del desarrollo en ASTEL se realizó la confirmación bioquímica (IMViC y lactosa) (Jinneman et al., 2020). Finalmente se realizó la confirmación por PCR como se mencionó previamente en esta sección.

**Detección de *Listeria monocytogenes*.** Se realizó la metodología con base en el BAM con modificaciones (Chen et al., 2022). Brevemente, las muestras se pre-enriquecieron en caldo enriquecimiento de *Listeria* (BLEB) 1:10 p/v, la membrana de filtración de AgWA se transfirió a 125 mL de BLEB y se incubó a 30 ± 0.2 °C durante 4 h. Se enriquecieron las muestras de BLEB con la adición de acriflavina

(10 mg/L), ácido nalidíxico (50 mg/L) y cicloheximida (40 mg/L), y se incubaron a  $30 \pm 0.2$  °C por 24-48 h. Alícuotas (100 µL) de las muestras pre-enriquecidas transfirieron a 1 mL CST y se incubaron  $35 \pm 0.2$  °C, 24 h. Al final de la incubación se extrajo el ADN por choque térmico (95 °C por 15 min) e inmediatamente se enfrió a 4 °C durante 10 min. Se llevaron a cabo reacciones de 12 µL usando Master Mix (Green GoTaq, Promega), los iniciadores a una concentración final de 5 µM (Tabla 6), 1 µL de ADN molde, y el volumen restante de agua grado molecular. La amplificación se llevó a cabo usando un termociclador el cual se programó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de amplificación: desnaturalización 95 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C por 90 s y extensión a 72 °C por 60 s, y finalmente una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto obtenido de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con SYBR Safe al 0.004 % y se corrió a 100 V durante 15 min. Se observó el gel de agarosa en cámara de luz UV para analizar el tamaño del amplicón generado de 702 pb, correspondiente al fragmento del gen *hly A* (Godínez-Oviedo et al., 2017; Sepahvand et al., 2022).

Tabla 6. Secuencias de los iniciadores para la detección de *L. monocytogenes*

Gen	Nombre del iniciador:	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)
<i>hly A</i>	LM1	CCT AAG ACG CCA ATC GAA	702
	LM2	AAG CGC TTG CAA CTG CTC	

Tomado de: Sepahvand et al., 2022

En caso de contar con muestras positivas, los cultivos de BLEB se estriaron agar modificado de Oxford (MOX) y las placas se incubaron a  $35 \pm 0.2$  °C por 24-48 h. A partir de MOX, se realizó subcultivo de 5 colonias típicas a placas de ASTEL, para evaluar su pureza. Las colonias sospechosas de *L. monocytogenes* se sometieron a la prueba de SIM a 25 °C durante 2-7 días y fermentación de carbohidratos al 0.5 % (D, Mal, R, Man y X), las cuales se incubaron a 35 °C con campanas de Durham



(Chen et al., 2022). Finalmente se realizó la confirmación por PCR como se mencionó previamente en esta sección.

#### 4.2.6 Caracterización de cepas de microorganismos patógenos aislados de los materiales analizados.

**Conservación de los aislados.** Los aislados confirmados y purificados de *S. enterica*, se preservaron en CST adicionado de glicerol (15 %) y se congelaron a -70 °C para su posterior caracterización.

**Resistencia antimicrobiana.** Las cepas aisladas de *S. enterica* se sometieron a la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana empleando el método de difusión en disco en agar Müller-Hilton siguiendo la metodología del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2020). Se evaluó la susceptibilidad a 12 antibióticos: amikacina (AK, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), carbencilina (CB, 100 µg), cefalotina (CEP, 30 µg), cefoxitina (CFX, 30 µg), ciprofloxacino (CIP, 30 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), netilmicina (NET, 20 µg), nitrofurantoina (NFT, 300 µg), norfloxacina (NOF, 10 µg), y trimetoprima/sulfametoxazol (SXT, 1.25/23.75 µg) contenidos en un multidisco. Se empleó *E. coli* ATCC 25922 como control de calidad. Brevemente, a partir de un cultivo de 18 a 24 h se sembró una placa de extensión por superficie y se incubó durante 18-24 h a 35 °C. Se tomaron de 3 a 5 colonias aisladas y se ajustó el inóculo a la escala 0.5 de McFarland, usando 10 mL de solución salina fisiológica estéril. Se agitó con un vórtex de 15 a 20 s y mediante el uso de un espectrofotómetro se ajustó la absorbancia de 0.08 a 0.1 a una  $\lambda=600$  nm. Como blanco, se usó solución salina fisiológica sin inocular (BD Diagnostic Systems, 2017; Peruzky et al., 2020). Se sembró ~1 mL del inóculo con ayuda de un hisopo se frotó en una placa con 10 mL de agar BD Mueller Hinton II. Posteriormente se colocaron 4 discos con la ayuda de pinzas estériles, cerciorándose que tuvieran contacto con la superficie del agar y se incubaron a  $35 \pm 2$  °C de 16 a 18 h.

Al término de la incubación, se midió el halo de inhibición alrededor del disco, tomando una fotografía junto con una regla, para analizarse con el software ImageJ

1.54d (National Institutes of Health, USA). Los halos de inhibición obtenidos se compararon con las tablas del documento M100 de CLSI y del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, por sus siglas en inglés) y los resultados se reportaron como: resistentes (R), Intermedios (I) o sensibles (S). Los aislados que presentaron resistencia a más de tres antibióticos fueron considerados multirresistentes (MDR) (BD Diagnostic Systems, 2017; Peruzzy et al., 2020).

**Resistencia térmica.** La evaluación de la termorresistencia de las cepas aisladas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Acuff et al. (2021) con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon cultivos frescos en tubos (18 h, 9 Log UFC/mL) de las cepas aisladas, se transfirieron 200  $\mu$ L a un tubo pequeño estéril de 13x100 mm y se almacenaron a 4 °C hasta su uso (< 2 h). El ensayo se llevó a cabo usando un baño circular de agua el cual se programó a tres temperaturas: 50, 55 y 60  $\pm$  0.2 °C. La temperatura de los baños se monitoreó usando un termómetro calibrado de inmersión. Los tubos se sumergieron totalmente en el baño y después de 0, 5 y 10 min se removieron e inmediatamente se colocaron en un recipiente con hielo. Los tubos con las muestras se agitaron vigorosamente, se prepararon diluciones decimales y se realizó la cuantificación de los sobrevivientes en AST mediante la técnica de vaciado en placa; las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h y posteriormente se realizaron los recuentos.

Se calculó el valor D de cada cepa en cada nivel de temperatura (Amado et al., 2014). Asimismo, se determinó la constante de tasa de inactivación de primer orden ( $K_{max}$ ) por medio de GlnaFiT 1.8 (KU Leuven, Bélgica) (Amado et al., 2014; Geeraerd et al., 2005; Sharma et al., 2005).

#### 4.2.7 Cuantificación de coliformes fecales y *E. coli* en agua y productos hortofrutícolas.

Se cuantificaron los coliformes fecales y *E. coli* genérica mediante la técnica del número más probable (NMP) (Burkhardt et al., 2020). Muestras de 25 g de PH se mezclaron en 225 mL de amortiguador de Butterfield y se homogenizaron en Stomacher durante 2 min. La segunda, tercera y cuarta dilución se usaron para inocular tres tubos de caldo lauril triptosa (CLT). Para confirmar la presencia de coliformes fecales se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de cada tubo positivo de CLT (tubos con turbidez y presencia de gas) y se transfirieron a tubos de caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB) con campana Durham; los tubos se incubaron a  $44.5 \pm 0.2$  °C, durante 24 a 48 h. Los tubos positivos (presencia de turbidez y gas) se usaron para determinar el NMP de coliformes fecales. Diez alícuotas (10 mL) de las muestras de agua y AgWA se inocularon en 10 tubos con 10 mL de CLT2X con campana Durham y se incubaron a 35 °C por 24-48 h. De cada tubo positivo se transfirió una alícuota (100  $\mu$ L) al mismo número de tubos con caldo EC y se incubaron a 44.5 °C, de 24-48 h. Para la confirmación de *E. coli* genérica, a partir de tubos positivos a EC (presencia de turbidez y gas), se tomó una asada y se estrió en agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y las placas se incubaron a 35 °C/24 h. Para la identificación bioquímica de *E. coli* se evaluó la producción de indol (I), Vogues Proskauer (VP), rojo de metilo (RM) y citrato (C). Se consideró positivo a *E. coli* aquellas colonias con el siguiente perfil: Indol (-/+), RM (+), VP (-) y Citrato (-). Los resultados se reportaron como NMP/100 mL o g.

#### 4.2.8 Correlación entre la aplicación de BPA y la contaminación microbiana de frutas y hortalizas producidas en Querétaro.

Con base en la información recolectada sobre el nivel de aplicación de BPA, el nivel tecnológico de cada SP y la prevalencia de los microorganismos patógenos en las muestras de suelo, agua y PH, se elaboró un análisis de correlación de Pearson con el fin de establecer el grado de asociación o dependencia que existe entre las prácticas que los productores hacen de manera habitual, con la prevalencia de los

microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, especialmente *S. enterica*. Para ejemplificar de manera visual la correlación, se hizo una gráfica de superficie 3D en Minitab, 21.4.1 (Minitab, LLC., 2021). Además, se elaboró un mapa por medio del uso de un rastreador satelital por medio de la herramienta *Explore Google Earth* (<https://earth.google.com/>) de las zonas geográficas estudiadas en donde se ubicaron las fuentes de agua y suelo que resultaron positivas a *Salmonella*.

#### 4.2.9 Análisis estadístico

El análisis de los datos de temperatura ambiente se llevó a cabo mediante un análisis no paramétrico de las pruebas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis. Los registros de la temperatura del suelo y del agua; la humedad relativa ambiental y la humedad del suelo; el pH del suelo y del agua se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguidos de una prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). El nivel de cumplimiento de las BPA para cada SP se determinó mediante una prueba de Dunnett ( $\alpha < 0.05$ ). El efecto del tratamiento térmico en la viabilidad de los aislados de *S. enterica* se analizó mediante un ANOVA unidireccional, seguido de una prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa RStudio 2023.06.1+524 "Mountain Hydrangea" (Posit Software, PBS).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.I. Condiciones ambientales y nivel de cumplimiento de BPA en cuatro sitios de producción de frutas y hortalizas.

Desde noviembre de 2022 hasta julio del 2023, se llevaron a cabo 30 visitas a los cuatro SP, considerando que cada SP se visitó dos veces por cada estación, a excepción del SP2 debido a que la producción se detuvo en invierno. Los niveles de temperatura, humedad relativa y del suelo y pH del suelo y agua se ilustran en la Tabla 7. Las medianas de la temperatura ambiente de otoño, invierno, primavera y verano fueron  $17.0 \pm 7.7$ ,  $15.0 \pm 8.6$ ,  $24.0 \pm 8.6$  y  $20.0 \pm 7.6$  °C, respectivamente. La temperatura más baja (1 °C) se observó en invierno y la más alta (37 °C) en

verano. Independiente del SP, las estaciones de otoño y primavera fueron iguales ( $p > 0.05$ ), mientras que en invierno y verano fueron iguales entre sí, pero diferentes a las primeras ( $p \leq 0.05$ ).

La temperatura del suelo fue similar en las cuatro estaciones ( $p > 0.05$ ), no obstante, la menor temperatura se registró durante el invierno (5 °C) y la máxima (27 °C) durante el verano. Por lo que respecta a la temperatura del agua, a pesar de que los valores fluctuaron en las diferentes estaciones y entre los SP, se observó que existe efecto de interacción entre ambos factores ( $p= 8.093e-08$ ). De manera general, la temperatura promedio durante otoño, invierno, primavera y verano fue  $15.1 \pm 6.6$ ,  $16.9 \pm 5.5$ ,  $18.7 \pm 4.0$  y  $20.6 \pm 5.2$  °C, respectivamente. Por otra parte, los valores de la humedad relativa y la humedad del suelo estuvieron en el rango de 21-87% y de 21-73%, respectivamente. En ambos casos se observó mucha dispersión en los datos lo que propició que no hubiera diferencias entre la humedad registrada en las cuatro estaciones ( $p > 0.05$ ). Finalmente, el pH del suelo presentó valores que fueron de 7.2 a 8.1 en las mediciones realizadas a lo largo del año, lo que sugiere que la estación del año no afecta este factor ( $p > 0.05$ ). En SP1, SP2 y SP4 el pH del agua osciló entre 6.9 y 8.1 y estos valores se mantuvieron constantes a lo largo del año ( $p > 0.05$ ). En SP3 el pH fue más bajo (6.0 - 7.0) y fue estadísticamente diferente a SP1 y SP2.

