

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DETECCIÓN DE PATÓGENOS HUMANOS (*Salmonella spp*) EN DOS SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN DE TOMATE

Tesis

Que presenta ALICIA HERNÁNDEZ SANTIAGO
Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Julio 2016

DETECCIÓN DE PATÓGENOS HUMANOS (*Salmonella spp*) EN DOS SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN DE TOMATE

Tesis

Elaborada por ALICIA HERNÁNDEZ SANTIAGO como requisito parcial para obtener
el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



MC. Abiel Sánchez Arizpe
Asesor principal



MC. Alfredo Sánchez López
Asesor



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesora



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Posgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante mi formación.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por darme nuevamente la oportunidad de seguir formándome como profesionista, brindándome las bases necesarias para salir adelante y enfrentar al mundo en especial al Programa de Posgrado en Parasitología Agrícola, y a todos los profesores y personas que laboran en el mismo.

Al Productor del Rancho San Javier propiedad del señor Javier Aguilar Loaiza, Villa de Arista San Luis Potosí, por permitirnos llevar a cabo esta investigación en dicho lugar.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Coahuila por darme la oportunidad de realizar mi investigación en las instalaciones del Laboratorio de Medios y Microbiología Sanitaria y a todo el personal al contribuir con la asesoría de técnicas de protocolos, así como al contribuir con materiales y reactivos disponibles que hicieron que esta investigación se llevara a cabo. Mis más sinceros agradecimientos a los Químicos que me apoyaron en todo momento: Adriana, Alejandra y Ricardo del Laboratorio de Medios de Cultivo y Adriana, Francisco, Marcela y Cecilia del Laboratorio de Microbiología Sanitaria.

Al MC. Abiel Sánchez Arizpe como asesor principal, por su gran apoyo, su tiempo, por todas sus atenciones durante mi estancia en el posgrado y la disposición en la revisión de la tesis.

Al MC. Alfredo Sánchez López por su gran apoyo, tiempo, esfuerzo, dedicación y paciencia en la realización y culminación de esta tesis.

Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por todas sus atenciones, disposición y profesionalismo al ser participe desde el principio en todos los aspecto que conllevo la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Sr. Juvencio Hernández Gabriel por ser el pilar de la familia.
Sra. Reina Santiago Martínez por darme la dicha de vivir, por ser una mujer luchadora y que con su carácter me enseñó a salir adelante.

A mis hermanos:

Silvina, Josías, Emmanuel, en especial a Odias, Hageo y Tito, por estar acompañándome en todo momento, por sus valiosos consejos y por apoyarme en los aciertos y errores que he cometido, por creer y confiar en mí.

A mi esposo:

Gadiel Cruz Jarquín por impulsarme a seguir adelante y por su apoyo moral e incondicional.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	i
Dedicatorias.....	ii
Índice general	iii
Lista de cuadros.....	vi
Lista de figuras	vii
Resumen.....	viii
Abstract	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Enfermedades transmitidas por los alimentos	4
Salmonelosis	4
Taxonomía de la familia Enterobacteriaceae.....	5
Morfología y taxonomía del género <i>Salmonella</i>	5
Taxonomía	5
Los serotipos de <i>Salmonella</i>	6
Morfología	6
Crecimiento y sobrevivencia de <i>Salmonella spp</i>	7
Fuentes de contaminación	7
Humanos	7
Animal	8
Medio ambiente	8
Agua.....	8

Suelo	9
Alimentos de origen animal.....	9
Brote de salmonelosis por consumo de tomate fresco.....	12
Etapas potenciales de contaminación en tomate	13
Pre-cosecha	13
Riego.....	14
Cosecha.....	14
Post-cosecha.....	15
Producción de tomate en México.....	15
Principales productores de tomate rojo	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Ubicación del sitio de estudio.....	18
Recolección de muestras	18
Detección y aislamiento	19
Pre-enriquecimiento.....	19
Enriquecimiento selectivo.....	20
Aislamiento y diferenciación en medios selectivos.....	20
Morfología colonial típica de <i>Salmonella</i>	22
Cultivos control positivo	22
Pruebas bioquímicas diferenciales.....	23
Interpretación de pruebas bioquímicas	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Bacterias encontradas en plántula de tomate	28
Bacterias presentes en diferentes partes de planta de tomate provenientes de invernadero semihidropónico hasta empaque para su distribución, Rancho San Javier.	29

Bacterias presentes en diferentes partes de plantas de tomate provenientes en malla sombra hasta empaque.....	31
Bacterias presentes en muestras de agua de extracción, agua almacenada y agua de fertirriego, Rancho el Trébol 2015.	32
Bacterias presentes en suelo y sustrato de fibra de coco en invernadero semihidropónico.	34
Bacterias presentes en muestras de suelo provenientes de malla sombra <i>in situ</i>	35
Material vegetativo proveniente de invernadero semihidropónico, Rancho el Trébol 2015.....	36
Material vegetativo proveniente de malla sombra <i>in situ</i> , Rancho el Trébol 2015.	37
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de <i>Salmonella</i> , subespecies, serotipos y su hábitat usual de acuerdo al Sistema de Kauffmann-White.	6
Cuadro 2. Reacciones enzimática de las bacterias presentes en las muestras experimentales.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales productores de tomate rojo. Fuente: Observatorio de Precios con datos del SIAP. Consultado en abril 2015.	17
Figura 2. Ubicación del sitio de estudio.....	18
Figura 3. Bacterias presentes en plántulas de tomate antes de trasplantarse.	29
Figura 4.-Bacterias presentes en diferentes partes de planta de tomate provenientes de invernadero semihidropónico hasta empaque para su distribución, Rancho San Javier..	31
Figura 5.-Bacterias presentes en diferentes partes de plantas de tomate provenientes en malla sombra hasta empaque.	32
Figura 6. Bacterias presentes en las muestras de agua.....	33
Figura 7. Muestreo de suelo y sustrato en invernadero semihidropónico.....	34
Figura 8. Bacterias presentes en muestras de suelo en malla sombra.	35
Figura 9. Bacterias presentes en material vegetativo en invernadero semihidropónico ..	37
Figura 10. Bacterias presentes en material vegetal de malla sombra.....	38

RESUMEN

DETECCIÓN DE PATÓGENOS HUMANOS (*Salmonella spp*) EN DOS SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN DE TOMATE

POR

ALICIA HERNÁNDEZ SANTIAGO

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE–ASESOR–

SALTILLO, COAHUILA

JULIO 2016

Las frutas y hortalizas frescas son más reconocidas como vehículos de bacterias patógenas humanas que pueden colonizar antes, durante y después de la cosecha. Con el fin de determinar la presencia de *Salmonella enterica* y microorganismos indicadores de contaminación fecal en la producción de tomate en invernadero semihidropónico y malla sombra, en Villa de Arista, San Luis Potosí, México, se analizaron muestras de agua, suelo, sustrato de fibra de coco y partes de la planta. En las muestras analizadas hubo ausencia de *S. enterica*, sin embargo se logró aislar microorganismos indicadores. En el material vegetativo proveniente de invernadero semihidropónico se encontró la presencia de *Citrobacter freundii* (60.71%), *Escherichia coli* (20.19%) y *Serratia marcesens* (0.79%), mientras que en malla sombra la presencia de estas bacterias en las muestras fue menor con 57.14%, 17.32%, excepto *S. marcesens* con 0.86% respectivamente, además de *Enterobacter spp.* (1.73%). La presencia de *E. coli* en las plantas de tomate se le atribuye al personal en el manejo cultural y agronómico del cultivo.

Palabras claves: *Salmonella enterica*, agricultura protegida, inocuidad, fecales, patógenos humanos, tomate.

ABSTRACT

DETECTION OF HUMAN PATHOGENS (*Salmonella spp*) IN TWO PRODUCTION
SYSTEMS TOMATO

BY

ALICIA HERNÁNDEZ SANTIAGO

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE -ADVISER-

SALTILLO, COAHUILA

JULY 2016

The fresh fruits and vegetables are recognized as vehicles of human pathogenic bacteria, they can colonize before, during and after harvest. With the purpose to determine the presence of *Salmonella enterica* and indicator organisms of fecal contamination in tomato production in semi hydroponic greenhouses and shade cloth, in Villa de Arista, San Luis Potosi, Mexico, samples of water, soil, coir substrate and plant parts were analyzed. In the samples analyzed did not found *S. enterica*; however it was isolated indicator microorganisms. In the vegetative material from semi hydroponic greenhouse the presence of *Citrobacter freundii* (60.71%), *Escherichia coli* (20.19%) and *Serratia marcesens* (0.79%) was found, while in mesh shade the presence of these bacteria in samples was lower with 57.14%, 17.32%, *Serratia marcesens* except with 0.86% respectively, and *Enterobacter spp.* (1.73%). The presence of *Escherichia coli* in tomato plants is attributed to personnel in the cultural and agronomic crop management.

Keywords: *Salmonella enterica*, protected agriculture, food safety, fecal, human pathogen, tomato.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) es una preocupación de salud pública y se producen por la ingestión de alimentos o bebidas contaminados con microorganismos patógenos como virus, parásitos o bacterias (González y Rojas, 2005). Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* Siendo *S. spp* el agente causal más importante y gravoso que ocupa el primer lugar en ETA's (González y Rojas, 2005 y Batz *et al.*, 2011). El vínculo entre estos patógenos y los alimentos de origen animal es bien conocido y ha recibido considerable atención regulatoria. Aunque el número de casos de enfermedades relacionadas con el consumo de carnes ha disminuido en los últimos años y la tasa general de brote de salmonelosis se ha mantenido estable debido al aumento del riesgo a partir de fuentes no tradicionales del patógeno (DeWaal *et al.*, 2009; Lynch, *et al.*, 2009; Mandrell, 2009; Biniam y Mogessie, 2010 y Batz *et al.*, 2011).

En la actualidad se está aumentando la incidencia de brotes de gastroenteritis relacionados por el consumo de alimentos inocuos de origen vegetal y ha encendido el interés científico en la comprensión de los patógenos entéricos humanos en las plantas. Dichos estudios se han realizado en alfalfa, lechuga, perejil, zanahoria, rábano, brócoli, espinaca, tomate etc. (Gu *et al.*, 2011), donde demuestran que diversos serotipos de *Salmonella entérica* son capaces de persistir, colonizar, multiplicarse en los tejidos y superficies de las plantas a través de múltiples vías, incluyendo la humectación de las semillas, raíces, hojas, flores, frutos y en suelos enriquecidos con materia orgánica como estiércol contaminado, lombricomposta y otros sustratos orgánicos por largos periodos de tiempo, principalmente en tomate; sin inducir ningún síntoma a excepción de una ligera reducción en el crecimiento de las plantas (Palacios *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001; Brandl *et al.*, 2002; Cooley *et al.*, 2003; Mandrell, 2009 y Marvasi, *et al.*, 2013).