Se ha reportado que existen varios factores clave que permiten la sobrevivencia y/o desarrollo de microorganismos patógenos en ambientes dinámicos, tales como la temperatura, concentración de sales, pH, concentración de oxígeno disuelto, exposición a radiación UV, interacción con otras comunidades microbianas y disponibilidad de nutrientes (Liu et al., 2018). De ahí la importancia que tuvo para este estudio registrar los valores de la temperatura, humedad y pH para establecer si hay o no asociación entre éstos y la presencia de microorganismos patógenos al humano. Esta discusión se abordará con mayor detalle en el apartado V.V.

Tabla 7. Parámetros ambientales y fisicoquímicos obtenidos en los cuatro sitios de producción agrícola durante las cuatro estaciones.

Parámetro	Tipo de medición	SP	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Temperatura (°C)	Ambiente	SP1	16±7 <sup>ab</sup>	13±11 <sup>b</sup>	17±10 <sup>ab</sup>	23±9 <sup>a</sup>
		SP2	18±8 <sup>ab</sup>	-	21±8 <sup>ab</sup>	21±6 <sup>a</sup>
		SP3	18±8 <sup>ab</sup>	13±8 <sup>b</sup>	16±7 <sup>ab</sup>	15±6 <sup>a</sup>
		SP4	19±7 <sup>ab</sup>	16±9 <sup>b</sup>	19±7 <sup>ab</sup>	23±8 <sup>a</sup>
	Suelo	SP1	16.0±1.4 <sup>a</sup>	7.0±2.8 <sup>a</sup>	13.5±4.9 <sup>a</sup>	21.4±7.9 <sup>a</sup>
		SP2	16.5±3.5 <sup>a</sup>	-	-	25.5±0.0 <sup>a</sup>
		SP3	-	11.1±1.6 <sup>a</sup>	15.0±2.8 <sup>a</sup>	13.5±5.5 <sup>a</sup>
		SP4	-	-	-	-
	AgWA	SP1	28.0±0.0 <sup>a</sup>	23.0±7.1 <sup>ac</sup>	17.0±0.0 <sup>cde</sup>	25.3±0.4 <sup>ab</sup>
		SP2	14.0±0.0 <sup>de</sup>	-	23.0±1.8 <sup>abcd</sup>	23.2±1.7 <sup>abcd</sup>
		SP3	12.3±1.3 <sup>def</sup>	8.5±1.7 <sup>ef</sup>	13.5±1.0 <sup>def</sup>	13.3±3.1 <sup>cdef</sup>
		SP4	19.0±1.2 <sup>bcd</sup>	17.8±0.5 <sup>cde</sup>	20.5±0.6 <sup>bcd</sup>	22.9±1.8 <sup>abcd</sup>
Humedad (%)	Ambiente	SP1	57.0±4.2 <sup>a</sup>	71.0±22.6 <sup>a</sup>	51.0±19.8 <sup>a</sup>	49.0±9.9 <sup>a</sup>
		SP2	53.5±26.2 <sup>a</sup>	-	40.0±26.9 <sup>a</sup>	71.0±11.3 <sup>a</sup>
		SP3	56.5±34.6 <sup>a</sup>	58.0±4.2 <sup>a</sup>	57.5±20.5 <sup>a</sup>	79.0±9.9 <sup>a</sup>
		SP4	74.0±2.8 <sup>a</sup>	56.5±9.2 <sup>a</sup>	58.5±2.1 <sup>a</sup>	46.5±26.2 <sup>a</sup>
	Suelo	SP1	25.0±5.7 <sup>a</sup>	31.0±12.7 <sup>a</sup>	22.0±1.4 <sup>a</sup>	29.5±10.6 <sup>a</sup>
		SP2	52.5±29.0 <sup>a</sup>	-	-	-
		SP3	-	-	-	-
		SP4	-	-	-	-
pH	Suelo	SP1	8±1 <sup>a</sup>	8±1 <sup>a</sup>	8±0 <sup>a</sup>	7±0 <sup>a</sup>
		SP2	9±0 <sup>a</sup>	-	-	-
	AgWA	SP1	8.1±0.1 <sup>a</sup>	8.1±0.1 <sup>a</sup>	7.8±0.3 <sup>a</sup>	7.8±0.3 <sup>a</sup>
		SP2	7.4±0.8 <sup>a</sup>	-	7.6±0.5 <sup>a</sup>	7.6±0.6 <sup>a</sup>
		SP3	6.7±0.8 <sup>b</sup>	7.0±0.6 <sup>b</sup>	6.0±0.6 <sup>b</sup>	6.7±0.6 <sup>b</sup>
		SP4	7.2±1.2 <sup>ab</sup>	6.9±1.2 <sup>ab</sup>	7.2±0.9 <sup>ab</sup>	7.4±1.1 <sup>ab</sup>

(-): Medición no realizada; SP: sitio de producción agrícola; SP1: Corregidora; SP2: El Marques; SP3: Amealco; SP4: Colón. Resultados expresados como media ± D.E., excepto por la temperatura ambiente (mediana ± D.E.). Letras diferentes entre filas y columnas son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

No sólo la estacionalidad puede influir en la presencia de microorganismos indicadores de prácticas sanitarias y microorganismos patógenos en frutas y hortalizas, sino también la implementación de las BPA. En México las BPA son de carácter voluntario, sin embargo, en EUA, las BPA son la base de PSR. Por tanto, aquellos productos cubiertos por la norma, así como aquellos productores extranjeros que deseen exportar al mercado norteamericano, deberán cumplir con el estándar de PSR (Agricultural Marketing Service, 2023; FDA, 2016; Siller-Cepeda et al., 2002).

El puntaje y porcentaje de cumplimiento de las BPA durante las cuatro estaciones para SP1 fue de 12.9 puntos y 20%, para SP2 de 30.0 puntos y 45 %, para SP3 de 26.8 puntos y 41 % y para SP4 de 61.5 puntos y 93 % (Tabla 8). El grado de cumplimiento de BPA en cada SP fue similar en las cuatro estaciones. Uno de los principales problemas observados durante las inspecciones de BPA en SP1 clasificado con un nivel de tecnología bajo, fue la falta de trazabilidad y de documentación a lo largo del ciclo de producción de la lechuga iceberg. En contraste, los SP2 y SP3, ambos con nivel tecnológico medio, aunque contaban con un sistema de trazabilidad y bitácoras, éstas, no siempre estaban actualizadas al momento de la inspección. Lo anterior condujo a violaciones en ocho de los nueve puntos de control, de los cuales el manejo de aguas, las violaciones que se observaron con mayor frecuencia fueron: la falta de protección a la fuente de agua, deficiencia en las medidas para evitar el acceso de los animales a la misma, y la ausencia de acciones correctivas en caso de estar contaminada. En el punto de control de cultivo, cosecha y transporte, los recipientes para la cosecha no se encontraban limpios, no existían procedimientos estándar (POES), ni registros de limpieza. Con respecto al uso y aplicación de fertilizantes fue el que obtuvo el máximo puntaje (2 puntos) en los cuatro SP. El SP4 considerado como un sitio con un nivel de tecnología alto y que produce tomate *cherry* de exportación, fue el único sitio que tuvo implementadas de manera apropiada las BPA en cumplimiento con PSR.

Tabla 8. Cumplimiento de buenas prácticas agrícolas (BPA) en cuatro sitios de producción agrícola durante las cuatro estaciones del año.

Puntos de control de las BPA	Puntaje máximo por punto de control	Otoño				Invierno				Primavera				Verano			
		SP1	SP2	SP3	SP4	SP1	SP2	SP3	SP4	SP1	SP2	SP3	SP4	SP1	SP2	SP3	SP4
A	4.0	0*	1.5*	2*	4	0*	2*	2*	4	0*	2*	2*	4	0*	1*	0*	4
B	4.0	0*	0*	0*	4	0*	0*	0*	4	0*	0*	0*	4	0*	0*	0*	4
C	14.0	2*	2.5*	2*	7*	2.5*	5*	5*	14	5*	7*	5*	14	3*	4*	3.5*	13
D	8.0	0*	3*	-1*	8	-1*	0*	0*	8	1*	2*	0*	6	-1*	1*	0*	7
E	2.0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
F	8.0	6*	7*	6.5*	8	6*	8	8	8	6*	6*	7*	8	6*	6*	6*	8
G	10.0	2*	5.5*	6*	10	2*	6*	6*	10	2*	7*	4.5*	10	2*	6.5*	6*	10
H	12.0	0*	7*	5.5*	11*	0*	8*	8*	10*	0*	6*	8*	10*	0*	8.5*	7*	10*
I	4.0	0*	0.5*	0*	4	0*	0*	0*	4	0*	0*	0*	4	0*	0*	0*	4
Puntaje obtenido:	66.0	12.0	29.0	23.0	58.0	11.5	31.0	31.0	64.0	16.0	32.0	28.5	62.0	12.0	29.0	24.5	62.0
Cumplimiento (%):	100	18	44	35	88	17	47	47	97	24	48	43	94	18	44	37	94

SP: sitio de producción agrícola. A: sistema de gestión de BPA; B: trazabilidad y retiro; C: manejo de aguas; D: suelo; E: abonos orgánicos; F: manejo integrado de plagas; G: cultivo, cosecha y transporte; H: limpieza e higiene en el campo; I: autoinspección y monitoreo. (\*): Valor diferente con respecto al valor de referencia, ( $p \leq 0.05$ ).



## V.II. Prevalencia de *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*

La presencia de *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* se investigó en un total de 131 muestras: 11 de suelo, 30 de AgWA y 90 de PH. Ninguna de las muestras analizadas resultó positiva a *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*; en contraste, la prevalencia global de *S. enterica* fue del 3 % (4/131) (Tabla 9).

Por otra parte, *S. enterica* fue detectado en: una muestra de AgWA del SP1 colectada en primavera; dos muestras de SP2: una muestra de AgWA y una de suelo recolectadas en otoño y verano, respectivamente; una muestra de AgWA de SP3 colectada en primavera. Es decir, independientemente del SP, la prevalencia de *S. enterica* en muestras de AgWA fue del 10 % (3/30). Dado que dicho patógeno se encontró en AgWA durante primavera y verano, se puede inferir que su presencia puede estar influenciada por la estación del año. Lo anterior coincide con lo reportado por Gorski et al. (2022) quienes llevaron a cabo un estudio para determinar la prevalencia de *S. enterica* en fuentes de agua de acceso público en una región de cultivo de hortalizas de hojas verdes de la costa central de California, en el periodo de 2011 a 2016. Los autores reportaron una prevalencia global del patógeno del 56 % (n=2,979), donde la mayor positividad ocurrió durante primavera (64 %) y la menor durante otoño (49 %) e invierno (52 %).

Por otro lado, González-López et al. (2022) evaluaron la prevalencia de *S. enterica* en agua de río de la principal región agrícola en el Norte de México, particularmente en los ríos Humaya, Tamazula y Culiacán, de junio 2018 a noviembre 2019. Se reportó una prevalencia global del 55 % (78/143) y la mayor prevalencia ocurrió durante el verano y la menor en otoño e invierno. Además, reportaron una temperatura global del agua de los ríos que osciló entre 21.8 °C y 36.4 °C, datos similares a los obtenidos en el presente trabajo.

Otro estudio que evaluó la prevalencia de *Salmonella* en muestras de AgWA, es el reportado por Murphy et al. (2022). Ellos analizaron fuentes de agua superficial del norte (n=6) y sur (n=8) de Florida, EUA, y encontraron una prevalencia de 24 % (17/72) en el norte de Florida y de 28 % (27/96) en el sur de dicho estado.

Por su parte, Weller et al. (2020) reportó una mayor prevalencia de *Salmonella* cuando la temperatura ambiental superó los 20 °C. Fatica & Schneider (2011) a su vez reportaron que *Salmonella* puede crecer en un amplio rango de temperaturas que van desde los 7 °C hasta los 48 °C, con temperatura óptima de desarrollo es 37 °C. Al comparar con los datos obtenidos, se pudo observar que la temperatura ambiental, así como la temperatura de las fuentes de suelo y AgWA analizados y que dieron positividad a *S. enterica*, propicio la sobrevivencia de dicho patógeno. De manera análoga, el trabajo reportado por Leal-Cervantes et al., (2018) se comparó la incidencia de *Salmonella* en tomates *cherry*, encontrando mayor prevalencia en supermercados (n=29, 14 %) que en mercados locales (n=10, 8 %). Otro factor importante que influye en la sobrevivencia de *S. enterica* además de la temperatura, es el pH. Se ha demostrado que dicho enteropatógeno puede sobrevivir en un rango de pH que va desde 4.0 hasta 9.5 (Fatica & Schneider, 2011), por lo cual, el pH de las fuentes de agua y suelo analizadas, en conjunto con la temperatura ambiental, pudieron favorecer la sobrevivencia, e incluso el desarrollo de *Salmonella*. Las condiciones ambientales, específicamente de temperatura ambiental, fueron más adversas durante el invierno a comparación del resto de las estaciones, lo cual podría estar relacionado con la ausencia de *Salmonella* en las muestras de agua colectadas en esa estación. Existen otros factores que pueden asociarse también con la detección de este patógeno, tales como: la incorporación de agua contaminada a las fuentes de AgWA debido a deslaves o de manera intencional debido a la actividad humana, lluvia, poca profundidad del pozo, sistema poco eficiente del almacenamiento del agua, entre otros (Liu et al., 2018). De manera análoga, lo anterior también se observó en los SP1, SP2 y SP3, como se comentó anteriormente, que al no contar con protección la fuente de agua, estaba en contacto constante con el ambiente, eventos climatológicos y exposición a fauna, que pudieron haber comprometido la calidad microbiológica del agua. En SP4 cuyo nivel tecnológico es alto, no se detectó *S. enterica*, mientras que, si se detectó en los SP1, SP2 y SP3 de niveles medio y bajo de tecnología (Tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia de *S. enterica* in suelo, agua agrícola, y productos hortofrutícolas recolectados en los 4 sitios de producción agrícola en Querétaro durante las cuatro estaciones del año.