Los tomates pueden ser contaminados en los campos de producción a partir de agua de riego, prácticas de manejo en la planta, bioabono, suelos contaminados y en la etapa de procesamiento durante la cosecha, transporte, limpieza, lavado y distribución (Cummings *et al.*, 2001; CDC, 2005; Gupta *et al.*, 2007; Caffer *et al.*, 2008; Greene *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008 y Teplitzki *et al.*, 2011). Este estudio se llevó a cabo

debido a la escasa información acerca de la presencia de microorganismos patógenos así como indicadores de contaminación fecal en agua, suelo y durante el ciclo de cultivo en la producción de tomate, así como también en la etapa de procesamiento durante la cosecha, transporte, limpieza, lavado y distribución del tomate, en el Rancho el Trébol, Villa de Arista, San Luis Potosí; por otro lado se desconoce la diversidad de serotipos de *Salmonella enterica* y microorganismos indicadores de contaminación fecal que pueden estar presentes en esta región. Además la detección de la presencia de esta bacteria, independientemente de la cantidad encontrada, hace que los productos en los que se detecta se consideren contaminados e inutilizables, por consiguiente es motivo de rechazo, por el alto riesgo que supone para la salud pública.

El objetivo de este estudio ha sido determinar la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella enterica* así como microorganismos indicadores de contaminación fecal en agua de riego, en diferentes etapas fenológicas de la planta y empaque en la producción tomate en dos sistemas de producción (Invernadero semihidropónico y malla sombra) bajo agricultura protegida en Villa de Arista, San Luis Potosí y determinar las fuentes de inóculo de *Salmonella enterica* en las diferentes etapas fenológicas bajo las dos modalidades.

OBJETIVOS

- Determinar la presencia de *Salmonella enterica* en diferentes etapas fenológicas de la planta de tomate y empaque, así como en suelo y agua de riego en invernadero semihidropónico y malla sombra en el Rancho el Trébol, Villa de Arista, San Luis Potosí.
- Determinar la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal en diferentes etapas fenológicas de la planta de tomate y empaque, así como en agua de riego y suelo, en invernadero semihidropónico y malla sombra en el Rancho el Trébol, San Luis Potosí.

HIPÓTESIS

En la cadena de productiva del tomate en la región del Valle de Villa de Arista, San Luis Potosí existirá la presencia de microorganismos enteropatógenos específicamente *Salmonella enterica* y/o microorganismos indicadores de contaminación fecal.

REVISIÓN DE LITERATURA

Enfermedades transmitidas por los alimentos

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) son originadas por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas en su obtención o elaboración con microorganismos patógenos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor en forma individual o colectiva. La mayoría son ocasionadas por distintas bacterias, virus o parásitos (Rosas y Acosta, 2001 y González y Rojas, 2005) y constituyen un importante problema para la salud pública (CDC, 2011).

Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA's se encuentran especies de los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Toxoplasmas*, *Norovirus* y *Escherichia coli* O157:H7, siendo *Salmonella* el agente causal más importante y gravoso. (Rosas y Acosta, 2001 y Batz *et al.*, 2011).

Salmonella provoca más casos de enfermedades que cualquier otro patógeno transmitido por los alimentos, y de acuerdo con los datos de vigilancia FoodNet, es uno de los pocos patógeno que no ha disminuido significativamente en los últimos 10 años (Batz *et al.*, 2011).

El vínculo entre estos patógenos y los alimentos de origen animal es bien conocido y han recibido considerable atención regulatoria. Aunque el número de casos de enfermedades relacionadas con el consumo de carnes ha disminuido en los últimos años y la tasa general de brote de salmonelosis se ha mantenido estable debido al aumento del riesgo a partir de fuentes no tradicionales del patógeno (DeWaal *et al.*, 2009, Lynch, *et al.*, 2009, Mandrell, 2009, Biniam y Mogessie, 2010, Batz *et al.*, 2011).

Salmonelosis

Esta enfermedad es causada por varias especies de *Salmonella* y es un importante patógeno alimentario en todo el mundo. Produce en el hombre y los animales dos tipos de síntomas tales como gastroenteritis y fiebres intestinales como es el caso de la tifoidea, es resistente a la congelación y a la deshidratación, pero no sobreviven en medios muy ácidos y por fortuna, son como casi todas las bacterias, poco resistentes al calor. Los síntomas aparecen generalmente entre 6 a 72 horas luego de comer el alimento contaminado, y se manifiestan con cólicos, diarrea, escalofríos, fiebre, nauseas,

vómitos y malestar general, los cuales pueden durar entre uno a siete días (Pokharel *et al.*, 2006 y Jurado *et al.*, 2010).

A pesar de los esfuerzos de control se ha reportado que en el mundo anualmente se presentan más de 1,3 billones de salmonelosis y tres millones de muertes (Helms *et al.*, 2003). En 2011 en Estados Unidos *Salmonella spp* ocupó el primer lugar con 1, 027,561 enfermos, 19,336 hospitalizaciones y 378 muertes (Scallan *et al.*, 2011) y en 2015 sigue causando un estimado de 1.2 millones de infecciones al año, mientras que en México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella* (Zaidi *et al.*, 2006 y Boore *et al.*, 2015).

Taxonomía de la familia Enterobacteriaceae

La familia cuenta con 153 géneros y más de 170 especies nombradas e incluyen *Arsenophonus*, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Calymmatobacterium*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cosenzaea*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Gibbsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Levinea*, *Lonsdale*, *Enterobacter*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phaseolibacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Saccharomyces*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Shimwellia*, *Sodalis*, *ptyseos*, *Thorsellia*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* y *Yokenella*. De estos, 26 géneros son conocidos por estar asociados con infecciones en seres humanos, entre ellos se encuentra el género *Salmonella* (SMI, 2015).

Morfología y taxonomía del género *Salmonella*

Taxonomía

El género pertenece a la tribu Salmonelleae, está constituido por 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* en un sistema de clasificación taxonómica que subdivide a *Salmonella enterica* en 6 subespecies: enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI), (Brenner *et al.*, 2000; Uribe y Suárez, 2006; Grimont y Weill, 2007, Caffer *et al.*, 2008, CDC, 2011 y González *et al.*, 2014).

Actualmente, el sistema de clasificación es el utilizado por la Organización mundial de la Salud (OMS), el Centro para el control de Enfermedades (CDC) y otras organizaciones (González *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Especies de *Salmonella*, subespecies, serotipos y su hábitat usual de acuerdo al Sistema de Kauffmann-White.

Especie y subp. de <i>Salmonella</i>	No. de serotipos dentro de la especie	Hábitat usual
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
TOTAL	2579	

Fuente: Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* and Institut Pasteur. 9 th edition.2007

Los serotipos de *Salmonella*

La serotipificación es un método de subtipos se usa para diferenciar cepas de *Salmonella* más allá del nivel de subespecie. Este género cuenta con más de 2.500 serovariedades identificados en el sistema de Kauffamann-White y todos los serotipos se consideran potencialmente patógenos; están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos (O), flagelares (H) y de virulencia (Vi), *Salmonella entérica* es el patógeno más frecuentemente encontrado asociado a las enfermedades por los alimentos y los serotipos más aislados a nivel mundial son: *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, Enteritidis, Newport y Javiana (Grimont y Weill, 2007, Caffer *et al.*, 2008; CDC, 2011 y Hyeon *et al.*, 2013 y SIM's, 2015).

Morfología

Son bacilos Gram-negativos, las células son en forma de bacilos, no esporulados (no formadores de esporas), y predominantemente móviles por medio de flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*), con diámetros de alrededor de 0.7-1.5µm y longitudes de 2-5µm con algunas excepciones. Las colonias son generalmente no fermentadores de lactosa. Obtienen su energía a partir de reacciones de oxidación y reducción utilizando fuentes orgánicas y son anaerobios facultativos. Producen ácido a partir de glucosa por lo general con la producción de gas, y son oxidasa negativo y prácticamente todas lactosa negativa (Grimont y Weill, 2007; Caffer *et al.*, 2008 y Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010 y González *et al.*, 2014).

Crecimiento y sobrevivencia de *Salmonella* spp

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C, algunas pueden llegar a crecer a 2°C o 4°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9 con un óptimo entre 6.5 y 7.5. Se desarrollan bien a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94, pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con un aw de <0.2. Su crecimiento se inhibe completamente a temperaturas inferiores a 7°C, pH <3.8 y un aw <0.94 (Odumeru & León-Velarde, 2012; González *et al.*, 2014).

Fuentes de contaminación

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se pueden encontrar como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (Caffer *et al.*, 2008). Los miembros del género se pueden clasificar en tres grupos:

- a) Los que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.
- b) Los que infectan sólo al hombre: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A y *Salmonella* Paratyphi C
- c) Los que están adaptados a un huésped animal: *S. abortusovis*, a los ovinos; *S. abortusequi*, a los equinos y *S. gallinarum*, a las aves.

Humanos

El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto gastrointestinal del hombre (Caffer *et al.*, 2008). Las heces de personas infectadas pueden contener un gran número de estas bacterias y puede excretarlo hasta por 3 meses. De acuerdo al serovar implicado, el 1% de los adultos infectados y el 5% de los niños menores de 5 años pueden excretar el microorganismo por más de un año (Chin, 2001 y Jay *et al.*, 2005). La excreción de *Salmonella* Typhimurium en pacientes después de haber sufrido salmonelosis puede durar hasta 110 días y la transmisión puede ocurrir de persona a persona (Murase *et al.*, 2000).

Animal

El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto gastrointestinal de diversos animales tales como mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos (Brunia, 2008 y Caffer *et al.*, 2008) puede infectar a los humanos por consumo de alimentos contaminados o contacto directo (Jay *et al.*, 2005). El pollo y el cerdo son reconocidos como los principales reservorios de *Salmonella*, aunque su hábitat primario es el intestino en pollos, esporádicamente puede encontrarse en otras partes, pulmón, tráquea, saco aéreo e incluso articulaciones (Brunia, 2008 y Botero, 2009). Muchas infecciones en animales pasan asintomáticas. Los animales pueden infectarse al recibir concentrados contaminados con *Salmonella* (Lake *et al.*, 2001).

Medio ambiente

La *Salmonella* proveniente de las heces de animales puede permanecer en pastos y aguas, contaminando de esta manera otros animales, los insectos puede ser un vehículo de contaminación al posarse sobre las heces contaminadas y llevarlas a múltiples lugares. Este ciclo favorece la diseminación de *Salmonella*, llegando de esta manera al hombre (Lake *et al.*, 2002; Jay *et al.*, 2005 y Marín *et al.*, 2009).

Agua

Salmonella es uno de los géneros bacterianos que con mayor frecuencia se encuentran asociados a brotes de enfermedades de origen hídrico (Fernández-Crehuet y Espigares, 1995), particularmente el agua de riego que contiene abono, heces de animales silvestres o efluentes de aguas residuales (Islam *et al.*, 2004). La irrigación con agua de baja calidad es una forma en la que los cultivos se pueden contaminar con patógenos. Las aguas subterráneas, aguas superficiales y las aguas residuales son comúnmente utilizadas para irrigación. El riesgo de transmisión de enfermedades de microorganismos patógenos presentes en el agua de riego está influenciado por el nivel de contaminación, la persistencia de patógenos en agua, suelo y en los cultivos, y la ruta de exposición.

El agua subterránea generalmente es de buena calidad microbiológica, a menos que esta se contamine por ejemplo con escurrimientos superficiales contaminados (Steele & Odumeru, 2004).

Además de la contaminación de las superficies de frutas y hortalizas que pueden ocurrir por salpicaduras de lluvia, aerosol o contaminación del suelo (Klerks, 2007).

Suelo

La contaminación del suelo puede deberse a heces de animales domésticos o silvestres que están asociados a dichas áreas. Se ha visto que animales como aves, roedores, reptiles y anfibios, pueden también actuar como reservorios de *Salmonella* y contaminar cultivos por medio de las heces o contacto directo (Fática *et al.*, 2011).

Alimentos de origen animal

Es una enfermedad fundamentalmente de origen alimentario, la fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados, incluido el agua. La carne de pollo y otros tipos de carne (res, pavo) provenientes de animales infectados son un importante vehículo de salmonelosis (Brunia, 2008 y Patrick *et al.*, 2010), otros alimentos de origen animal como los huevos también son vehículo de transmisión (Burr *et al.*, 2005). El vínculo entre estos patógenos y los alimentos de origen animal es bien conocido y ha recibido considerable atención regulatoria. Aunque el número de casos de enfermedades relacionadas con el consumo de carnes ha disminuido en los últimos años, la tasa general de brote de salmonelosis se ha mantenido estable debido al aumento del riesgo a partir de fuentes no tradicionales del patógeno (DeWaal *et al.*, 2009; Lynch, *et al.*, 2009; Mandrell, 2009; Biniam y Mogessie, 2010 y Batz *et al.*, 2011).

Alimentos de origen vegetal

En la actualidad se está incrementando el número de enfermedades vinculados a los productos frescos, especias y frutos secos, principalmente a las frutas y verduras que se consumen crudos poniendo de relieve la importancia de las plantas como fuentes potenciales del patógeno y ha encendido el interés científico en la comprensión de los patógenos entéricos humanos en las plantas (DeWaal *et al.*, 2009; Lynch, *et al.*, 2009; Mandrell, 2009; Biniam y Mogessie, 2010; Batz *et al.*, 2011, Brandl y Teplitski, 2013). Numerosos serotipos de *Salmonella entérica* son capaces de persistir, colonizar y multiplicarse en los tejidos y superficies de las plantas a través de múltiples vías, incluyendo la humectación de las hojas, raíces, semillas o flores y en suelos enriquecidos con estiércol por largos periodos de tiempo (Palacios *et al.*, en 1999; Guo *et al.*, 2001; Brandl *et al.*, 2002; Cooley *et al.*, 2003; Mandrell, 2009 y Marvasi, *et al.*, 2013).

Se han realizado diferentes investigaciones que sustentan dicha hipótesis, tal es el caso de Wei *et al.*, (1995) donde determinaron la capacidad de *S. Montevideo* para crecer y sobrevivir en superficies de tomate, incluyendo la piel intacta, áreas heridas, grietas de crecimiento y cicatrices.

Diferentes cepas de *Salmonella entérica* fueron capaces de colonizar la parte interna de plántulas de alfalfa en altos números con un inóculo de 10^2 UFC, aunque las características de infección fueron diferentes para cada cepa. Para la mayoría de las cepas, se observó una fuerte correlación entre la colonización endófitos y la colonización de la rizosfera (Dong *et al.*, 2003).

Salmonella entérica serovar Typhimurium fue capaz de persistir en suelos enriquecidos con estiércol en un máximo de 231 días y el patógeno se detectó en las partes aéreas de la lechuga, perejil, zanahorias y rábanos cultivados en estos suelos enmendados durante 2 a 3 meses. Además de su transferencia a partir de estiércol y agua de riego a las plantas (Islam *et al.*, 2004). Por otro lado Brandl *et al.*, (2005) trabajó con imágenes digitales donde reveló que el 54% de las células de *S. entérica* serovar Thompson estaban presentes en las hojas de cilantro.

En otro estudio donde trabajaron con diferentes cultivos como rábano, brócoli, lechuga, zanahoria, nabo, tomate, radicchio, espinaca, cilantro, perejil y endibia, reportaron que en lechuga y tomate el suelo puede no ser la ruta de contaminación de *Salmonella* antes de la cosecha, en comparación directa con las de otros cultivos agrícolas (Barak *et al.*, 2008) sin embargo, Rodríguez *et al.* en el mismo año determinaron que *Salmonella entérica* serovariedad Typhimurium ATCC 13176 se transmite a la lechuga, a partir del bioabono contaminado (OR=2,53) sin importar la concentración inicial del microorganismo en el bioabono y Kroupitski *et al.* (2013) reportaron que *Salmonella entérica* está implicado a la adhesión al tejido de planta de lechuga después de la cosecha.

S. entérica (incluyendo sv. Typhimurium 14028) fueron encontrados colonizando los tejidos internos de lechuga, alfalfa, cilantro y principalmente tomate, donde alcanzaron los niveles de población tan altas como 10^5 - 10^7 UFC / g de tejido de la planta bajo condiciones de campo y condiciones de laboratorio (Dong *et al.*, 2003 y Noel *et al.*, 2010).

En tomate se han realizado distintas investigaciones inoculando artificialmente cepas de diversos serotipos de *Salmonella* ya sea en el suelo, en agua de riego y partes de la planta ya que en el brote más reciente de salmonelosis de los 300 casos de esta enfermedad en 23 estados aproximadamente el 30% son consumidores frecuentes de tomate fresco (Teplitski *et al.*, 2011).

En tomate redondo inocularon a *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Javiana*, *S. Braenderup* para desarrollar un modelo matemático para predecir la tasa de crecimiento de *Salmonella* (10^2 UFC / g a 10^8 UFC / g) en tomates cortados como una función de la temperatura de incubación (Pan y Schaffner, 2010).

En la variedad Roma inocularon cepas de *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Newport* ATCC 6962 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 en tomate sin lavado o engrasado y se investigó los efectos de desinfección de una solución de ClO_2 en *S. entérica* en el agua, en las superficies de tomate y entre las cargas de tomate y estudiaron la capacidad de ClO_2 a 5 ppm durante el lavado y pulverización de los tomate para prevenir la transferencia de *Salmonella* en las superficies del fruto de tomate (Pao *et al.*, 2007 y 2009).

Con las misma variedad inocularon cepas de *S. Montevideo*, *S. Javiana* y *S. Baildon* para obtener las condiciones óptimas de tratamiento de desinfección a través de ClO_2 (Trinetta *et al.*, 2010).

Se evaluó la influencia del tiempo de almacenamiento refrigerado sobre la eficacia de la irradiación para eliminar *Salmonella* en tomates Roma en rodajas utilizando cepas de *S. Anatum* F4317, *S. Stanley* H0558, *S. Enteritidis* PT30 (Niemira, 2011).

Se estudió la fijación y la infiltración de *Salmonella* en tomates colocados en la superficie de suelo saturado de agua inoculadas con el patógeno utilizando cepas de *S. Montevideo* (Guo *et al.*, 2002).

En otro trabajo estudiaron la inoculación del fruto de tomate tanto en la superficie como parte interna del tomate utilizando *S. Javiana* 5913 (heces de pollo), *S. Javiana* 6027 (heces bovinas), *S. Montevideo* (Tomate), *S. Newport* (Brotos de alfalfa), *S. Enteritidis* (Egg), *S. Hadar* (gallinero), *S. Typhimurium* (línea masacre de cerdo), *S. Dublín* (leche cruda), *S. Senftenberg* (Brotos de alfalfa) y *S. Infantis* (aislado clínico) (Universidad de Guelph Culture Collection); Shi *et al.*, 2007).

Determinaron el destino de *S. Montevideo* (Tomate), *S. de Michigan* (Melón), *S. Poona* (Melón), *S. Hartford* (zumo de naranja) y *S. Enteritidis* (Egg) inoculadas en tallos y flores en plantas de tomate. El 37% de los tomates recolectados de plantas inoculadas fueron positivos por todos los serotipos de *Salmonella* excepto *S. Hartford* (Guo *et al.*, 2001).

Investigaron la posibilidad de asociación de *Salmonella* con hipocotilos, cotiledones, tallos y hojas de las plantas jóvenes que crecen en una solución nutritiva hidropónica inoculado con los patógeno como *S. Montevideo* (Tomate), *S. de Michigan* (Melón), *S. Poona* (Melón), *S. Hartford* (zumo de naranja) y *S. Enteritidis* (huevos), (Guo *et al.*, 2002).

Por primera vez, se presenta evidencia convincente de que *S. entérica* puede moverse dentro de las plantas de tomate cultivadas en el suelo de campo natural y colonizar los frutos en niveles altos sin inducir ningún síntoma, a excepción de una ligera reducción en el crecimiento de las plantas (Gu *et al.*, 2011). En el mismo año Barak *et al.*, descubrieron que las plantas regadas con agua contaminada tenían mayor población *S. entérica* que las plantas cultivadas a partir de semillas plantadas en suelo infestado. Sin embargo, ambas vías de contaminación dieron resultado detectable de poblaciones de *S. entérica* en la filosfera por que representan un riesgo de contaminación de la fruta (Barak *et al.*, 2011).

Los tomates pueden ser contaminados en los campos de producción a partir de agua de riego, manipuladores, bioabono y suelos tratados incorrectamente y ocasionalmente las deposiciones de pájaros, animales o insectos. También pueden depositar patógenos en las superficies de las plantas, además se puede producir la contaminación en la etapa de procesamiento durante la cosecha, limpieza, lavado y distribución (Cummings *et al.*, 2001; CDC, 2005; Gupta *et al.*, 2007; Caffer *et al.*, 2008; Greene *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008 y Teplitski *et al.*, 2011).