Sitio de muestreo	Tipo de muestra	n	Prevalencia [ +/n (%) ]				
			Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Total
SP1	Suelo	8	0/2	0/2	0/2	0/2	1/40 (2.5)
	AgWA	8	0/2	0/2	<b>1/2</b>	0/2	
	Lechuga iceberg	24	0/6	0/6	0/6	0/6	
SP2	Suelo	3	<b>1/2</b>	-	0/1	-	2/27 (7.4)
	AgWA	6	0/2	-	0/2	<b>1/2</b>	
	Tomate Roma	18	0/6	-	0/6	0/6	
SP3	AgWA	8	0/2	0/2	<b>1/2</b>	0/2	1/32
	Fresa	24	0/6	0/6	0/6	0/6	(3.1)
SP4	AgWA	8	0/2	0/2	0/2	0/2	0/32
	Toate cherry	24	0/6	0/6	0/6	0/6	(0)
Total:		131	1/36 (2.8)	0/26 (0)	2/35 (5.7)	1/34 (2.9)	4/131 (3.1)

(-): Muestra no analizada; SP: Sitio de producción; SP1: Corregidora; SP2: El Marques; SP3: Amealco; SP4: Colón

El hecho de encontrar *Salmonella* en muestras de AgWA y suelo sugiere que el agua puede ser un vehículo importante de microorganismos patógenos durante el cultivo de lechuga, tomate Roma y fresa en el estado de Querétaro. Se ha documentado que tanto el agua de pozo, como el agua superficial, pueden estar expuestas a actividades del humano y fenómenos naturales, que incluyen precipitaciones pluviales, fauna, ganado, descarga de aguas residuales, entre otros, y por tanto pueden llegar a contaminarse (Liu et al., 2018).

Cabe resaltar que, durante el 2017 en México, se estimó que uno de cada 27 personas se enferma de salmonelosis. De 1972 a 1999 los serotipos reportados con mayor frecuencia en México fueron: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Agona* y *S. Newport*, con 20 %, 18 %, 6 % y 6 %, respectivamente. Lo anterior, se ha podido corroborar con los artículos publicados por el cuerpo académico de inocuidad

microbiana en los alimentos (Godínez-Oviedo et al., 2020, 2022a). Pese a que existe el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de México (SINAVE), la información es limitada o bien no es representativa de la incidencia de los patógenos en alimentos. Con base en la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que, de cada 10 casos de salmonelosis, de 6 a 8 no son reportados, dado que: 1) se consideran como casos aislados o 2) no son diagnosticados (Godínez-Oviedo et al., 2020). Debido a los motivos anteriormente expuestos, es necesario generar más información epidemiológica.

Pese a que en este estudio no se detectaron muestras positivas para *E. coli* O157:H7, hoy en día existe evidencia sobre la importancia de este patógeno en hortalizas de hoja. Recientemente en el 2018 en EUA, ocurrió un brote relacionado con lechugas Romanas contaminadas, donde se pudo identificar que el agua era reservorio del serotipo mencionado (FDA, 2018).

#### V.III. Caracterización de cepas de *Salmonella* aisladas de agua y suelo

Se recuperaron 7 cepas de *S. enterica* a partir de las muestras de agua y suelo. Las cepas se identificaron como: MVG\_S001 (SP2, otoño, suelo); MVG\_S002 (SP1, primavera, AgWA); MVG\_S003 (SP1, primavera, agua); MVG\_S004 (SP1, primavera, AgWA); MVG\_S005 (SP3, primavera, AgWA); MVG\_S006 (SP3, primavera, AgWA); MVG\_S007 (SP2, verano, AgWA). Estos aislados se sometieron a caracterización mediante resistencia térmica y susceptibilidad a antibióticos.

Se calculó la tasa de inactivación específica ( $K_{max}$ ) ante diferentes temperaturas (Tabla 10). El análisis estadístico de los datos de susceptibilidad térmica mostró que la temperatura, la cepa y su interacción (Figura 10) tuvieron influencia en la sobrevivencia de *S. enterica* ( $p \leq 0.05$ ). Como era de esperarse, en términos generales los aislados fueron más susceptibles a 60 °C. A 55 y 50 °C se observó que la susceptibilidad al calentamiento fue similar entre los aislados y la cepa de referencia *S. Typhimurium* ATCC 14028 ( $p > 0.05$ ). Los aislados MVG\_S004 y MVG\_S003 mostraron mayor susceptibilidad a 60 °C, y presentaron valores de  $K_{max}$

de 0.92 y 0.75, respectivamente.

Tabla 10. Tasa de inactivación específica de los aislados de *S. enterica* a 60, 55 y 50 °C.

Cepa	$K_{max}$											
	60° C			55° C			50° C					
S. Typhimurium	0.43	±	0.08	cde	0.12	±	0.01	ef	0.08	±	0.04	f
ATCC 14028												
MVG_S001	0.49	±	0.11	bcd	0.09	±	0.06	f	0.11	±	0.07	f
MVG_S002	0.53	±	0.14	bc	0.14	±	0.05	ef	0.07	±	0.07	f
MVG_S003	0.75	±	0.37	ab	0.14	±	0.06	ef	0.11	±	0.08	f
MVG_S004	0.92	±	0.16	a	0.16	±	0.07	ef	0.15	±	0.09	ef
MVG_S005	0.53	±	0.14	bc	0.12	±	0.04	ef	0.11	±	0.06	f
MVG_S006	0.72	±	0.09	abc	0.15	±	0.09	ef	0.15	±	0.06	ef
MVG_S007	0.64	±	0.14	abc	0.14	±	0.06	ef	0.18	±	0.14	def
Promedio	0.63	±	0.22		0.13	±	0.05		0.12	±	0.07	
Mediana de $R^2$			0.98				0.92				0.85	

$K_{max}$  es una tasa de inactivación específica [1/min]. Media ± D.E. Letras diferentes en cada fila y columna son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

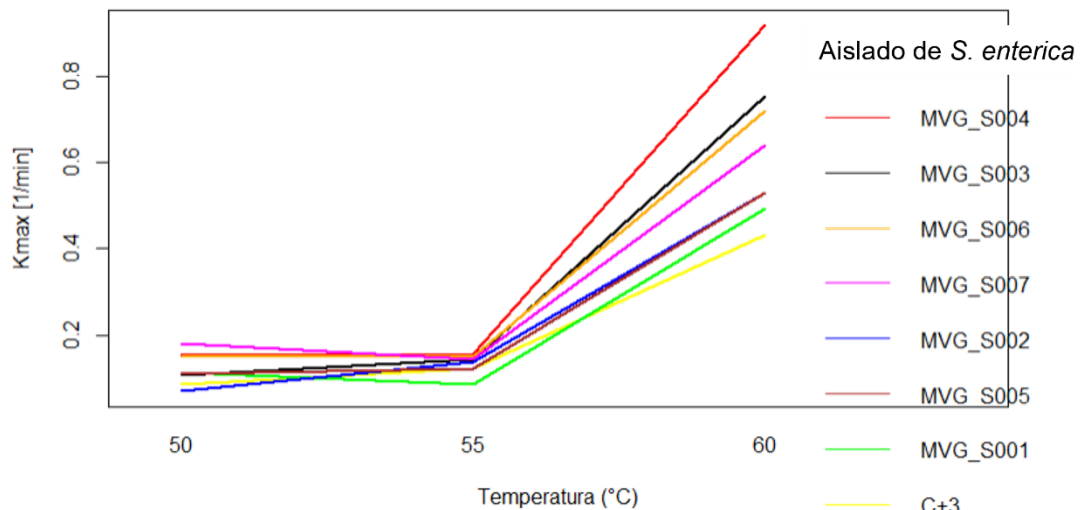


Figura 10. Gráfica de efecto de interacción entre la temperatura y los aislados de *S. enterica* ( $p= 0.023$ ). C+3: *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Un aspecto importante de señalar es que con frecuencia los alimentos son sometidos a procesos térmicos con el propósito de reducir la contaminación microbiana que pudiera estar presente en el producto. El calentamiento de los alimentos trae beneficios, tanto de inocuidad (elimina el riesgo de presencia de microorganismos patógenos), como de calidad (aumenta la vida de anaquel). La efectividad de estos tratamientos se puede evaluar a nivel de laboratorio, estableciendo combinaciones de tiempo y temperatura acordes al tipo de alimento (Verheyen et al., 2019). Generalmente, se asume que la inactivación de los microorganismos presenta un comportamiento decreciente logarítmico lineal, sin embargo, en algunos alimentos puede no serlo y en estos casos la velocidad de inactivación de *S. enterica* se puede calcular mediante modelos matemáticos no lineales. Factores, como el estado fisiológico de las células y el tipo de microorganismo, pueden influir en la respuesta, que generalmente se expresa como el valor D y Z (Van Asselt & Zwietering, 2006) o  $K_{max}$  (Geeraerd et al., 2005).

El promedio de los valores D de todos los aislados y la cepa de referencia a 60 °C, 55 °C y 50 °C fue  $4.1 \pm 1.1$ ,  $23.4 \pm 13.2$ , y  $26.0 \pm 55.5$  min, respectivamente (Tabla 11); es decir, los valores de inactivación fueron dependientes de la temperatura ( $p = 1.3e-07$ ). Hassan et al. (2022) determinaron la resistencia térmica de aislados de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* obtenidos de muestras de pollo, queso, tahini y carne cruda en el Líbano, a 55, 60, 65, 70 y 75 °C, durante 10 min y se determinaron los valores D. Ellos concluyeron que a 55 °C las poblaciones microbianas de los aislados de *Salmonella* no se redujeron, mientras que, a 60 °C, obtuvieron valores  $D_{60}$  que fueron desde 7.32 hasta 28.80 min. Los valores D fueron disminuyendo a medida que la temperatura iba incrementándose. Al comparar estos resultados, con los obtenidos en el presente estudio, se pudo observar que los aislados de las muestras de AgWA y suelo, presentaron mayor susceptibilidad a la temperatura, lo cual puede estar relacionada con la fuente de aislamiento. Es decir, las matrices alimentarias pueden contener gran cantidad de componentes, tales como proteínas y grasas, que les confieren mayor capacidad de sobrevivencia a los patógenos, en comparación a los aislados presentes en muestras ambientales (Verheyen et al., 2019). En otro estudio, Márquez-González et al. (2022) evaluaron la resistencia térmica de *S. enterica* en muestras de quesillo, a 48, 54, 60, 65 y 70 °C. Los valores  $D_{48}$ ,  $D_{54}$ ,  $D_{60}$ ,  $D_{65}$  y  $D_{70}$  fueron 91.74, 16.05, 4.50, 1.62 y 0.80 min, respectivamente. De manera sorprendente, los resultados fueron similares con los valores obtenidos para  $D_{60}$ , pese a la diferencia en las matrices a partir de las cuales fueron aisladas.

Tabla 11. Valores D de los aislados de *S. enterica* a 60, 55 y 50 °C

Cepa	Valor D (min)											
	D <sub>60</sub>			D <sub>55</sub>			D <sub>50</sub>					
S. Typhimurium ATCC 14028	5.5	±	1.0	<sup>b</sup>	19.3	±	2.4	<sup>ab</sup>	28.3	±	17.5	<sup>a</sup>
MVG_S001	4.8	±	1.0	<sup>b</sup>	53.6	±	51.6	<sup>ab</sup>	36.2	±	24.9	<sup>a</sup>
MVG_S002	4.6	±	1.2	<sup>a</sup>	17.2	±	5.9	<sup>a</sup>	44.0	±	36.8	<sup>a</sup>
MVG_S003	3.1	±	1.5	<sup>a</sup>	18.7	±	5.9	<sup>a</sup>	39.1	±	34.1	<sup>a</sup>
MVG_S004	3.2	±	1.3	<sup>b</sup>	21.7	±	5.7	<sup>a</sup>	26.1	±	10.9	<sup>a</sup>
MVG_S005	4.5	±	1.2	<sup>a</sup>	16.5	±	8.8	<sup>a</sup>	25.8	±	23.8	<sup>a</sup>
MVG_S006	3.8	±	1.1	<sup>a</sup>	19.3	±	16.2	<sup>a</sup>	17.2	±	10.8	<sup>a</sup>
MVG_S007	3.2	±	0.4	<sup>b</sup>	21.2	±	9.3	<sup>a</sup>	21.9	±	15.8	<sup>a</sup>
Promedio	4.1	±	1.1		23.4	±	13.2		26.0	±	55.5	

Media ± D.E. Letras diferentes entre líneas son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Hoy en día la presencia de microorganismos resistentes a antimicrobianos en alimentos, agua y entornos de producción y procesamiento de alimentos es una gran preocupación ya que puede favorecer la aparición de cuadros clínicos mucho más graves. Por lo anterior, se realizó la evaluación de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *S. enterica* aisladas. El estudio mostró que la mayoría de las cepas de *S. enterica* fueron sensibles al cloranfenicol, la carbencilina, la norfloxacin, la netilmicina y la gentamicina (Tabla 12). En contraste, todos los aislados mostraron ser resistentes o con resistencia intermedia a cefotaxima y a sulfametoxazol/trimetoprima. Con relación a la ampicilina, a excepción de la cepa MVG\_S006, los seis aislados restantes fueron resistentes. Una situación similar se observó con la amikacina y el ciprofloxacino, ya que todos los aislados excepto MVG\_S007, fueron resistentes. De los siete aislados, cinco mostraron resistencia a cefalotina. Un hallazgo interesante y de preocupación, es que todos los aislados de



*S. enterica* mostraron ser MDR.

Danmaliki et al., (2023) muestrearon agua subterránea en Gusau, Nigeria y encontraron una prevalencia del 8 % de *Salmonella* y las cepas recuperadas fueron resistentes a gentamicina (50 %), cefotaxima (100 %) y nitrofurantoina (50 %). Por otra parte, en un estudio realizado por Suhartono et al., (2021), se recuperaron 19 aislados de *Salmonella* a partir del río Krueng Aceh en Indonesia. Las cepas mostraron resistencia a ampicilina (58 %), gentamicina (26 %), cefotaxima (32 %), ciprofloxacino (21 %) y cloranfenicol (26 %). Los resultados del presente trabajo fueron similares a lo reportado por Krueng Aceh con relación a la resistencia observada con ampicilina, gentamicina y cloranfenicol.

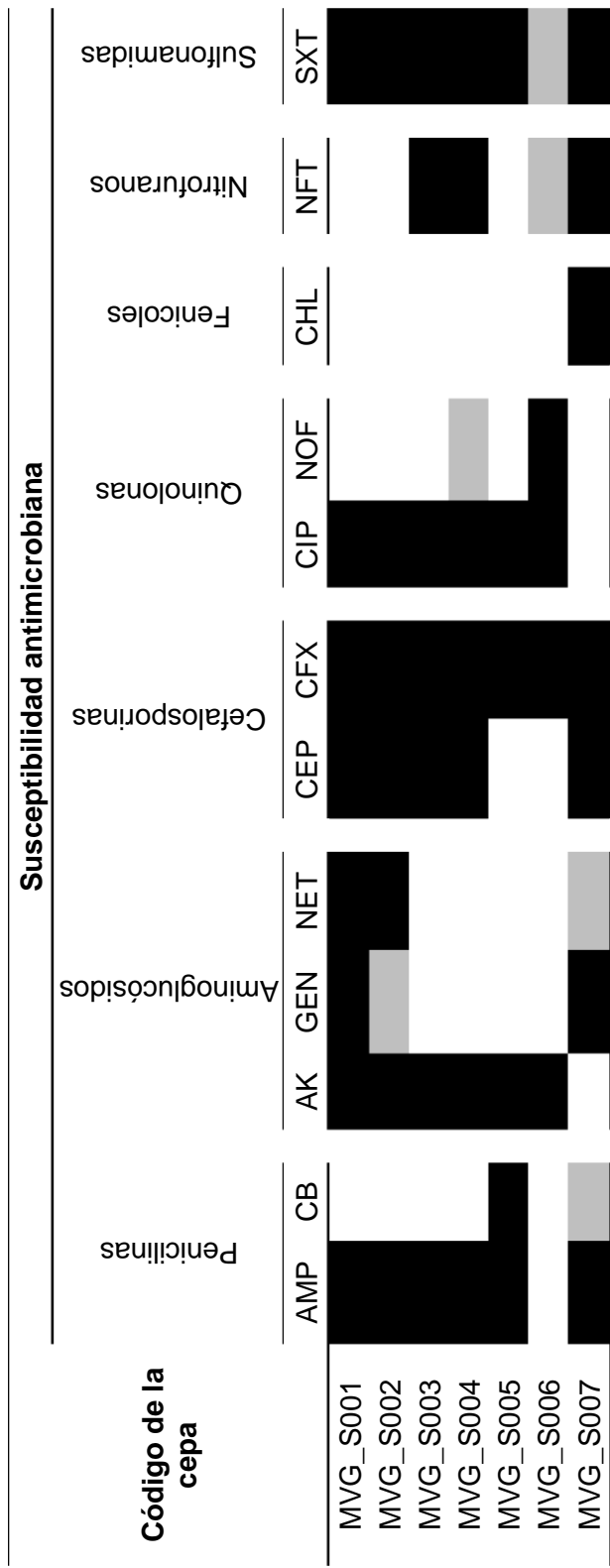
Asimismo, nuestro grupo de trabajo reportó previamente la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *S. enterica* aisladas a partir de muestras de mango, tomate y pollo crudo, recolectadas en Aguascalientes, Querétaro y Guadalajara. De manera similar con este trabajo, se encontró que el 92 % (260/284) de los aislados mostró resistencia a al menos un antibiótico, siendo ampicilina el antibiótico con mayor frecuencia acumulada. Asimismo, el 55% de los aislados fueron MDR (Godínez-Oviedo et al., 2022a).

El cloranfenicol fue el primer antibiótico al cual *Salmonella* mostró resistencia en la década de los 60s. Desde entonces, se detectaron más serotipos con resistencia a uno o más antibióticos y éste fenómeno se ha ido esparciendo en múltiples países, tales como Reino Unido, EUA, Arabia Saudita, entre otros (Eng et al., 2015). Anteriormente, para las infecciones ocasionadas por *Salmonella* se prescribía ampicilina, cloranfenicol y trimetoprima/sulfametoxazol. Actualmente, estos tres antibióticos ya no se utilizan con la misma frecuencia debido a la MDR. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos, a excepción del cloranfenicol. Dada la ineficiencia de los antibióticos tradicionales, se empezó a administrar quinolonas (como ciprofloxacina y norfloxacina) y cefalosporinas (como cefalotina), no obstante, mostraron resistencia en un tiempo más corto, a comparación de los antibióticos convencionales. Actualmente, se recetan quinolonas y cefalosporinas

de tercera generación para combatir infecciones de salmonelosis causadas por cepas con MDR (Eng et al., 2015).

El hecho de que los aislados de *S. enterica* recuperados a partir de muestras de suelo y AgWA (tanto subterránea como superficial), mostraron ser MDR, permite reiterar la problemática actual en materia de salud pública nacional y mundial, ya que: 1) existe resistencia a antimicrobianos en cepas presentes en fuentes de agua que se pueden diseminar rápidamente; 2) las limitadas opciones con las se cuentan para el tratamiento en pacientes confirmados con salmonelosis (el cual ya se discutió anteriormente); 3) las cepas de *Salmonella* MDR generan cuadros con mayor severidad y virulencia, lo cual provoca que el tiempo de recuperación en el individuo se alargue (Eng et al., 2015).

Tabla 12. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *S. enterica* de suelo y agua recolectados en los cuatro sitios de producción agrícola.



Amikacina (AK, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), carbencilina (CB, 100 µg), cefalotina (CEP, 30 µg), cefoxitina (CFX, 30 µg), ciprofloxacino (CIP, 30 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), netilmicina (NET, 20 µg), nitrofurantoina (NFT, 300 µg), norfloxacina (NOF, 10 µg), y trimetoprima/sulfametoxazol (SXT, 1.25/23.75 µg). ■: resistente al antibiótico; ■: resistencia intermedia; □: susceptible.

V.IV. Calidad microbiológica del agua y productos hortofrutícolas en función de la concentración de coliformes fecales y *E. coli*.

La industria agrícola de EUA consume aproximadamente 447 millones de litros de agua al día, y cerca de la mitad de dicho recurso proviene de agua superficial (Gurtler & Gibson, 2022). En México, la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) estimó en 2020, que del 100 % del agua que se consumió a nivel nacional, el 68% se destinó como AgWA (60,460 hm<sup>3</sup> o ~166,000 L/día) de los cuales, el 65 % correspondió a agua superficial (SINA, 2020). Dada la importancia que tiene el AgWA como vehículo de microorganismos patógenos, los países por medio de regulaciones propias evalúan su calidad microbiológica en función de la presencia y concentración de microorganismos indicadores.

Así pues, en este estudio la prevalencia global en muestras de agua/AgWA y PH fue de 39% para coliformes fecales (Tabla 13) y 19 % para *E. coli* (Tabla 14). Con excepción de la lechuga producida en SP1 (71 %) y el tomate Roma de SP2 (6 %), en ninguno de los PH restantes se encontraron coliformes fecales. De manera similar, *E. coli* se detectó en muestras de lechuga (29 %) y no en tomate Roma, fresa y tomate *cherry*. El rango de medianas de la concentración de coliformes fecales en el agua/AgWA y en PH fueron 1.00 – 3.20 NMP/100 mL y 4.32 a 56.91 NMP/ g, respectivamente. La concentración de *E. coli* en agua y AgWA estuvo en el rango de 1.00 – 3.20 NMP/100 mL y en PH fue de 4.32 a 11.46 NMP/ g.

Tabla 13. Prevalencia y concentraciones de coliformes fecales en agua y productos hortofrutícolas en los cuatro sitios de producción de frutas y hortalizas en el estado de Querétaro, durante las cuatro estaciones del año

Sitio de muestreo	Matriz	Otoño			Invierno			Primavera			Verano			Prevalencia total [+/-n (%)]
		Prevalencia [+/-n (%)]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [+/-n (%)]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [+/-n (%)]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [+/-n (%)]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [+/-n (%)]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [+/-n (%)]	Mediana (NMP/100 mL o g)	
SP1	AgWA	2/2 (100)	3.20	2/4 (50)	1.02	0/4 (0)	1.00	4/4 (100)	2.31	8/14 (57)				
	Lechuga Iceberg	5/6 (83)	13.92	4/6 (67)	4.52	2/6 (33)	4.32	6/6 (100)	56.91	17/24 (71)				
SP2	AgWA	3/3 (100)	1.41	-	-	4/4 (100)	2.61	3/4 (75)	2.31	10/11 (91)				
	Tomate Roma	0/6 (0)	4.32	-	-	1/6 (17)	4.32	0/6 (0)	4.32	1/18 (6)				
SP3	AgWA	4/4 (100)	3.20	2/4 (50)	1.32	2/4 (50)	1.02	2/4 (50)	1.02	10/16 (63)				
	Fresa	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/24 (0)				
	Agua	2/2 (50)	1.21	2/2 (100)	3.91	1/2 (50)	1.52	2/2 (100)	2.60	7/8 (88)				
SP4	AgWA	0/2 (0)	1.00	2/2 (100)	3.61	1/2 (50)	1.42	0/2 (0)	1.00	3/8 (60)				
	Tomate cherry	0/6 (0)	4.32	1/6 (17)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	1/24 (4)				
Total:		16/37 (43)	-	13/30 (43)	-	11/40 (28)	-	17/40 (43)	-	57/147 (39)				

(-): No aplica; SP: Sitio de producción agrícola; AgWA: agua agrícola.