Brote de salmonelosis por consumo de tomate fresco

Varios brotes de salmonelosis han sido causados por el consumo de tomates crudos contaminados, tres grandes brotes se produjeron por el consumo de tomates crudos contaminados con *Salmonella* Javiana en 1992, *Salmonella* Montevideo en 1993, y *Salmonella* Baildon en 1999 en diferentes estados (CFSAN-FDA. 2001); Muchos de los

brotos de *Salmonella* se rastrearon hasta la empacadora, pero en muchos de los casos no se determinó el campo donde se cosecharon. En junio de 2002, *Salmonella* Javiana fue la causa de un brote en Transplant Games en Orlando, Florida, Estados Unidos, el origen del brote era tomate crudo en cubitos (Toth *et al.* 2002). Cabe mencionar que en 2004 ocurrieron tres brotes separados de salmonelosis asociado con consumo de tomates Roma crudos en Estados Unidos y Canadá, la fuente exacta no quedo esclarecida, pero una sola empacadora en Florida y muchos procesadores en los estados de Georgia y Carolina del sur fueron sospechosos (CDC, 2005 y Roebuck, 2004). En mayo de 2005, un muestreo rutinario programado por la FDA descubrió *Salmonella* en tomates Pera de California y emitió un aviso, ningún caso fue reportado (E.U.A.FDA, 2005). El 10 de julio, 2008, un brote de *Salmonella* Saintpaul con causa no determinada, infecto a 1090 personas en 42 estados, el Distrito de Columbia y Canadá, es otro indicador de la falta de un sistema eficiente de rastreabilidad y bioseguridad en la cadena de frutos frescos. En particular, el consumo de tomates frescos se ha relacionado con numerosos brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos que implican varios serotipos de *Salmonella enterica* (Jie *et al.*, 2013).

Etapas potenciales de contaminación en tomate

Pre-cosecha

La contaminación de los productos podría ocurrir durante la producción en campo antes de la cosecha. Esta etapa es considerada como la primera etapa de la cadena desde el campo a la mesa, e incluye la siembra, crecimiento de la planta, riego, así como otras actividades y tratamientos asociados con la planta madura (León *et al.*, 2009).

De acuerdo a Doyle y Erickson (2008), existen dos factores importantes que pueden incrementar la contaminación de microorganismos patógenos en los vegetales:

- 1.- Proximidad de la parte comestible de la planta al suelo. Los tubérculos como las zanahorias, cebollas, papas, etc. o cultivos que crecen cerca al suelo como lechuga, tomate, cilantro, etc. tienen más probabilidad de contaminarse.
- 2.- Concentración de patógenos en suelo contaminado en el cual crece el vegetal. Altas poblaciones de microorganismos patógenos en el suelo incrementan la probabilidad que el vegetal esté contaminado al momento de la cosecha. Así mismo altas concentraciones

de contaminación en agua de irrigación se convertirán en altas cargas de contaminación en el suelo y en altas probabilidades de contaminación en la planta.

En la etapa de pre-cosecha, se han examinado varias rutas potenciales para la colonización y la internalización de *S. enterica* para la contaminación de los frutos de tomate (Guo *et al.*, 2002 y Barak *et al.*, 2008).

Riego

Donde quiera que el agua entre en contacto con productos frescos, la calidad de ésta determina el potencial de contaminación con patógenos. La fuente del agua de riego, cómo es distribuida y el tipo de riego que es usado, son factores importantes que influyen en la contaminación de frutas y vegetales frescos (USFDA-CFSAN, 1998).

Cosecha

La etapa de cosecha en los campos de cultivo marca el inicio de una cadena de operaciones que alteran el estado fisiológico de los vegetales. Principalmente está el daño mecánico que se produce al cortar el vegetal, esta operación crea superficies susceptibles a contaminarse con bacterias patógenas si no se manejan adecuadamente (Doyle y Erickson, 2008).

Las fuentes de contaminación en esta fase son variadas, debido a que puede influir la contaminación que ocurrió durante la pre-cosecha. Además, el tipo de contaminación que pueda ocurrir durante y después de la cosecha son afectados si los vegetales son empacados en el campo (listos para su distribución inmediata) o si el producto es sujeto a un lavado y seguido del empacado en la planta de procesamiento (área de empacado) (León *et al.*, 2009).

La significancia de la contaminación de productos vegetales durante el crecimiento y la cosecha no está bien establecida debido a que una vez que el brote ocurre, es difícil determinar si la fuente de contaminación fue específicamente durante la pre-cosecha. Sin embargo, para la mayoría de los productos, la contaminación ocurre en la superficie de los mismos, existiendo evidencia de que los agentes patógenos pueden estar presentes por la acción capilar a través de los espacios o grietas y/o tejido dañado de la planta durante su producción (León *et al.*, 2009).

Post-cosecha

Un producto fresco recibe mucho menos tratamiento después de la cosecha; algunos productos son empacados y enviados sin ningún tratamiento previo, mientras que otros son lavados, saneados y empacados antes de ser enviados. Muchos de los productos frescos pasan a través de áreas especializadas llamadas áreas de empacado. El objetivo de los empaques es preparar al producto, que viene directamente del campo, para su distribución, cabe destacar que en ciertos cultivos como los de melón, cilantro y perejil, tienen una contaminación significativamente más alta cuando salen del área de empacado para ser distribuidos que cuando salen del campo y se mandan directamente a su distribución. Esto sugiere que ciertos procesos que se llevan a cabo en el empacado tienen una contaminación cruzada y/o proliferación microbiana, desafortunadamente es difícil determinar si las superficies de equipos pueden ser fuente de contaminación hacia los productos o viceversa (Castillo *et al.*, 2004).

Producción de tomate en México

En México durante el ciclo agrícola 2014, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en sus reportes mensuales sobre siembra y cosecha hasta febrero de 2015 se han obtenido 2.4 millones de toneladas de tomate rojo, el cual contempla la producción de tomate saladette y tomate bola, mejor conocido en el Centro y Sur de México como Jitomate, dicha producción representa una disminución en la producción de este producto en un 9% respecto a la producción que se presentó en 2013 que fue de 2.7 millones de toneladas. En los últimos ocho años se han sembrado y cosechado alrededor de 48 y 55 mil hectáreas de tomate rojo en todo el país, con rendimientos que van desde las 37 a 57 toneladas por hectárea, siendo así en 2012 el año en que se obtuvo la mayor producción de esta legumbre que fue de 2.8 millones de toneladas con rendimientos promedios de 51.38 toneladas por hectáreas.

De acuerdo con el informe de avances de siembras y cosechas que publica el SIAP durante el año agrícola 2014, los principales estados productores de tomate rojo son: Sinaloa con una producción de 550, 900 toneladas con rendimientos por hectárea de 40.5 toneladas; San Luis Potosí con una producción de 196, 011 toneladas con rendimientos de 74 toneladas por hectárea; Michoacán con una producción de 163, 425 toneladas y rendimientos de 27.8 toneladas por hectárea; Jalisco produjo 158, 408 toneladas con

rendimientos por hectárea de 70 toneladas; y Zacatecas con una producción de 145, 907 toneladas con rendimientos de hasta 54 toneladas por hectárea.

Principales productores de tomate rojo

De acuerdo con datos publicados por el Banco de México sobre la balanza comercial agropecuaria, México es vendedor neto de jitomate hacia el mercado exterior, siendo su principal comprador Estados Unidos, entre las variedades que destacan son el tomate bola, el tomate saladette y el tomate Cherry. El jitomate es el 8° cultivo con mayor valor en México.

México es el principal exportador de jitomate fresco a nivel mundial, con cerca del 20% del volumen y 25% del valor comerciados, que se destinan principalmente a EEUU. El país exporta alrededor de 1.5 millones de toneladas anuales, que representan entre el 50 y 70% del volumen de producción.

Según estadísticas del Banco de México las exportaciones de jitomate desde el 2000 hasta la fecha han presentado una tendencia al alza, esto provocado principalmente por el efecto que tiene el precio del dólar con respecto al peso, siendo éste el efecto de devaluación del peso frente al dólar ya que provoca el incentivar aún más las exportaciones por parte de los productores ya que reciben mayores ganancias al vender su producción al mercado exterior por que lo venden en dólares y al convertirlos en pesos, reciben más pesos por su producción, pero esto no siempre es beneficioso ya que se descuida el mercado interno.

De acuerdo con datos del Sistema de Información e Integración de Mercados (SNIIM) el precio del jitomate ha tenido un aumento en el primer trimestre de 2015 de hasta un 47% en jitomate bola, presentando precios en enero de \$17.00 pesos por kilogramo y en marzo precios de hasta \$25.00 pesos el kilogramo en la central de abastos de la Ciudad de México.

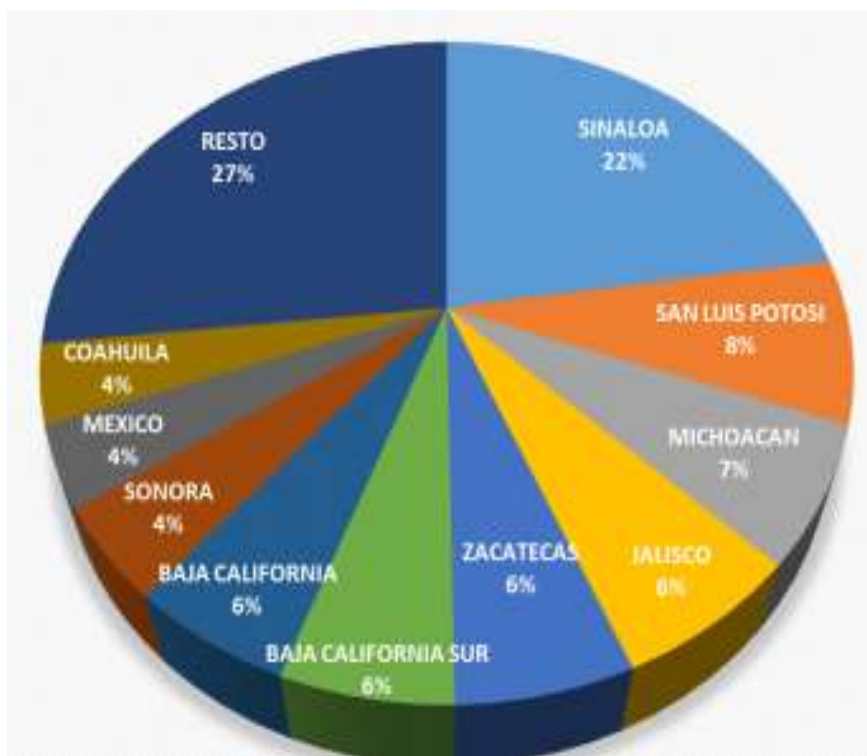


Figura 1. Principales productores de tomate rojo. Fuente: Observatorio de Precios con datos del SIAP. Consultado en abril 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del sitio de estudio

La investigación se realizó en dos sistemas de producción bajo agricultura protegida: en invernadero semihidropónico con cultivos de tomate bola (híbrido Cedral) con sustrato de fibra de coco y en malla sombra *in situ* con tomate saladette (híbrido Rafaello), ambos de hábito indeterminado. Las muestras experimentales fueron recolectadas en diferentes etapas fenológicas de la planta durante el ciclo de cultivo, así como en el empacado del fruto, además de realizar muestreos de sustrato, suelo, agua de riego conectados directamente a pozos de extracción, agua en almacenamiento y agua de fertirriego, en el Rancho el Trébol, Villa de Arista, San Luis Potosí.



Figura 2. Ubicación del sitio de estudio

Recolección de muestras

Se colectaron 18 muestras de agua, estas muestras se tomaron de pozos de extracción, almacenamiento y fertirriego. Las muestras de aguas se colectaron en frascos estériles de un litro de capacidad, debidamente etiquetados y cerrados.

Se colectaron 21 muestras de suelo en los dos sistemas de producción y 21 muestras de sustrato de fibra de coco en invernadero, las muestras de suelo se extrajeron de cinco

puntos seleccionados aleatoriamente y se tomaron aproximadamente 50 g de suelo por punto a una profundidad no mayor de 5 cm y se colocaron en bolsas estériles (Ziploc®). Se colectaron 25 muestras de plántulas y se analizaron los raíces y folíolos, además se muestrearon plantas en diferentes etapas de desarrollo desde la etapa vegetativa-reproductiva hasta empaque considerando diferentes partes de la planta. En la etapa vegetativa-reproductiva se muestrearon los folíolos intermedios e iniciales, brotes intermedios e iniciales, flores, pedúnculos, raíz, frutos en precosecha, frutos cosechados directamente de la planta y frutos en empaque tratados con cloro, en esta etapa se colectaron 210 muestras para cada sistema de producción.

Las muestras recolectadas en invernadero semihidropónico y malla sombra se trasladaron en una hielera a Microbiología Clínica y Ambiental del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Coahuila para su posterior análisis microbiológico. Para llevar a cabo el experimento se utilizó un diseño completamente al azar para cada una de las modalidades con cuatro repeticiones.

- a) Invernadero semihidropónico con sustrato de fibra de coco, acolchado y riego por goteo con el híbrido Cedral.
- b) Malla sombra *in situ* con acolchado y riego por goteo con el híbrido Rafaellos.

Detección y aislamiento

La determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella enterica* se llevó en base a lo descrito en la NOM-210-SSA1-2014, que consta de cuatro etapas sucesivas:

Pre-enriquecimiento

Esta etapa es para restaurar las células de *Salmonella enterica* que pudieran estar dañadas y mantenerla a una condición fisiológica estable. Para lo cual se realizó a partir de agua peptonada tamponada como medio de cultivo no selectivo.

Agua Peptonada Tamponada (APT)

El APT es para la determinación de *Salmonella enterica* y para su preparación se consideraron los siguientes ingredientes:

Cloruro de sodio: 5g

Peptona de caseína: 10g

Fosfato de sodio dibásico: 9g

Fosfato de potasio monobásico: 1.5g

Los ingredientes antes mencionado se disolvieron en un litro de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.0 ± 0.2 , posteriormente se distribuyó la cantidad de 225 ml en un frasco de capacidad de 500 mL. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Una vez preparado el medio se utilizó un litro del agua de irrigación recolectadas en tres puntos diferentes y se colocó en 50 ml de agua peptonada tamponada. Para el suelo, sustrato, plántula, foliolo inicial, brote inicial, foliolo intermedio, brote intermedio, flores, pedúnculo del fruto, fruto en pre-cosecha y poscosecha. Se pesaron 25 g de la muestra y se colocaron en 225 ml de agua peptonada tamponada en un frasco de 500 ml. Se incubaron a 35°C por un periodo de 24 hrs.

Enriquecimiento selectivo

Esta etapa estimula y favorece el crecimiento de *Salmonella spp.* e inhibe otros organismos presentes en la muestra, para esta etapa se utilizó el medio de cultivo denominado:

Rappaport Vassiliadis (CRV)

Durante el proceso de preparación del medio se añadió 26.6 g en un litro de agua bidestilada. Se calentó suavemente hasta dilución completa. Se ajustó el pH a 5.1 de acuerdo a la etiqueta del medio, después se distribuyó la cantidad de 10 ml en tubos estériles. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Una vez teniendo el medio de cultivo se tomó la suspensión obtenida del agua peptonada tamponada y se pasó 0.1 ml a tubos estériles con 10 ml de CRV, los tubos inoculados se incubaron sin agitación a 35°C por un periodo de 24hrs.

Aislamiento y diferenciación en medios selectivos

En la tercera etapa del análisis permitió la diferenciación de colonias de *Salmonella spp.* de otras bacterias, esta diferenciación radica en la composición de los distintos medios que permitió el crecimiento de las colonias de esta bacteria con aspectos característicos, se utilizaron cuatro medios selectivos en placa que a continuación se mencionan:

Agar *Salmonella* y *Shigella* (SS)

Es un medio diferencial selectivo para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*, a partir de heces, orina y alimentos diversos, tanto frescos como enlatados.

Para la preparación del medio se suspendió 60 g del polvo en un litro de agua bidestilada. Se mezcló bien hasta obtener una suspensión homogénea. Se calentó en una

parrilla eléctrica agitando frecuentemente y se hirvió durante un minuto. No se esterilizó en autoclave de acuerdo a la metodología. Se continuo con el proceso de baño maría para su enfriamiento que se sometió a un rango de 45°C- 50°C, después se distribuyó en cajas petri empleando 20 ml por placa. El pH del medio fue 7.0 ± 0.2.

Agar Verde Brillante (VB)

Considerado como un medio altamente selectivo empleado para aislar *Salmonella spp.*, (excepto *S. typhi* y *S. paratyphi*).

Se preparó este medio de cultivo suspendiendo 58 g del polvo en un litro de agua bidestilada, se mezcló perfectamente y se calentó agitando frecuentemente. Se hirvió por un minuto y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Se ajustó el pH del medio a 6.9 ± 0.2.

Agar Sulfito de Bismuto (ASB)

Medio selectivo para aislamiento y diferenciación de *Salmonella typhi*.

Para continuar con el proceso de preparación del medio se rehidrató 52 g del medio en un litro de agua bidestilada, se agitó hasta obtener una suspensión uniforme. Se calentó agitando frecuentemente hasta ebullición y se mantuvo por un minuto. Se enfrió inmediatamente a ± 45°C y se vació en cajas petri estériles, siempre con agitación constante. No se esterilizó en autoclave. pH 7.5 ± 0.2.

Agar Xilosa Lisina-Desoxicolato (XLD)

Para el aislamiento de bacterias enteropatógenas, especialmente de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Arizona*.

Se suspendió 55 g del polvo en un litro de agua bidestilada. Se calentó frecuentemente justamente hasta que hirvió el medio. No se sobrecalentó. Se transfirió de inmediato al baño maría a unos 50 °C. Se vertió en placas tan pronto como se haya enfriado. El medio para su utilización deberá tener un color rojizo y estar claro. El calentamiento excesivo o la prolongada estancia al baño maría producen precipitación. Cuando esto sucede las reacciones son satisfactorias pero las colonias pueden ser de menor tamaño. pH 7.4 ± 0.2.

Para continuar con el resto del procedimiento, la metodología aplicada para tal efecto fue: de la suspensión bacterial obtenida en el enriquecimiento selectivo se tomaron muestras con el asa estéril y se estriaron en los cuatro medios de cultivo. Los medios

sembrados se incubaron a 35 °C y a las 24hrs se examinaron para detectar la presencia de colonias típicas con características de *Salmonella*.

Morfología colonial típica de *Salmonella*

Para la identificación se consideró las siguientes características:

SS: colonias transparentes con centro negro

VB: Colonias rosas, blancas o transparentes sobre fondo rosa.

ASB: Colonias cafés o marrón, grises o negras; algunas veces pueden presentar brillo metálicas y el medio circundante generalmente es café al principio y a medida que se prolonga el tiempo de incubación, pueden aparecer de color negro.

XLD: colonias rosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras. Los serotipos *S. paratyphi* A y *S. choleraesuis*, pueden dar colonias transparentes sin centro negro; algunos cultivos atípicos de *Salmonella* producen colonias amarillas con o sin centros negros.

En ausencia de colonias típicas sospechosas para *Salmonella* se seleccionaron todas las colonias que crecieron en los medios de cultivo, se sembraron en base de agar sangre para el incremento de los cultivos puros y se incubaron a 35°C por un periodo de 24hrs.

Cultivos control positivo

Con la finalidad de verificar el protocolo anterior se incluyó dos controles positivos durante el procesamiento de las muestras: para esto se inocularon dos muestras de cada variable con *Salmonella* Typhimurium a una concentración de 1.55×10^{11} UFC/ml.

Para cultivar los microorganismos aislados se utilizó el medio de cultivo que a continuación se menciona.

Base de Agar Sangre (BAB)

Para su preparación se disolvieron 40 g del medio deshidratado en un litro de agua bidestilada, se remojó entre 5 y 10 minutos. Se hirvió durante 1 minuto, después se distribuyó 10 ml en tubos estériles. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos y se enfrió a 45-50 °C en posición inclinada y se vació en cajas petri estériles.

Las colonias aisladas obtenidas en la etapa de aislamiento y diferenciación se sembraron en BAB para mantener e incrementar las poblaciones, se incubaron a 37°C por 24 hrs, transcurrido el tiempo se procedió con las pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas diferenciales

En esta etapa se diferencian las bacterias por su actividad metabólica. La identificación o confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella spp* se llevó a cabo en los siguientes medios:

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Diferenciación temprana de *Salmonella* y *Shigella*.

Se suspendió 33 g del polvo en un litro de agua bidestilada. Se disolvió, calentó e hirvió durante un minuto y posteriormente se distribuyó en tubos con tapón de rosca y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, se enfrió en posición inclinada. pH 6.7 ± 0.2.

Se tocó ligeramente el centro de la colonia seleccionada con un asa estéril y se sembró en forma de estría la parte inclinada y por punción el fondo. Se incubaron los tubos con las tapas sin apretar para mantener las condiciones anaeróbicas en la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S. Se incubaron a 35°C por un lapso de 24 hrs.

El agar hierro lisina es un medio útil de detección, porque la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* descarboxilan la lisina y producen H₂S, mientras que la producción de gas varía por serotipo.

Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI)

Para la preparación de este medio se rehidrató 59.4 g del medio de cultivo en un litro de agua bidestilada. Se calentó agitando con frecuencia hasta su punto de ebullición y completa disolución del medio. Se distribuyó en tubos y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Los tubos se enfriaron en posición inclinada. pH 7.3 ± 0.2.

Se tocó ligeramente el centro de la colonia seleccionada con un asa estéril y se sembró en forma de estría la parte inclinada y por punción el fondo. Se incubaron los tubos con las tapas sin apretar para mantener las condiciones anaeróbicas en la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S y un poco inclinado para evitar la producción excesiva de gas. Se incubaron a 35°C por 24 hrs.

Agar MIO

Se utilizó este medio para la identificación de las bacterias en base a la movilidad, producción de Indol y actividad enzimática Ornitina decarboxilasa.

Para la preparación del medio se suspendió 31 g del medio en un litro de agua bidestilada. Se calentó con agitación suave hasta disolverse completamente del polvo y

se hirvió durante un minuto. Se distribuyó en tubos de vidrio, se tapó y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Se enfrió en posición vertical. pH 6.5 ± 0.2.