La CONAGUA, es el organismo mexicano encargado de analizar a lo largo del territorio mexicano, la calidad química y microbiológica del agua, y uno de los parámetros para su evaluación es a través de la cuantificación de la concentración de coliformes fecales y *E. coli* los cuales se encuentran clasificados dentro de una escala, que se divide en cinco categorías (CONAGUA, 2022):

- **EXCELENTE**: no contaminada ( $CF \leq 100$ ;  $E. coli \leq 250$ ),
- **BUENA CALIDAD**: satisfactoria para la vida acuática y uso recreativo con contacto primario ( $100 < CF \leq 200$ ;  $250 < E. coli \leq 500$ ),
- **ACEPTABLE**: satisfactoria como fuente de abastecimiento de agua potable y riego agrícola ( $200 < CF \leq 1,000$ ;  $500 < E. coli \leq 1,000$ ),
- **CONTAMINADA**: con contaminación bacteriológica ( $1,000 < CF/E. coli \leq 10,000$ ),
- **FUERTEMENTE CONTAMINADA**: con fuerte contaminación ( $CF/ E. coli > 10,000$ )

Los resultados obtenidos se analizaron para evaluar el cumplimiento de este criterio. Se observó que el AgWA y el agua, cumplieron con los requisitos indicados para las coliformes fecales (Tabla 13). Usando el mismo criterio, pero ahora basado en las concentraciones de *E. coli* en el agua y AgWA, de igual manera todos los SP cumplieron con este criterio (Tabla 14). En términos generales, los intervalos de aceptación o rechazo de los microorganismos indicadores usados para establecer la calidad del AgWA en México, arrojaron un excelente perfil microbiológico del agua en todos los SP sin importar la estación. Sin embargo, en SP1 cuya AgWA tuvo un valor correspondiente a “excelente calidad”, se encontró *S. enterica* en dicha matriz; en SP2 durante el verano, nuevamente se encontró *Salmonella* mientras que los indicadores tenían un criterio “excelente” (2.31 NMP/100 mL para coliformes fecales y 1.55 NMP/100 mL para *E. coli*). Finalmente, en la tercera muestra de AgWA positiva a dicho patógeno que fue identificada durante primavera en SP3, la concentración de coliformes fecales y *E. coli* fueron 1.02 y 1.00 NMP/100 mL, respectivamente.

Tabla 14. Prevalencia y concentraciones de *E. coli* en agua y productos hortofrutícolas en los cuatro sitios de producción de frutas y hortalizas en el estado de Querétaro, durante las cuatro estaciones del año

Sitio de muestreo	Matriz	Otoño			Invierno			Primavera			Verano			Prevalencia total [+/-n (%)]
		Prevalencia [+/-n (%)]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [%]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [%]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [%]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [%]	Mediana (NMP/100 mL o g)	Prevalencia [%]	Mediana (NMP/100 mL o g)	
SP1	AgWA	2/2 (100)	2.02	0/4 (0)	1.00	0/4 (0)	1.00	4/4 (100)	1.74	6/14 (43)				
	Lechuga Iceberg	5/6 (83)	11.46	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	2/6 (33)	4.32	7/24 (29)				
SP2	AgWA	1/3 (33)	1.00	-	-	0/4 (0)	1.00	4/4 (100)	1.55	5/11 (45)				
	Tomate Roma	0/6 (0)	4.32	-	-	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/18 (0)				
SP3	AgWA	4/4 (100)	3.20	1/4 (25)	1.00	1/4 (25)	1.00	2/4 (50)	1.02	8/16 (50)				
	Fresa	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/24 (0)				
	Agua	1/2 (50)	1.02	1/2 (50)	1.19	0/2 (0)	1.00	0/2 (0)	1.00	2/8 (25)				
SP4	AgWA	0/2 (0)	1.00	0/2 (0)	1.00	0/2 (0)	1.00	0/2 (0)	1.00	0/8 (0)				
	Tomate cherry	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/6 (0)	4.32	0/24 (0)				
Total:		13/37 (35)	-	2/30 (7)	-	1/40 (3)	-	12/40 (30)	-	28/147 (19)				

(-): No aplica; SP: Sitio de producción agrícola; AgWA: agua agrícola.

La Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA, por sus siglas en inglés) de EUA a través de PSR en la fracción 21CFR112.44 subparte E, desarrolló el Perfil de Calidad Microbiana del Agua (WMQP), el cual a excepción de los germinados se clasifica en dos categorías: 1) Durante la producción y 2) Durante la cosecha y actividades posteriores a la cosecha. Para la producción (1), existen dos criterios de conformidad a cubrir: la media geométrica (MG)  $\leq 126$  UFC *E. coli* /100 mL y el valor umbral estadístico (VUE)  $\leq 410$  UFC *E. coli* /100 mL; mientras que para el agua de postcosecha (2) se estipula que en la muestra de agua analizada no debe estar presente *E. coli* en 100 mL de agua. Los resultados del análisis del AgWA de este estudio, se presentan en la Tabla 14. Se observó la presencia de *E. coli* en AgWA de SP1 y SP2 durante el otoño y verano, mientras que en SP3 se detectó en todas las estaciones. De manera interesante, se observó que solamente el AgWA de SP4 resultó adecuada para su uso durante la cosecha de tomate *cherry* y actividades posteriores a la cosecha con base en el criterio PSR. El WMQP durante la etapa de producción se ilustra en la Tabla 15. Con base en FSMA, nuevamente todos los SP cumplieron con el criterio de PSR, en función de la MG y el VUE. Cabe mencionar que en el SP3 solamente se analizaron 16 muestras de agua superficial, cuando el mínimo requerido es de 20. No obstante, el estudio mostró que la fuente de agua podría ser adecuada para su uso provisto.

Al realizar la comparación entre ambas normativas, se encontró que el criterio usado por CONAGUA, que, aunque no contienen los mismos requisitos, arroja el mismo veredicto en comparación del MWQP de PSR (apta para uso durante la producción agrícola). Aun así, es preferible no usar las coliformes fecales como un indicador de inocuidad en el agua, puesto a que su presencia no se asocia directamente con contaminación fecal (Doğan-Halkman et al., 2003).

Aunque *E. coli* es el microorganismo indicador más confiable y usado para evidenciar contaminación fecal y relacionarlo de manera indirecta con la presencia de microorganismos patógenos, no siempre existe esta asociación. Gorski et al., (2022) reportaron que no hubo una correlación directa entre la cantidad de *E. coli* genérica



presente, con la probabilidad de encontrar *Salmonella* en la misma muestra. En este trabajo se encontró que solamente una de las tres muestras positivas a *S. enterica* en AgWA, también contenía *E. coli* genérica en bajas concentraciones (16 NMP/100 mL en SP3). Además, durante primavera se registró la menor prevalencia de *E. coli* (3 %) en contraste con mayor positividad de *S. enterica*, que podría estar relacionado con una mayor tasa de inactivación debido a mayor temperatura ambiental, radiación UV, entre otros factores que ya se abordaron anteriormente.

Tabla 15. Perfil microbiológico de la calidad del agua con base en la regla de inocuidad de los productos, basado en el contenido de *E. coli* en cuatro sitios de producción agrícola.

Sitio de muestreo	Media geométrica			Valor Umbral Estadístico		
	NMP/ 100 mL	Log NMP/ 100 mL	Dictamen	NMP/ 100 mL	Log NMP/ 100 mL	Dictamen
Valores de referencia para el agua de pozo y superficial	≤126	≤2.10	-	≤410	≤2.61	-
SP1	4	0.57	Si cumple	7	0.83	Si cumple
SP2	3	0.50	Si cumple	16	1.19	Si cumple
SP3	3	0.44	Si cumple	16	1.21	Si cumple
SP4	1	0.00	Si cumple	1	0.00	Si cumple

(-): No aplica; SP: Sitio de producción.

V.V. Correlación entre la aplicación de BPA, el nivel de tecnología de los sitios de producción con la contaminación microbiana de frutas y hortalizas. Para conocer la asociación que existe entre el nivel tecnológico de los SP con el

porcentaje de cumplimiento de las BPA, se realizó un análisis de correlación de Pearson. Se obtuvo una fuerte correlación positiva ( $r= 0.97$ ,  $p \leq 0.05$ ) entre los valores obtenidos del porcentaje de cumplimiento de BPA con el nivel tecnológico de cada SP. Lo anterior sugiere que específicamente en este trabajo, para los cuatro SP a mayor recurso de los productores, mejor será la capacidad de implementación de BPA.

También se estudió la correlación entre la aplicación de BPA con la prevalencia de *S. enterica* (Figura 11 A), *E. coli* (Figura 11 B) y coliformes fecales (Figura 11 C). Para *S. enterica* y las coliformes fecales se obtuvieron correlaciones negativas y no significativas de  $r= -0.22$  y  $r= -0.06$  ( $p > 0.05$ ), respectivamente. Lo anterior indica que la implementación de BPA podría no estar asociada con la baja prevalencia de *S. enterica* ni de las coliformes fecales, éstos últimos debido a su origen inespecífico. Lo anterior permite ratificar que las coliformes fecales no son confiables como indicadores de cumplimiento de BPA (Figura 11 A y C).

De la misma manera, se estudió el grado de asociación que existe entre el cumplimiento de las BPA con la prevalencia de *E. coli* genérica en agua/AgWA. Se observó una moderada correlación negativa ( $r= -0.54$ ;  $p \leq 0.05$ ); es decir, a medida que las BPA se implementan y se les da seguimiento con base en los criterios estipulados, menor es la probabilidad de encontrar *E. coli* en muestras de agua o AgWA (Figura 11 B).

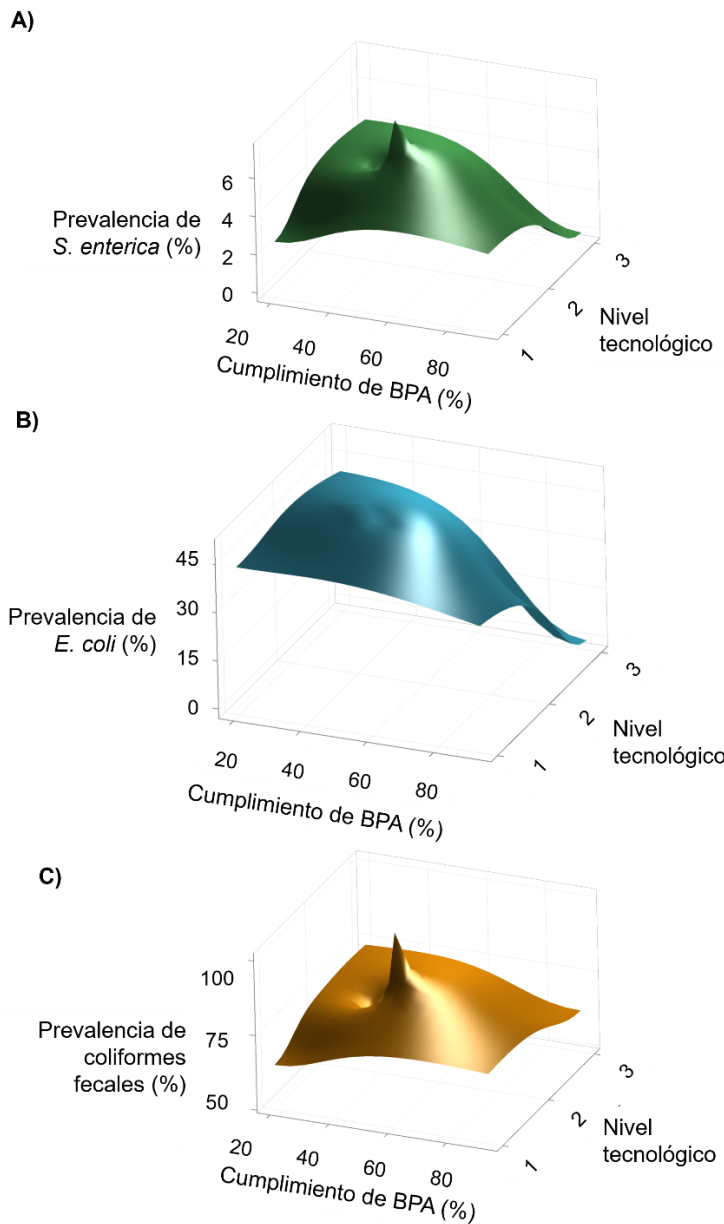


Figura 11. Gráficas de superficie 3D que ilustran la relación entre factores que influyen en la contaminación y la presencia de indicadores microbianos y *S. enterica* en los SP.

A) Asociación entre la aplicación de BPA, nivel tecnológico y prevalencia de *S. enterica*; B) Asociación entre la aplicación de BPA, nivel tecnológico y prevalencia de *E. coli* en agua/AgWA; C) Asociación entre la aplicación de BPA, nivel

tecnológico y prevalencia de coliformes fecales en agua/AgWA.

Estudios reportados por otros investigadores, en donde evaluaron la prevalencia de *Salmonella* en fuentes de AgWA, también realizaron análisis de correlación entre la concentración de *Salmonella* y su asociación con factores extrínsecos como temperatura del agua. También buscaron determinar el grado de asociación entre la prevalencia de *Salmonella* con las concentraciones de *E. coli* en la misma muestra, y si cumple o no con el criterio PSR. En todos los casos, se encontró que no hay un fuerte grado de asociación entre los parámetros evaluados: *Salmonella* y temperatura del río ( $r=0.204$ ,  $p= 0.017$ ) (González-López et al., 2022); y aunque no se indica un valor de coeficiente de correlación entre la prevalencia de *Salmonella* con el cumplimiento de PSR, se menciona que la probabilidad de encontrar *Salmonella* es 2.54 veces más en las muestras que no cumplen con el criterio PSR (Murphy et al., 2022).