Se tocó ligeramente el centro de la colonia efectiva con un asa estéril y se sembró en forma de picadura el fondo. Se incubaron los tubos con las tapas sin apretar para mantener las condiciones anaeróbicas en la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S. Se incubaron a 35°C por 24 hrs.

Urea (Caldo Urea)

Para diferenciar las enterobacterias con base en la producción de ureasa.

Se preparó el componente siguiente:

Urea: 20 g

Extracto de levadura: 0.1 g

KH₂PO₄: 9.1 g

K₁HPO₄: 9.5 g

Rojo de fenol: 0.01 g

Los ingredientes se disolvieron en litro de agua bidestilada estéril. No se calentó. Se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.45 mm. Se distribuyó asepticamente porciones de 1.5-3.0 ml en tubos de ensayo de 13 x 100 mm estériles. pH 6.8 ± 0.2.

Se tocó ligeramente el centro de la colonia seleccionada con un asa estéril y se sembró en forma de picadura en el fondo. Se incubaron los tubos con las tapas sin apretar para mantener las condiciones anaeróbicas en la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S. Se incubaron a 35°C por 24 hrs.

Los cultivos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio, que manifiesta un color entre rosáceo y rojo. Los microorganismos ureasa negativos no cambian el color del medio, el cual es entre amarillo pálido y rosado. *S. Typhi* siempre es ureasa negativa.

Caldo Peptonado (CP) para la reacción de Indol

Ingredientes

Cloruro de sodio: 15 g

Peptona de caseína: 20 g

Agua bidestilada: 1000 ml

Se pesaron los ingredientes y se disolvieron en agua bidestilada. Se ajustó el pH y se distribuyó la cantidad de 4 ml en tubos 13 x 100 con tapón de rosca. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Se tocó ligeramente el centro de la colonia pura con un asa estéril y se sembró en forma de picadura el fondo. Se incubaron los tubos con las tapas sin apretar para mantener las condiciones anaeróbicas en la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S. Se incubaron a 35°C por 24 hrs.

Interpretación de pruebas bioquímicas

Agar LIA

Interpretación de los cambios de decarboxilación de la lisina:

Positivo: fondo color morado (Descarboxilación) → Informar K/K

Negativo: fondo amarillo. → Informar K/A

Desaminación de la lisina: Positivo: tendido rojo. → Informar R/A.

Agar TSI

La lectura utilizada universalmente es la siguiente:

K= cambio debido a alcalinización (Rojo) **A**= cambio debido a la producción de ácido.

Lectura:

- Fermentación de la glucosa: fondo amarillo y tendido rojo → Informar K/A
- Fermentación de la Lactosa y/o Sacarosa: tendido amarillo → Informar A/A
- Producción de gas: Ruptura del agar
- Producción de H₂S: Ennegrecimiento del medio.

Agar MIO

Se usa para la identificación de Enterobacterias sobre la base: Movilidad, actividad de Ornitina Descarboxilasa y la producción de Indol.

Movilidad: se demuestra por un enturbiamiento del medio o por un crecimiento en que el cultivo difunde desde la línea de inoculación. Los cultivos no móviles crecen solo a lo largo de la línea de inoculación.

Ornitina: los cultivos negativos a Ornitina se mantienen amarillos y a veces en la parte superior pueden ser púrpura.

Producción de Indol: a partir del triptófano se detecta con el aldehído presente en el reactivo de Kovacs, que se añade después de la lectura de Ornitina y Movilidad.

Prueba de Ureasa

Positiva: si los tubos inoculados de agar urea viran a púrpura.

Negativa: ningún cambio en color en el medio.

Prueba de Indol: los cultivos de *Salmonella* dan la prueba negativa (la carencia de color profundo rojo en la superficie del caldo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En medios selectivos se logró aislar colonias presuntivas en base a su morfología para *Salmonella*, esta característica se presentó solamente en un medio selectivo (verde brillante), las colonias fueron de color rosa con fondo rosa, en algunas muestras de foliolos y brotes, flores y frutos. Sin embargo al realizar la confirmación por pruebas bioquímicas las reacciones obtenidas fueron positivas para *Escherichia coli*.

Al interpretar las reacciones enzimática para diferenciación de enterobacterias en los medios TSI, LIA y MIO dieron como resultado las siguientes bacterias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Reacciones enzimática de las bacterias presentes en las muestras experimentales.

Patógeno	LIA	TSI		MIO		
			H ₂ S	M	I	O
<i>Salmonella Typhimurium (+)</i>	K/K	K/A	+	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	K/K	A/A	-	+	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	K/A	A/A	+	+	-	+
<i>Serratia marcesens</i>	K/K	K/K	-	+	-	+
<i>Enterobacter spp.</i>	K/K	K/A	-	+	-	+

LIA= Descarboxilación de la linina y desaminación de la lisina (K/K); TSI= Fermentación de la glucosa y sacarosa (K/A); H₂S =Producción de ácido sulfhídrico; MIO= Movilidad, Indol y Ornitina. **Fuente:** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957.

Tradicionalmente se ha preferido el uso de más de un medio de aislamiento porque se traduce en un incremento en la positividad. Los medios de cultivos selectivos difieren en su capacidad para aislar a *Salmonella* de los alimentos y el medio ambiente (Bager y Petersen, 1991; D'Aoust *et al.*, 1992; Fernández Escartín *et al.*, 1983 y Oboegbulem, 1993). Esto se debe a diferencias en el nivel de estrés celular y la tolerancia inherente a los serovares e incluso cepas individuales potencialmente

presentes, hacia los inhibidores químicos y físicos en medios de cultivo (Chen *et al.*, 1983; Korsac *et al.*, 2004).

Bacterias encontradas en plántula de tomate

La contaminación de tomate por patógenos humanos como *Salmonella enterica* e indicadores de contaminación fecal, se origina a partir de los campos donde se cultivan los tomates al realizar las prácticas agronómicas indispensables como la elección del cultivar, producción de plántula, densidad de población y distribución, trasplante, tutorado, podas control de malezas, plagas y enfermedades, cosecha, selección y empacado, así como suelo, agua de riego, restos vegetales, semillas, residuos animales e insectos.

Con el propósito de descartar que las plántulas manifiesten la contaminación por posibles inóculos como charolas, sustrato, semillas, agua, suelo y manejo agronómico de las mismas antes del trasplante, se realizó el análisis microbiológica tomando una muestra de 25 plántulas, considerando el muestreo en dos partes: raíz y hojas teniendo un total de 50 muestras, donde el 96% (49/50) de las muestras analizadas presentó a *Citrobacter freundii* y el 4 % a *Enterobacter spp* en ambas partes de la plántula, sin embargo a pesar de estos resultados en ninguna de las muestras se detectó a *Salmonella enterica* por lo que se puede considerar que no existe el problema en esta etapa fenológica ya que el productor destina un área independiente para la producción de plántulas y así poder establecer adecuadas prácticas de sanidad, control de temperaturas, humedad relativa, ventilación y luminosidad.

Sin embargo en un estudio realizado por Barak y Liang (2008) al sembrar semillas de tomate en un suelo inoculado por *S. enterica* encontraron que plántulas de 3-5 hojas de tomate que fueron colonizadas por esta bacteria, en este caso el análisis en plántulas se realizó en ausencia de la inoculación artificial del patógeno donde no se detectó la presencia de *S. enterica*.

A pesar de las prácticas de sanidad realizadas por el productor en esta etapa fenológica se detectó a la presencia de *Citrobacter freundii* y *Enterobacter spp*; la presencia de éstas bacterias se le atribuye a una contaminación fecal.

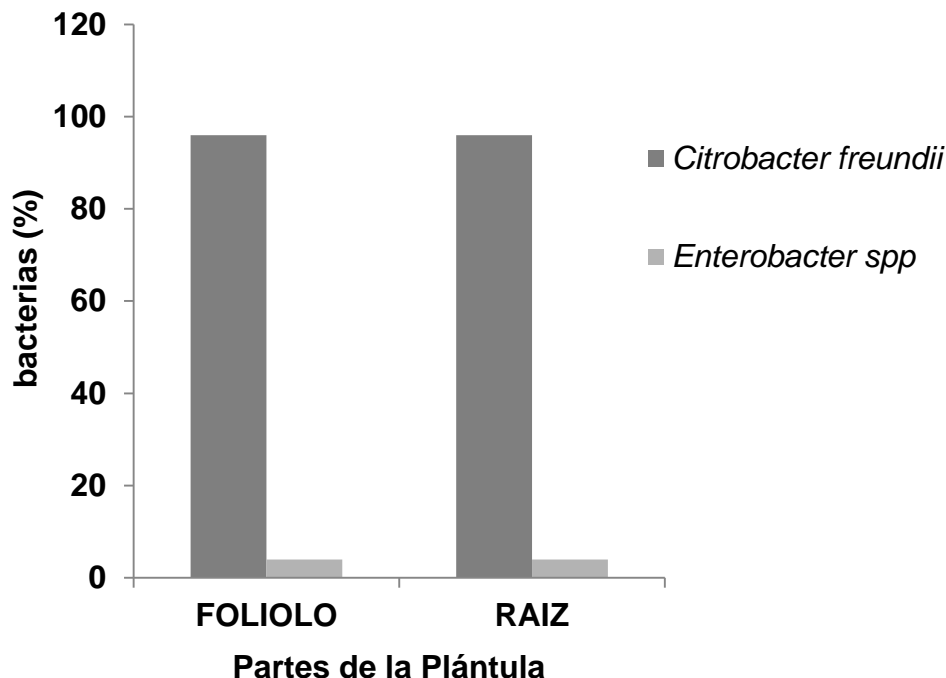


Figura 3. Bacterias presentes en plántulas de tomate antes de trasplantarse.

Bacterias presentes en diferentes partes de planta de tomate provenientes de invernadero semihidropónico hasta empaque para su distribución, Rancho San Javier.

Las partes de las plantas muestreadas y analizadas fueron: raíz, foliolo inicial, brote inicial, foliolo intermedio, brote intermedio, flor, pedúnculo del fruto, fruto en precosecha, fruto cosechada y fruto empacada ya que son consideradas como posibles inóculos para *Salmonella enterica*.

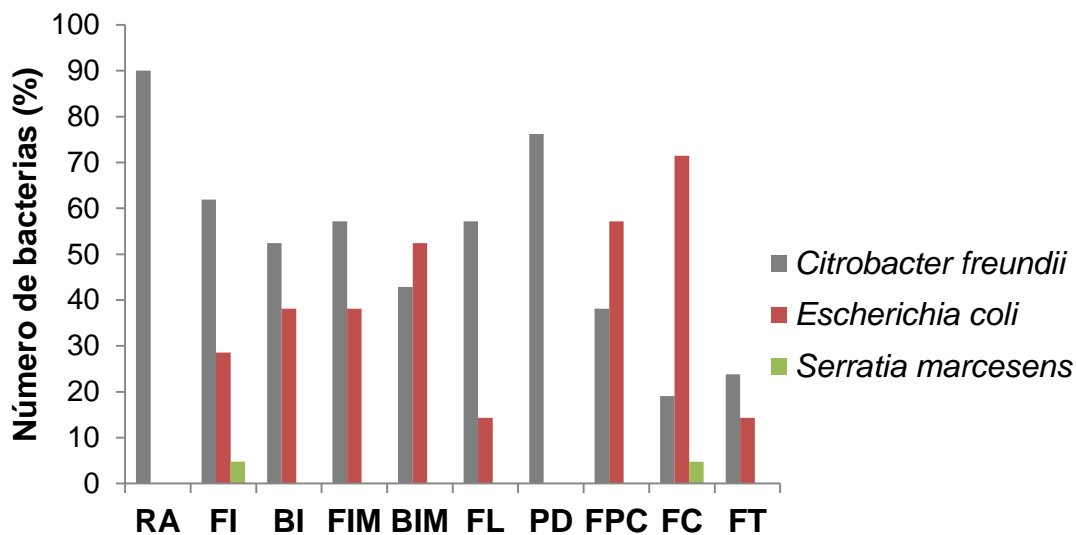
En este sistema de producción se analizó la calidad microbiológica de 210 muestras de diferentes partes de la planta en la etapa vegetativo-reproductiva, así como también en frutos en precosecha, cosecha y empaque. En raíz se detectó a *Citrobacter freundii* en un 90%, en orden de importancia le siguieron los pedúnculos del fruto con 76.19 %, foliolo intermedio y flores con 57.14%, 52.48 % en brote inicial y 42.86 % brote intermedio, mientras que 38.10 % se encontró en frutos en precosecha, 23.81% en fruto empacado y 19.05 % en fruto cosechada directamente de la planta respectivamente.

Con respecto a *Escherichia coli*, se encontró que en los frutos que habían sido cosechados directamente de la planta en invernadero semihidropónico se presentó la

presencia de esta bacteria en un 71.43 % de las muestras analizadas, seguido por fruto en precosecha y brote intermedio con 57.14% y 52.38 % respectivamente; en el brote inicial y foliolo intermedio se encontró un 38.10%, en el foliolo inicial con 28.57 % y 14.29 % en flores y fruto seleccionado y empacado. Esta bacteria se detectó en la etapa vegetativa-reproductiva debido a las diferentes prácticas agronómicas que recibe la planta en esta etapa de desarrollo, encontrándose una mayor presencia del patógeno en fruto cosechado directamente de la planta. Con estas prácticas de manejo el personal se permanece en el invernadero durante las ocho horas de jornada, lo cual puede producir una contaminación de *E. coli* a partir del equipo, herramientas utilizadas y directamente del personal.

Durante el proceso de manejo y producción de tomate bajo agricultura protegida se investigó sobre la presencia de *Serratia marcescens* que solamente se manifestó en el foliolo inicial de la planta y en fruto cosechada con 4.76 %. En cuanto a esta bacteria no existían antecedentes de que fuera considerada como un patógeno asociado a las plantas ni se sabía que fuese capaz de colonizar su floema, sin embargo recientemente fue reconocida como patógeno de una enfermedad de las cucurbitáceas y económicamente importante. *S. marcescens* es un microbio cosmopolita en productos alimenticios, desechos almacenados, cuerpos de agua y suelo; a menudo es un saprófito inocuo, pero puede causar enfermedades en vertebrados inmunocomprometidos, incluyendo a los humanos, y especies de insectos (Fletcher and Wayadande, 2002).

En la etapa vegetativa-reproductiva de la planta de tomate y empaque no fue posible el aislamiento de *Salmonella enterica* en virtud de que las condiciones no fueron favorables para la presencia de la misma, a pesar de que la dosis infectante conocida es detectable por el método convencional.



Partes de la planta

RA=Raíz; FI=Foliolo inicial; BI=Brote inicial; FIM= Foliolo intermedio; BIM= brote intermedio; FL= flores; PD= Pedúnculo; FPC= Fruto precosecha; FC= fruto cosechada y FT= fruto tratado con cloro.

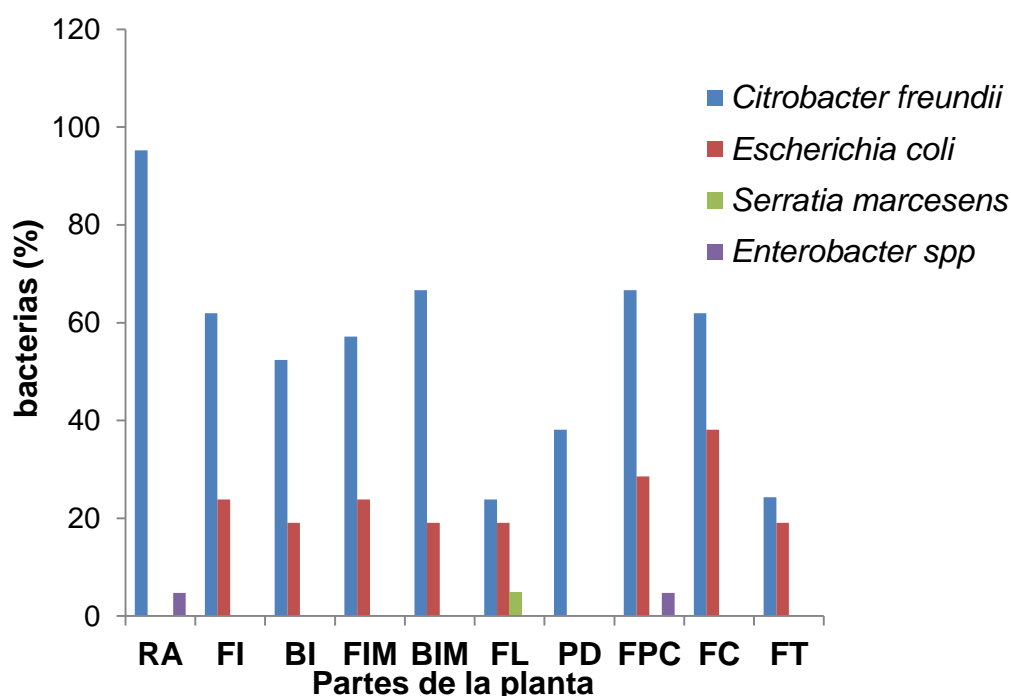
Figura 4.-Bacterias presentes en diferentes partes de planta de tomate provenientes de invernadero semihidropónico hasta empaque para su distribución, Rancho San Javier.

Bacterias presentes en diferentes partes de plantas de tomate provenientes en malla sombra hasta empaque.

En este sistema de producción se analizó la calidad microbiológica de 210 muestras de diferentes partes de la planta en la etapa vegetativa-reproductiva, así como también en frutos en precosecha y poscosecha (fruto cosecha y empaque). El análisis se realizó en raíz, foliolo inicial, brote inicial, foliolo intermedio, brote intermedio, flor, pedúnculo del fruto, fruto en precosecha y poscosecha (cosecha y empaque). Se detectó a *Citrobacter freundii* durante toda la etapa de producción hasta empaque, donde la mayor presencia estuvo en raíz con 95.24%, seguido de brote intermedio y fruto en precosecha con 66.67%, foliolo inicial y fruto en cosechado directo de la planta con 61.9 %, foliolo intermedio con 57.14 %, brote inicial con 52.38%, pedúnculo del fruto con 38.1%, fruto en empaque después del proceso de transporte, lavado, cepillado, encerado, seleccionado y empacado con 24.29 % y en el muestreo de la etapa de floración donde se tomaron diferentes racimos florales y número de flores con un 23.81 % respectivamente.

Con respecto a *Escherichia coli*, se encontró que en los frutos analizados en cosecha que fueron cortados por los trabajadores presentaron la presencia de esta bacteria en un 38.10%, seguido de fruto en precosecha y foliolo inicial e intermedio con un 28.57% y 23.81 % respectivamente; mientras que en brote inicial, brote intermedio, flores en racimos y fruto en empaque la presencia de esta bacteria fue del 19.05%.

Mientras que *Serratia marcesens* solamente se encontró en flores en 4.76% y *Enterobacter spp* en raíz y fruto en precosecha con 4.76%; esta última es considerada como colonizante habitual del tracto gastrointestinal de acuerdo a investigaciones realizadas por Farmer (1999).



RA=Raíz; FI=Foliolo Inicial; BI=Brote Inicial; FIM= Foliolo Intermedio; BIM= Brote Intermedio; FL= Flores; PD= Pedúnculo; FPC= Fruto Precosecha; FC= Fruto Cosechada y FT= Fruto Tratado

Figura 5.-Bacterias presentes en diferentes partes de plantas de tomate provenientes en malla sombra hasta empaque.

Bacterias presentes en muestras de agua de extracción, agua almacenada y agua de fertirriego, Rancho el Trébol 2015.

El agua de riego contaminada se considera el mayor peligro de contaminación microbiana a frutas y hortalizas (Steele *et al.*, 2005 y Stine *et al.*, 2005). El agua

utilizada para el riego proviene de un pozo profundo, después se dirige al almacenamiento y fertirriego. Al momento de tomar las muestras se consideraron estos tres puntos que son críticos para la contaminación microbiana.

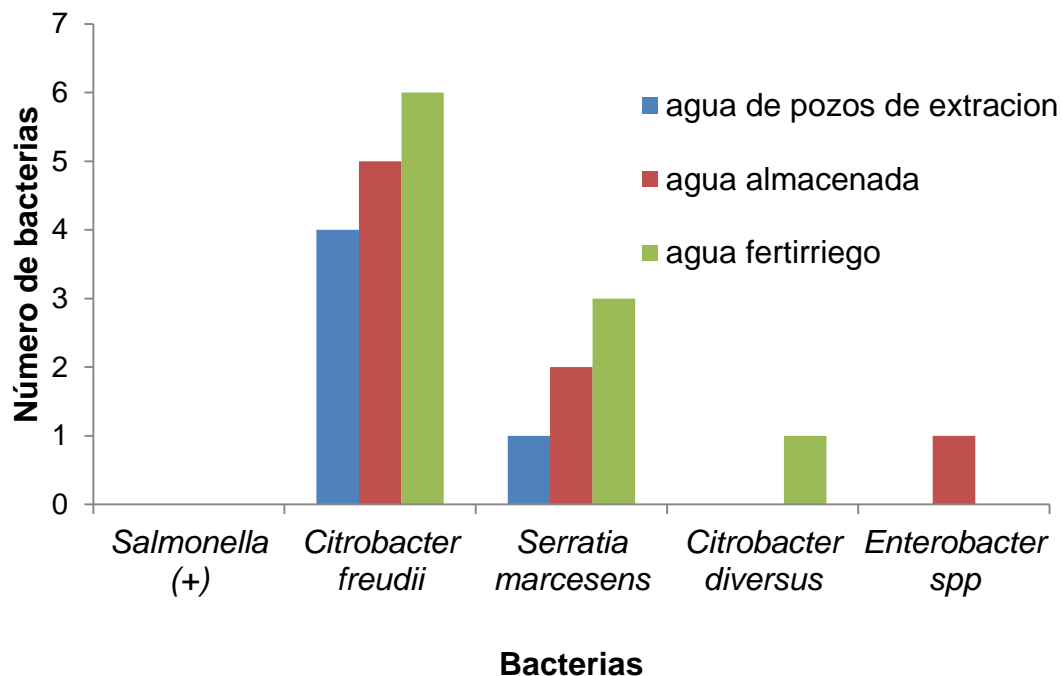


Figura 6. Bacterias presentes en las muestras de agua.