De manera importante, un estudio reportado por de Quadros Rodrigues et al., (2014), implementaron también un cuestionario para evaluar el grado de implementación de BPA *in situ* en tres invernaderos de producción de lechuga orgánica en el estado Rio Grande do Sul en Brasil. Adicionalmente, evaluaron 132 muestras que incluyeron abono orgánico, suelo, agua, herramientas, lechugas y manos de los trabajadores, para detectar la presencia de *Salmonella* y *E. coli* O157, así como también cuantificaron a *E. coli*. Ellos encontraron *E. coli* O157 en dos muestras de AgWA y *Salmonella* en una muestra de lechuga. Determinaron que la inspección de BPA en conjunto con el análisis microbiológico puede ayudar a identificar puntos de mejora durante la producción de lechuga orgánica.

Por lo anterior, la incorporación del monitoreo de la aplicación de BPA de los SP podría resultar una herramienta de utilidad, que podría permitir obtener más información y facilitar la toma decisiones.

Finalmente, se elaboró un mapa con las ubicaciones geográficas de los SP que

presentaron los recursos agrícolas contaminados con *S. enterica* y *E. coli* (Figura 12). Como se mencionó previamente el único sitio libre de contaminación de origen fecal y de *S. enterica* fue SP4.

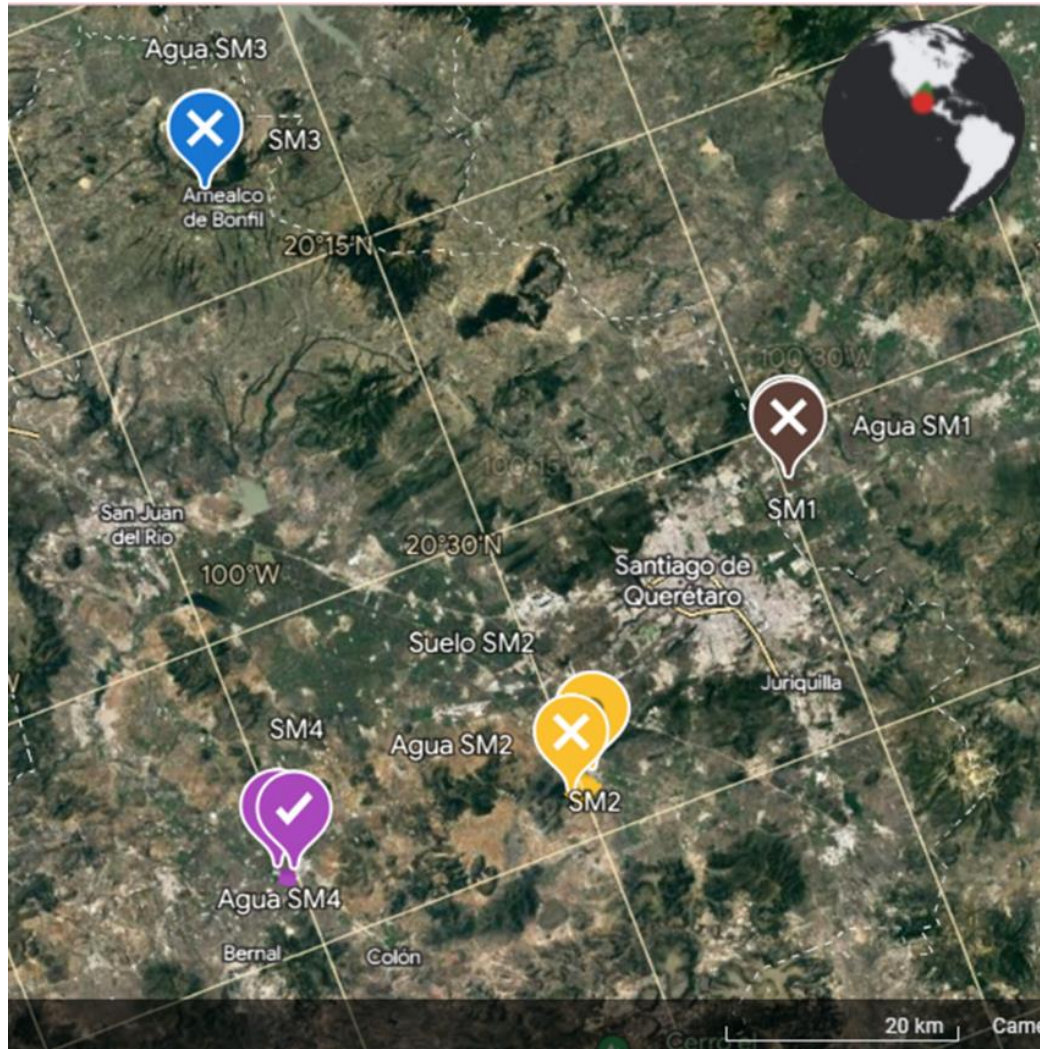


Figura 12. Ubicación geográfica de los SP y los reservorios de AgWA y suelos contaminados con *Salmonella*.

Palomita (✓): Indica ausencia de *Salmonella*; Tache (X): Indica presencia de *Salmonella* y *E. coli*.

## VI. CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo permitió conocer la asociación entre las BPA, el nivel tecnológico y la estacionalidad, con la prevalencia de tres bacterias patógenas al humano en cuatro SP en el estado de Querétaro. Los resultados obtenidos evidenciaron que la correcta implementación de las BPA está relacionada con el recurso económico y el nivel de tecnología con el que cuentan los SP. Es decir, a mayor recurso económico del productor, mejora la capacidad de cumplimiento de BPA que indudablemente podría disminuir el riesgo de contaminación de frutas y hortalizas con microorganismos patógenos.

*S. enterica* fue el único patógeno detectado mayoritariamente en la época cálida (primavera y verano) en suelo y agua. A pesar de que la prevalencia global del patógeno fue muy baja (3 %) su presencia en AgWA evidenció la necesidad de reforzar el monitoreo y las estrategias de control para prevenir la contaminación.

El AgWA de los cuatro SP cumplió con el criterio microbiológico de concentración de CF y *E. coli* establecido por CONAGUA y también con el estándar de inocuidad de PSR para exportación a USA, sin embargo, la presencia de *E. coli* en AgWA en los tres SP de niveles bajos y medios tecnológicos, demostró que el agua está expuesta a contaminación fecal, representando un riesgo potencial de contaminación de los PH con patógenos entéricos u otros patógenos de origen intestinal, principalmente durante el periodo de cosecha y actividades postcosecha. Las cepas de *S. enterica* aisladas agua y suelo presentaron multirresistencia a antibióticos, lo que evidenció que estos ambientes están sujetos a fuentes de contaminación que vehiculizan a estos microorganismos.

Es imprescindible hacer adaptaciones a la política pública en materia de calidad microbiológica del agua, dado que los parámetros que rigen actualmente a México no muestran una asociación con el cumplimiento de las BPA que tienen como objetivo minimizar la contaminación de los PH con agentes patógenos.

Finalmente, este trabajo expone la necesidad de seguir estudiando y evaluando las fuentes de agua y los sitios de producción agrícola, a lo largo de la república

mexicana, tratando de buscar la participación activa de todos los actores: academia, la industria, el sector privado y la población en general.

## VII. REFERENCIAS

- Acuff, J. C., Waterman, K., Ramakrishnan, J., & Ponder, M. A. (2021). Thermal resistance of single strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O121:H19 and O157:H7 based on culture preparation method and osmolyte-reduced water activity. *Journal of Food Protection*, *84*(1), 122–127. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-122>
- Agricultural Marketing Service. (2023). *Good Agricultural Practices (GAP) Audits*. U.S. Department of Agriculture. <https://www.ams.usda.gov/services/auditing/gap-ghp>
- Agrolab. (2014). *Protocolo de muestreo biológico* (p. 6). <http://www.agrolab.com.mx/sitev002/sitev001/assets/ai2-mc-05-en-uso.pdf>
- Aiyedun, S. O., Onarinde, B. A., Swainson, M., & Dixon, R. A. (2021). Foodborne outbreaks of microbial infection from fresh produce in Europe and North America: a systematic review of data from this millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, *56*(5), 2215–2223. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14884>
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., Guerra, N. P., & Pastrana, L. (2014). Thermal resistance of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable feed ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(11), 2274–2281. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6554>
- Banach, J. L., & van der Fels-Klerx, H. J. (2020). Microbiological reduction strategies of irrigation water for fresh produce. *Journal of Food Protection*, *83*(6), 1072–1087. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-466>
- BD Diagnostic Systems. (2017). *Mueller hinton II agar: Vol. PA-254032*. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>

- Bentley, J. (2019). *Romaine and leaf lettuces almost as popular as head lettuce*. USDA. <https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=93321>
- Bishwajit, G., O'Leary, D. P., Ghosh, S., Sanni, Y., Shangfeng, T., & Zhanchun, F. (2017). Association between depression and fruit and vegetable consumption among adults in South Asia. *BMC Psychiatry*, 17(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12888-017-1198-1>
- Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G., & Candresse, T. (2011). *Enfermedades del tomate*. Mundi-Prensa México, s.a. de C.V. [https://books.google.com.mx/books?id=a0SAQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=tomate&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=tomate&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=a0SAQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=tomate&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=tomate&f=false)
- Brookie, K. L., Best, G. I., & Conner, T. S. (2018). Intake of raw fruits and vegetables is associated with better mental health than intake of processed fruits and vegetables. *Frontiers in Psychology*, 9(APR), 373–382. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00487>
- Brooks, J. (2015). Soil sampling for microbial analyses. In *Manual of Environmental Microbiology* (Issue 5). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818821.ch2.6.3>
- Brouwer, A. F., Masters, N. B., & Eisenberg, J. N. S. (2018). Quantitative microbial risk assessment and infectious disease transmission modeling of waterborne enteric pathogens. *Current Environmental Health Reports*, 5, 293–304. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0196-x>
- Burkhardt, W., Feng, P., Weagant, S. D., & Grant, M. A. (2020). *BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Bacteriological Analytical Manual (BAM). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
- Canizalez-Roman, A., Velazquez-Roman, J., Valdez-Flores, M. A., Flores-Villaseñor, H., Vidal, J. E., Muro-Amador, S., Guadrón-Llanos, A. M., Gonzalez-



- Nuñez, E., Medina-Serrano, J., Tapia-Pastrana, G., & León-Sicairos, N. (2019). Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic *Escherichia coli* strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 304(May), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.017>
- Capinera, J. L. (2020). Introduction. *Handbook of Vegetable Pests*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814488-6.00001-7>
- Carstens, C., Salazar, J., & Darkoh, C. (2019). Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02667>
- CDC. (2016, October 11). *Agricultural Water*. <https://www.cdc.gov/healthywater/other/agricultural/index.html>
- CDC. (2021, October 6). Salmonella *Outbreak Linked to BrightFarms Packaged Salad Greens*. CDC. <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-07-21/details.html>
- CDC. (2022, February 3). *National Outbreak Reporting System (NORS) Dashboard*. <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>
- Chen, Y., Jinneman, K., & Hitchins, A. D. (2022, March). *BAM Chapter 10: Detection of Listeria monocytogenes in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods*. Bacteriological Analytical Manual (BAM). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
- CLSI. (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI supplement M100; 30th ed.)*.
- CONABIO. (2014). *Suelo*. INEGI. [https://www.inegi.org.mx/temas/suelo/#Informacion\\_general](https://www.inegi.org.mx/temas/suelo/#Informacion_general)

- CONAGUA. (2018). *Estadísticas del agua en México, edición 2018*.  
[http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM\\_2018.pdf](http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2018.pdf)
- CONAGUA. (2022). *Indicadores de la calidad del agua superficial y subterránea*.
- Danmaliki, N., Haroun, A., Vantsawa, P., & Alhaji, A. (2023). Antibiotic resistance pattern/ multiple drug resistance index of water-borne bacteria isolated from underground well water of some wards in Gusau metropolis Zamfara State. *International Journal of Science for Global Sustainability*, 9(1), 8.  
<https://doi.org/10.57233/ijsgs.v9i1.404>
- de Quadros Rodrigues, R., Loiko, M. R., Minéia Daniel de Paula, C., Hessel, C. T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Bender, R. J., & Tondo, E. C. (2014). Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control*, 42, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.043>
- DIA. (2010). *Buenas prácticas agrícolas (BPA) y de manufactura (BPM)*.  
[https://honduras.eregulations.org/media/SENASA-DIA\\_FV\\_BPA-BPM\\_Guia\\_Tecnica\\_Industria\\_Agosto2010\\_1.pdf](https://honduras.eregulations.org/media/SENASA-DIA_FV_BPA-BPM_Guia_Tecnica_Industria_Agosto2010_1.pdf)
- DOF. (2000). Requisitos y especificaciones para la aplicación y certificación de buenas prácticas agrícolas en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas. In *Secretaría de Gobernación (NOM-EM-034-FITO-2000; pp. 1–17)*.  
<http://legismex.mty.itesm.mx/normas/fito/fito034em.pdf>
- Doğan-Halkman, H. B., Çakir, I., Keven, F., Worobo, R. W., & Halkman, A. K. (2003). Relationship among fecal coliforms and *Escherichia coli* in various foods. *European Food Research and Technology*, 216(4), 331–334.  
<https://doi.org/10.1007/S00217-002-0647-2/TABLES/2>
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293.  
<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Erickson, M. C., Liao, J. Y., Webb, C. C., Habteselassie, M. Y., & Cannon, J. L.

- (2018). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* deposited on gloves in a liquid state and subjected to drying conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 266(August 2017), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.020>
- FAO. (2016). *A scheme and training manual on good agricultural practices (GAP) for fruits and vegetables* (Vol. 1). Regional Office for Asia and the Pacific.
- FAO. (2020a). Soil testing methods. In *Soil testing methods manual*. – Global Soil Doctors Programme - A farmer-to-farmer training programme. <https://doi.org/10.4060/ca2796en>
- FAO. (2020b). *Global Soil Partnership*. <https://www.fao.org/global-soil-partnership>
- FAO. (2022). *Tomato*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/tomato/en/>
- FAOSTAT. (2008). *Food and agriculture organization of the United Nations, Statistics Division*. FAO Statistical Databases. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fatica, M. K., & Schneider, K. R. (2011). *Salmonella* and produce: Survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence*, 2(6), 573–579. <https://doi.org/10.4161/VIRU.2.6.17880>
- FDA. (2016). Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption (Patent 2015–21819). In *Federal Register* (2015–21819). U.S. Food & Drug Administration. <https://www.federalregister.gov/documents/2015/11/27/2015-28159/standards-for-the-growing-harvesting-packing-and-holding-of-produce-for-human-consumption>
- FDA. (2018, November 18). *Environmental Assessment of Factors Potentially Contributing to the Contamination of Romaine Lettuce Implicated in a Multi-State Outbreak of E. coli O157:H7*. FDA. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/environmental-assessment-factors-potentially-contributing->

contamination-romaine-lettuce-implicated

- Florido, M., & Álvarez, M. (2015). Aspectos relacionados con el estrés de calor en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 36, 77–95. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362015000500008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000500008)
- Ford, P. A., Jaceldo-Siegl, K., Lee, J. W., Youngberg, W., & Tonstad, S. (2013). Intake of Mediterranean foods associated with positive affect and low negative affect. *Journal of Psychosomatic Research*, 74(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2012.11.002>
- Gaete, A., Mandakovic, D., & González, M. (2020). Isolation and identification of soil bacteria from extreme environments of Chile and their plant beneficial characteristics. *Microorganisms*, 8(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081213>
- Garner, D., & Kathariou, S. (2016). Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *Journal of Food Protection*, 79(2), 337–344. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-387>
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., & Van Impe, J. F. (2005). GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 95–105. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.11.038>
- Godínez-Oviedo, A., Cabrera-Díaz, E., Palacios-Marmolejo, A., Pérez-Covarrubias, O. B., Vargas-Daniel, R. C., Tamplin, M. L., Bowman, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2022a). Detection, quantification, and characterization of *Salmonella enterica* in mango, tomato, and raw chicken purchased in the central region of Mexico. *Journal of Food Science*, 87(1), 370–382. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16003>
- Godínez-Oviedo, A., Cabrera-Díaz, E., Palacios-Marmolejo, A., Pérez-Covarrubias, O. B., Vargas-Daniel, R. C., Tamplin, M. L., Bowman, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2022b). Detection, quantification, and characterization of

- Salmonella enterica* in mango, tomato, and raw chicken purchased in the central region of Mexico. *Journal of Food Science*, 87(1), 370–382. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16003>
- Godínez-Oviedo, A., Nava, Gerardo., Arvizu-Medrano, S., & Hernández-Iturriaga, M. (2017). An improve protocol for PCR using LM1 and LM2 primers for *Listeria monocytogenes* detection in food matrices. *Polish Journal of Microbiology*, 66(2), 255–257. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7869>
- Godínez-Oviedo, A., Tamplin, M. L., Bowman, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2020). *Salmonella enterica* in Mexico 2000–2017: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Prevalence in Food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 98–118. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2627>
- González-López, I., Medrano-Félix, J. A., Castro-Del Campo, N., López-Cuevas, O., González-Gómez, J. P., Valdez-Torres, J. B., Aguirre-Sánchez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Gómez-Gil, B., Lee, B. G., Quiñones, B., & Chaidez, C. (2022). Prevalence and genomic diversity of *Salmonella enterica* recovered from river water in a major agricultural region in northwestern Mexico. *Microorganisms*, 10(6), 1214. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10061214/S1>
- Gopinath, B., Flood, V. M., Burlutksy, G., Louie, J. C. Y., & Mitchell, P. (2016). Association between carbohydrate nutrition and prevalence of depressive symptoms in older adults. *British Journal of Nutrition*, 116(12), 2109–2114. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004311>
- Gorski, L., Liang, A. S., Walker, S., Carychao, D., Noriega, A. A., Mandrell, R. E., & Cooley, M. B. (2022). *Salmonella enterica* serovar diversity, distribution, and prevalence in public-access waters from a central california coastal leafy green-growing region from 2011 to 2016. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.01834-21>
- Gurtler, J. B., & Gibson, K. E. (2022). Irrigation water and contamination of fresh produce with bacterial foodborne pathogens. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100889. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100889>

- Hadjilouka, A., & Tsaltas, D. (2020). *Cyclospora cayetanensis* — Major outbreaks. *Foods*, 9, 1–17.
- Hammack, T., Wallace H., A., Wang, H., Jacobson, A., Ge, B., & Zhang, G. (2022, March). *BAM Chapter 5: Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual (BAM). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella#D9>
- Hassan, H., Iskandar, C. F., Hamzeh, R., Malek, N. J., El Khoury, A., & Abiad, M. G. (2022). Heat resistance of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., and *Escherichia coli* isolated from frequently consumed foods in the Lebanese market. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 2435–2444. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2143521>
- Havelaar, A. H., Vazquez, K. M., Topalcengiz, Z., Muñoz-Carpena, R., & Danyluk, M. D. (2017). Evaluating the U.S. food safety modernization act produce safety rule standard for microbial quality of agricultural water for growing produce. *Journal of Food Protection*, 80(11), 1832–1841. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-122>
- Hunt, J. (2010). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.11.001>
- Jacka, F. N., Pasco, J. A., Mykletun, A., Williams, L. J., Hodge, A. M., O'Reilly, S. L., Nicholson, G. C., Kotowicz, M. A., & Berk, M. (2010). Association of western and traditional diets with depression and anxiety in women. *American Journal of Psychiatry*, 167(3), 305–311. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09060881>
- Jinneman, K., Feng, P., & Weagant, S. D. (2020, July). *BAM Chapter 4A: Diarrheagenic Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual (BAM). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli>
- Kaplan, B. J., Crawford, S. G., Field, C. J., & Simpson, J. S. A. (2007). Vitamins, minerals, and mood. *Psychological Bulletin*, 133(5), 747–760.

<https://doi.org/10.1037/0033-2909.133.5.747>

- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Kisluk, G., & Yaron, S. (2012). Presence and persistence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the phyllosphere and rhizosphere of spray-irrigated parsley. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4030–4036. <https://doi.org/10.1128/AEM.00087-12>
- Krug, M., Valadez, A., Chapin, T., Schneider, K., & Danyluk, M. (2020). Outbreaks of foodborne illnesses associated with tomatoes. *Edis*, 2020(5). <https://doi.org/10.32473/edis-fs192-2020>
- Larousse. (2022). *La fresa mexicana herencia del Porfiriato*. Larousse Cocina. <https://laroussecocina.mx/nota/la-fresa-mexicana-herencia-del-porfiriato/>
- Leal-Cervantes, M. G., Arvizu-Medrano, S. M., Martínez-Peniche, R., Martínez-González, N. E., & Hernández-Iturriaga, M. (2018). Microbiological quality and incidence of *Salmonella* on cherry tomatoes at retail in Querétaro, México. *Journal of Food Protection*, 81(4), 614–618. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-377>
- Leonel, L. P., & Tonetti, A. L. (2021). Wastewater reuse for crop irrigation: Crop yield, soil and human health implications based on giardiasis epidemiology. *Science of the Total Environment*, 775, 145833. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145833>
- Li, Baker, C., Danyluk, M., Belanger, P., Boelaert, F., Cressey, P., Gheorghe, M., Polkinghorne, B., Toyofuku, H., & Havelaar, A. (2018). Identification of biological hazards in produce consumed in industrialized countries: A review. *Journal of Food Protection*, 81(7), 1171–1186. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-465>
- Li, N., Wu, X., Zhuang, W., Xia, L., Chen, Y., Wu, C., Rao, Z., Du, L., Zhao, R., Yi,

- M., Wan, Q., & Zhou, Y. (2021). Tomato and lycopene and multiple health outcomes: Umbrella review. *Food Chemistry*, 343, 128396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128396>
- Liu, W., Hu, B., Dehghan, M., Mente, A., Wang, C., Yan, R., Rangarajan, S., Tse, L. A., Yusuf, S., Liu, X., Wang, Y., Qiang, D., Hu, L., Han, A., Tang, X., Liu, L., Li, W., Liu, L., Li, W., ... Zhao, Q. (2021). Fruit, vegetable, and legume intake and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: A prospective study. *Clinical Nutrition*, 40(6), 4316–4323. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.01.016>
- Liu, Whitehouse, & Li. (2018). Presence and persistence of *Salmonella* in water: the impact on microbial quality of water and food safety. *Frontiers in Public Health*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00159>
- Loeza, J. (2018). Manual de producción de fresa en Coalcomán Michoacán. *Tecnologico Nacional de Mexico*, 1–53. <https://www.itscoalcoman.edu.mx/content/descargas/vinculacion/MANUAL PARA CULTIVO DE FRESA EN COALCOMAN.pdf>
- Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial contamination of fresh produce: what, where, and how? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1727–1750. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12487>
- Márquez-González, M., Osorio, L. F., Velásquez-Moreno, C. G., & García-Lira, A. G. (2022). Thermal inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in quesillo manufactured from raw milk. *International Journal of Food Science*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2507867>
- McDaniel, C., & Jadeja, R. (2019). A review of fresh produce outbreaks, current interventions, food safety concerns and potential benefits of novel antimicrobial sodium acid sulfate. *MOJ Food Processing & Technology*, 7(3), 59–67. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2019.07.00221>
- Mikolajczyk, R. T., el Ansari, W., & Maxwell, A. E. (2009). Food consumption frequency and perceived stress and depressive symptoms among students in



- three European countries. *Nutrition Journal*, 8(1), 31.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-31>
- Misiou, O., & Koutsoumanis, K. (2021). Climate change and its implications for food safety and spoilage. *Trends in Food Science and Technology*, 126(xxxx), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.031>
- Murphy, C. M., Strawn, L. K., Chapin, T. K., McEgan, R., Gopidi, S., Friedrich, L., Goodridge, L. D., Weller, D. L., Schneider, K. R., & Danyluk, M. D. (2022). Factors associated with *E. coli* levels in and *Salmonella* contamination of agricultural water differed between north and south Florida waterways. *Frontiers in Water*, 3, 750673. <https://doi.org/10.3389/FRWA.2021.750673/BIBTEX>
- Ornelas, P., Días, J. A., Guerrero, E., Tenorio, J. G., Saavedra, L. C., Ruiz, A. I., Ramírez, J., & Romero, F. (2020). Panorama Agroalimentario 2020. In *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020)
- Parikh, S. J., & James, B. R. (2012). *Soil: The Foundation of Agriculture*. Nature Education Knowledge. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/soil-the-foundation-of-agriculture-84224268/>
- Peruzy, M., Capuano, F., Proroga, Y., Cristiano, D., Carullo, M., & Murru, N. (2020). Antimicrobial susceptibility testing for *Salmonella* serovars isolated from food samples: five-year monitoring (2015–2019). *Antibiotics*, 9(7), 365. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070365>
- Possas, A., Posada-Izquierdo, G. D., Zurera, G., & Pérez-Rodríguez, F. (2021). Evaluating the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on cucumbers. *Food Microbiology*, 99(January). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103830>
- Requirements for harvest and post-harvest agricultural water in subpart E for covered produce other than sprouts, Pub. L. No. 21 CFR 112, U.S. Food & Drug Administration 1 (2023). <https://www.fda.gov/food/food-safety-modernization->

act-fsma/requirements-harvest-and-post-harvest-agricultural-water-subpart-e-covered-produce-other-sprouts

- Raison, C. L., & Miller, A. H. (2011). Is depression an inflammatory disorder? *Current Psychiatry Reports*, 13(6), 467–475. <https://doi.org/10.1007/s11920-011-0232-0>
- Rani, A., Ravindran, V. B., Surapaneni, A., Mantri, N., & Ball, A. S. (2021). Review: trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. *International Journal of Food Microbiology*, 349(February), 109233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109233>
- Rapa, M., Ciano, S., Gobbi, L., Ruggieri, R., & Vinci, G. (2021). Quality and safety evaluation of new tomato cultivars. *Italian Journal of Food Science*, 33(2), 35–45. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33i2.1921>
- Red de BPA. (2015). Buenas Prácticas Agrícolas: Lineamientos de Base. In *Buenas Prácticas Agrícolas* (Vol. 1, Issue LINEAMIENTOS). <https://www.casafe.org/pdf/2015/BUENAS-PRACTICAS-AGRICOLAS/BuenasPracticasAgrícolas-LineamientosdeBase.pdf>
- Saavedra, G., Corradini, F., Antúnez, A., Felmer, S., Estay, P., & Sepúlveda, P. (2017). Manual de producción de lechuga. In *Instituto de Desarrollo Agropecuario* (Issue 09).
- Samia, I., Usman, A. A., & Nauman, K. (2019). Strawberry (*Fragaria ananassa* duch): phytochemicals, nutraceuticals and health benefits. a brief review. *World of Journal Biology and Biotechnology*, 4(3), 25–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.33865/wjb.004.03.0236>
- Sánchez-Gómez, C. (2019). Exportación hortofrutícola de México hacia los Estados Unidos de América. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 29(54), 1–20. <https://doi.org/10.24836/es.v29i54.766>
- SEMARNAT. (2009). Acuerdo por el que se da a conocer el resultado de los estudios técnicos de aguas nacionales superficiales en las cuencas hidrológicas Río

- Moctezuma 1, Río Extóraz y Río Santa María 3 de la Región Hidrológica número 26 Pánuco. In *Diario Oficial de la Federación*. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/402/cuencas.html>
- Sepahvand, F., Rashidian, E., Jaydari, A., & Rahimi, H. (2022). Short communication: prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk of healthy sheep and goats. *Veterinary Medicine International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3206172>
- Shahbandeh, M. (2021, July 22). *Per capita consumption of fresh tomatoes in the United States from 2000 to 2020 (in pounds)\**. Statista. <https://www.statista.com/statistics/257302/per-capita-consumption-of-fresh-tomatoes-in-the-us/>
- Shahbandeh, M. (2022). *U.S. per capita consumption of fresh strawberries 2000-2020*. <https://www.statista.com/statistics/823192/us-per-capita-consumption-of-fresh-strawberries/>
- Sharma, M., Adler, B., Harrison, M., & Beuchat, L. (2005). Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 448–453. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01797.x>
- Sharmah-Levy, T., Rivera-Dommarco, J., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Gaona-Pineda, E. B., Gómez-Acosta, L. M., Mendoza-Alvarado, L. R., & Gómez-Humarán, I. M. (2021). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 sobre Covid-19 (Primera)*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shimizu, Y. (2022). *No Title*. WHO. [https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1)
- SIAP. (2018a). *Lactuca sativa L: tipos y variedades que se producen en México*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/siap/articulos/lactuca-sativa-l-tipos-y-variedades-que-se-producen-en-mexico?idiom=es>
- SIAP. (2018b, March 21). *En la agricultura, los sistemas de riego son utilizados para*

- un aprovechamiento óptimo del agua.* Gobierno de México. <https://www.gob.mx/siap/articulos/en-la-agricultura-los-sistemas-de-riego-son-utilizados-para-un-aprovechamiento-optimo-del-agua?idiom=es>
- SIAP. (2022). *Panorama Agroalimentario 2022.* <https://drive.google.com/file/d/1IHCUmmFJkX1QooFrRz8HYJxfN5wMgMNb/view>
- Siller-Cepeda, J., Báez Sañudo, M., Sañudo Barajas, A., & Báez Sañudo, R. (2002). *Manual de buenas prácticas agrícolas* (A. C. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Ed.; 1st ed.). SENASICA.
- SINA. (2020). *Usos del agua agrícola.* CONAGUA. <https://sinav30.conagua.gob.mx:8080/UsosAgua/#/agricola>
- Subedi, Y. (2022). *Understanding the occurrence of Salmonella in irrigation water used to grow fresh produce in the United States, Mexico, and Canada: a systematic review and meta-analysis.*
- Suhartono, S., Ismail, Y. S., & Aini, Z. (2021). Distribution of multidrug-resistant *Salmonella* spp. recovered from aquatic environment of Banda Aceh, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(2). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220243>
- Tan, S., Ke, Z., Chai, D., Miao, Y., Luo, K., & Li, W. (2021). Lycopene, polyphenols and antioxidant activities of three characteristic tomato cultivars subjected to two drying methods. *Food Chemistry*, 338. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128062>
- Tnau Agritech Portal. (2013). *Analytical techniques for soil testing.* Resource Management. [https://agritech.tnau.ac.in/agriculture/agri\\_soil\\_sampling.html](https://agritech.tnau.ac.in/agriculture/agri_soil_sampling.html)
- Toor, G. S., Yang, Y. Y., Das, S., Dorsey, S., & Felton, G. (2021). Soil health in agricultural ecosystems: Current status and future perspectives. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 168). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2021.02.004>
- Trichopoulou, Naska, Antoniou, Friel, Trygg, & Turrini. (2003). Vegetable and fruit:

- the evidence in their favour and the public health perspective. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73(2), 63–69. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.73.2.63>
- U.S. Environmental Protection Agency. (2016). *Quick guide to drinking water sample collection* (2nd ed., Issue April). [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-11/documents/drinking\\_water\\_sample\\_collection.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-11/documents/drinking_water_sample_collection.pdf)
- Ushiña Simbaña, C. F. (2020). *Evaluación del contenido de minerales en lechuga (Lactuca sativa var. crispa) crecidas en diferentes soluciones nutritivas de un cultivo hidropónico*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18503%0Ahttp://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Van Asselt, E. D., & Zwietering, M. H. (2006). A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.08.014>
- Vásquez, L. A. (2020). Buenas prácticas agrícolas (bpa). In Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) (Ed.), *Tecnología para el cultivo de la mora (Rubus glaucus Benth.)* (pp. 259–292).
- Verheyen, D., Baka, M., Akkermans, S., Skåra, T., & Van Impe, J. F. (2019). Effect of microstructure and initial cell conditions on thermal inactivation kinetics and sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in fish-based food model systems. *Food Microbiology*, 84, 103267. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103267>
- Waheed, K., Nawaz, H., Hanif, M. A., & Rehman, R. (2019). Tomato. *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery*, 631–644. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00046-X>
- Walker, J. T. (2018). The influence of climate change on waterborne disease and *Legionella*: a review. *Perspectives in Public Health*, 138(5), 282–286. <https://doi.org/10.1177/1757913918791198>
- Weller, D., Brassill, N., Rock, C., Ivanek, R., Mudrak, E., Roof, S., Ganda, E., &

Wiedmann, M. (2020). Complex interactions between weather, and microbial and physicochemical water quality impact the likelihood of detecting foodborne pathogens in agricultural water. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00134/FULL>

## VIII. ANEXOS

### VIII.I. Anexo 1. Formato de inspección en función a las BPA (BPA-22-01.00)

<b>Fecha de inspección:</b>		<b>Temperatura del agua:</b>	<b>pH del agua:</b>		
<b>Lugar de muestreo:</b>		<b>Temperatura del suelo:</b>	<b>pH del suelo:</b>		
<b>Humedad relativa:</b>		<b>Conductividad eléctrica del agua (EC):</b>	<b>Revisó:</b>		
<b>Temperatura ambiental:</b>		<b>Otro:</b>			
<b>Ref.</b>	<b>Puntos de control</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>N/A</b>	
<b>SISTEMA DE GESTIÓN DE BPA</b>					
1	¿Existe un programa de BPA, documentado?				
2	¿Existe un responsable para el monitoreo de las BPA? _____				
<b>RASTREABILIDAD Y RETIRO</b>					
3	¿Existe un sistema que permita rastreabilidad, retiro de producto?				
4	¿El producto cosechado se identifica y se permite su posterior rastreo?				
<b>MANEJO DE AGUAS</b>					

5	¿Cuál es la fuente de agua de riego? Reservoirio, estanque, arroyo, pozo, río. Especifique: _____			
6	¿Qué sistema de riego usa? Inundación, goteo, aspersión. Especifique: _____			
7	La fuente de agua cuenta con protección (sello sanitario, plataforma, brocal, galera)			
8	Si existe de riesgo de contaminación al agua (letrina, aguas negras, animales), ¿se han implementado medidas de mitigación?			
9	¿Se toman medidas para evitar el acceso de los animales a la fuente de agua?			
10	¿Se realizan análisis para determinar la calidad química y microbiológica del agua?			
<b>Ref.</b>	<b>Puntos de control</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>N/A</b>
11	¿El productor usa aguas residuales (que no hayan sido tratadas)?			
12	Los análisis de la calidad de agua, ¿son frecuentes? _____			
13	¿Existen acciones correctivas y documentadas en caso de que el agua esté contaminada?			
14	El agua aplicada a los productos cosechados es microbiológicamente segura			
15	¿Existen instalaciones de tratamiento de aguas negras cerca al sitio de producción?			
<b>SUELO</b>				
16	¿Se ha realizado un análisis de riesgo, demostrando que el suelo es adecuado para la producción (inocuo)?			
17	Cuando el uso previo del suelo indica contaminación, ¿se toman medidas para reducir los riesgos?			

18	¿Se muestrean microbiológicamente las áreas de cultivo, susceptibles a contaminación?			
19	Al momento de la inspección, ¿se observa la presencia de estiércol en el área de cultivo?			
20	¿Se monitorean las zonas de producción para detectar la presencia de animales silvestres o domésticos?			
<b>ABONOS ORGÁNICOS</b>				
21	Elija solamente UNA de las siguientes opciones que hace referencia a las operaciones de la finca:			
	A) Se usa estiércol crudo o una combinación de compostado			
	B) Se usan abonos orgánicos a base estiércoles tratados			
	C) No se usan abonos orgánicos a base de estiércoles			
<b>MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS</b>				
22	¿Se usan plaguicidas debidamente registrados en el país?			
23	¿Se usan plaguicidas prohibidos en el país de destino?			
24	¿La dosis aplicada se prepara según la etiqueta y/o recomendación técnica?			
25	¿Las bitácoras de aplicación de plaguicidas se tienen disponibles y actualizadas?			
<b>Ref.</b>	<b>Puntos de control</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>N/A</b>
26	¿Se respeta el plazo de seguridad (desde la aplicación hasta la cosecha)?			
<b>CULTIVO COSECHA Y TRANSPORTE</b>				
27	¿Los recipientes de la cosecha están limpios y bajo un programa de limpieza y desinfección? ¿Hay registros?			
28	¿Existe un POES sobre las medidas a tomar en caso de contaminación del producto?			
29	Si la cosecha es mecánica se toman medidas para inspeccionar y quitar objetos			



30	¿El equipo de transporte para mover el producto se encuentra limpio y bajo un programa de limpieza?			
31	¿Los materiales de empaque en el campo se encuentran almacenados y protegidos de toda fuente de contaminación?			
<b>LIMPIEZA Y HIGIENE EN EL CAMPO</b>				
32	¿Las instalaciones sanitarias están ubicadas en lugares en los que se minimiza el riesgo potencial de contaminación?			
33	¿Se tiene documentado un plan de respuesta en caso de derrame o fuga de las instalaciones sanitarias?			
34	¿Todos los urinarios, sanitarios se encuentran limpios y con papel, papel higiénico, jabón de manos antibacterial y agua potable para lavado de manos y se deposita el papel en los depósitos (con su tapadera)?			
35	¿Los trabajadores con diarrea y/o con síntomas de otras enfermedades infecciosas manipulan el producto?			
36	¿Se tiene disponible un botiquín surtido de primeros auxilios y accesible?			
37	¿Se proporciona entrenamiento en prácticas correctas de limpieza e higiene y está documentado?			
38	¿Los empleados se lavan las manos antes de comenzar a trabajar o al volver después de un receso?			
<b>AUTOINSPECCIÓN Y MONITOREO</b>				
39	¿Existe un procedimiento escrito que establezca el método, alcance y frecuencia de las autoinspecciones en campo?			
<b>Ref.</b>	<b>Puntos de control</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>N/A</b>
40	¿Se da seguimiento a las acciones correctivas solicitadas como resultado de las inspecciones?			

	Crítico
	Mayor
	Menor
	No aplica

Modificado de: (DIA, 2010)

VIII.II. Anexo 2. Etiquetado de muestras

 <b>FT-22.02.00</b>	Universidad Autónoma de Querétaro
	Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
	Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA)
<b>ETIQUETA DE IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA</b>	
Tipo de muestra:	
Fecha y hora:	
Lugar:	
Responsable:	VERDÍN GARCÍA MARISOL
Otro (comentarios):	