Se analizaron 18 muestras de agua recolectadas de pozos de extracción, almacenamiento y fertirriego. Del total de las muestras analizadas se encontró 23 cepas de bacterias. Del total de bacterias presentes en los muestreos el 65.21% corresponde a *C. freundii*, de los cuales el 26.06% se encontró en el agua de fertirriego, seguido del agua almacenada con 21.73% y 17.39% en el agua proveniente directamente de los pozos de extracción. Mientras que la presencia de *S. marcesens* fue de 13.04% en agua de fertirriego, 8.69% se encontró en agua almacenada y 4.34 % en las muestras de agua provenientes de los pozos de extracción. Además de estas bacterias se encontró la presencia de *Citrobacter diversus* (4.34 %) en agua fertirriego y *Enterobacter spp* (4.34%) en agua almacenada.

Sin embargo la bacteria que predominó en este análisis fue *C. freundii*, seguido de *S. marcesens* respectivamente. Por otro lado en el agua de fertirriego se presentó el mayor número de bacterias. Palacios *et al.* (1999) confirmaron la ausencia de colonias de

Salmonella en muestras de agua de riego convencional pero no mencionan de qué fuente provenía el agua, para esta investigación si se determinaron los puntos claves para el muestreo del agua por lo que los resultados obtenidos son confiables para la toma de decisiones del productor para su prevención y/o corrección.

Bacterias presentes en suelo y sustrato de fibra de coco en invernadero semihidropónico.

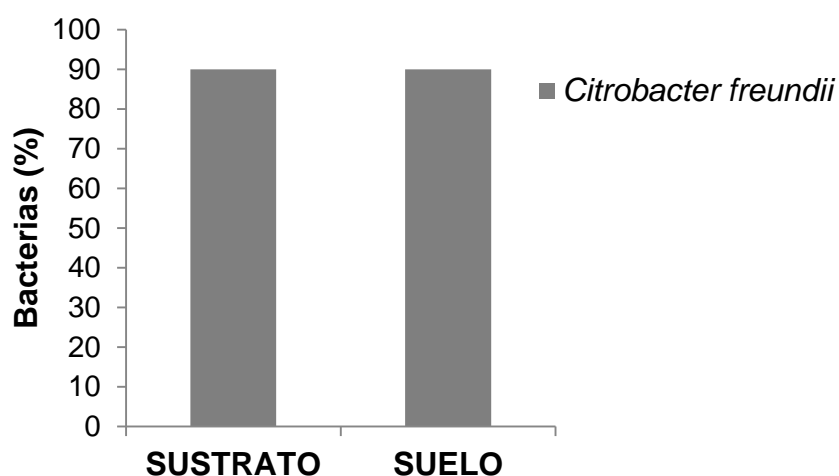


Figura 7. Muestreo de suelo y sustrato en invernadero semihidropónico

En este análisis se detectó la presencia de *C. freundii* en todas las muestras analizadas tanto de suelo como de sustrato de fibra de coco. En el caso del sustrato pudo haberse contaminado por estar en contacto directo con el suelo, además de ser un material reciclado de otra zona productora de un ciclo de cultivo anterior.

Bacterias presentes en muestras de suelo provenientes de malla sombra *in situ*

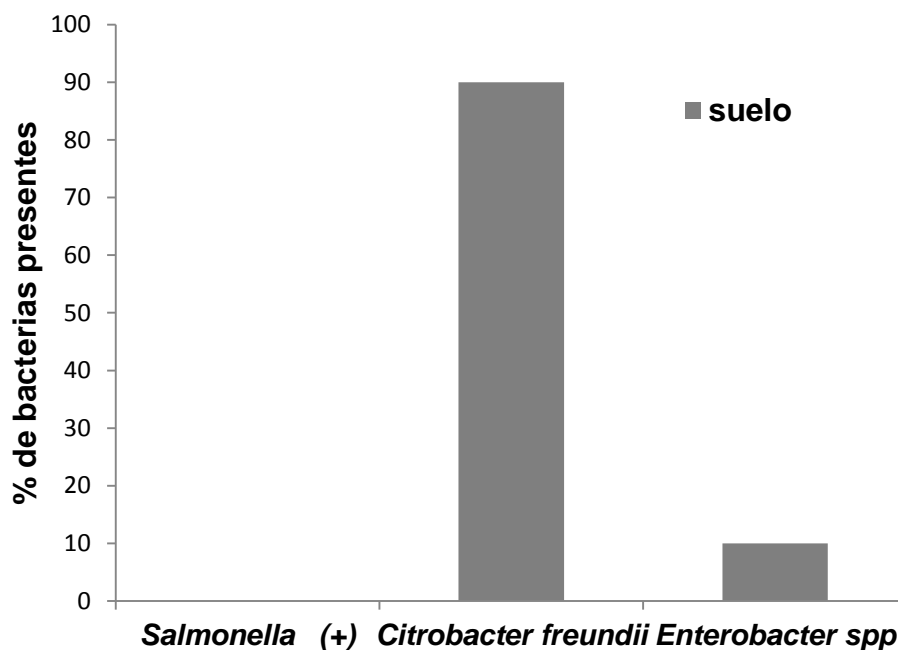


Figura 8. Bacterias presentes en muestras de suelo en malla sombra.

El muestreo se realizó en malla sombra donde cambió la práctica de establecimiento del cultivo, híbrido, fecha de siembra, acolchado y fertirriego *in situ*. Para realizar los análisis se extrajeron 21 muestras en diferentes etapas fenológicas de la planta para someterlas al laboratorio y realizar los análisis microbiológicos. Del total de muestras de suelo analizados, 90.48 % resultaron positivas para *C. freundii* y el 9.52% para *E. spp*, esta última solamente se encontró en esta modalidad.

No se pudo determinar la presencia de *Salmonella* en las 42 muestras de suelo tanto de invernadero como de malla sombra y 21 muestras de sustrato en invernadero. Sin embargo, este resultado no necesariamente sugiere la ausencia de la misma, ya que se ha reportado que la bacteria en ambientes hostiles entra en un estado viable pero no cultivable, lo que dificulta su aislamiento en medios selectivos (Caro *et al.*, 1999). Además *Salmonella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el suelo hasta por un año (Winfield y Groisman, 2003). Entre los factores que determinan la sobrevivencia de la bacteria en el suelo se encuentran: el tipo de suelo, grado de desecación, poblaciones de organismos depredadores y cantidad de materia orgánica presente en el mismo (Paluszac

et al., 2003). Otra causa que dificulta a esta bacteria en muestras de suelo es la alta concentración de microbiota natural. Se considera que la ausencia de *Salmonella* en suelo puede deberse a que no presentaba las condiciones para que esta bacteria se hiciera presente o es probable que sea selectiva de algún cultivo en particular. O bien a una alta concentración de microbiota mixta del suelo y la dificultad de aislar la bacteria con los métodos de cultivos empleados en esta investigación (Reissbrodt *et al.*, 2002).

Material vegetativo proveniente de invernadero semihidropónico, Rancho el Trébol 2015.

Al momento de obtener los resultados de las 252 muestras analizadas del material vegetativo provenientes de invernadero semihidropónico no se encontró indicios de *S. enterica*, sin embargo en el 60.71% de las muestras se encontró a la especie *C. freundii* seguido de *E. coli* con 26.19%, mientras que la presencia de *S. marcesens* solamente fue de 0.79%.

Durante el periodo de muestreo en este sistema de producción ya se habían llevado a cabo las practicas agronómicas como la densidad de población, sistema de tutores, podas (poda de brotes laterales, poda de hojas, poda de flores, poda de frutos, poda de brote apical y poda especializada de hojas), control de maleza, control de plagas y enfermedades, aplicación de fertilizantes entre otros. Se consideraron todas estas practicas ya que la contaminación de los frutos pueden ocurrir durante este proceso, además en la etapa de procesamiento durante la cosecha, transporte, selección y empaque. Sin embargo no se pudo determinar la presencia *S. enterica* en las 252 muestras analizadas, mientras que la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal estuvieron presentes en plantas y frutos de tomate.

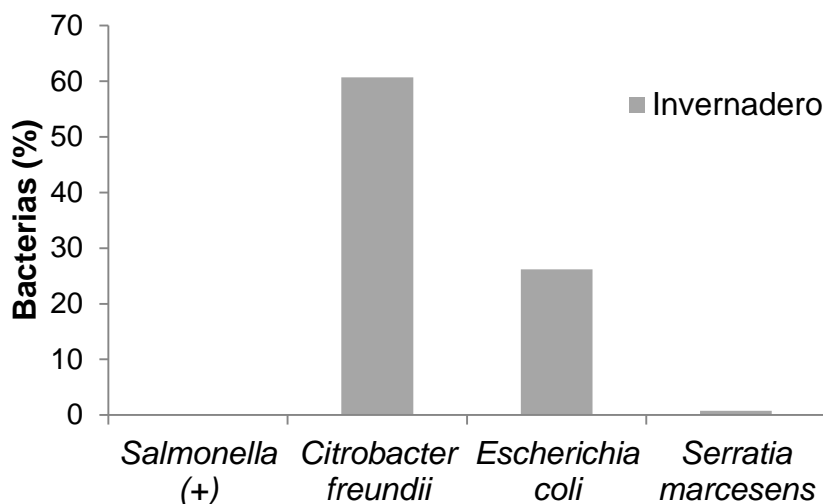


Figura 9. Bacterias presentes en material vegetativo en invernadero semihidropónico

Material vegetativo proveniente de malla sombra *in situ*, Rancho el Trébol 2015.

En la investigación realizada se tenía contemplado el estudio específico de *S. enterica* pero al realizar el análisis microbiológico se determinó que se encontraban otros microorganismos diferentes a la especie en estudio. En el material vegetativo proveniente de malla sombra se encontró la presencia de *C. freundii* en un 57.14 % de las muestras analizadas, seguido por *E. coli* con el 17.32 %, mientras que la presencia de *S. marcescens* solamente fue de 0.82 %, además se encontró otra bacteria conocida como *E. spp* con un 1.73 %, ésta última solamente se presentó en este sistema de producción; de la misma manera que en invernadero no fue posible el aislamiento de *Salmonella*.

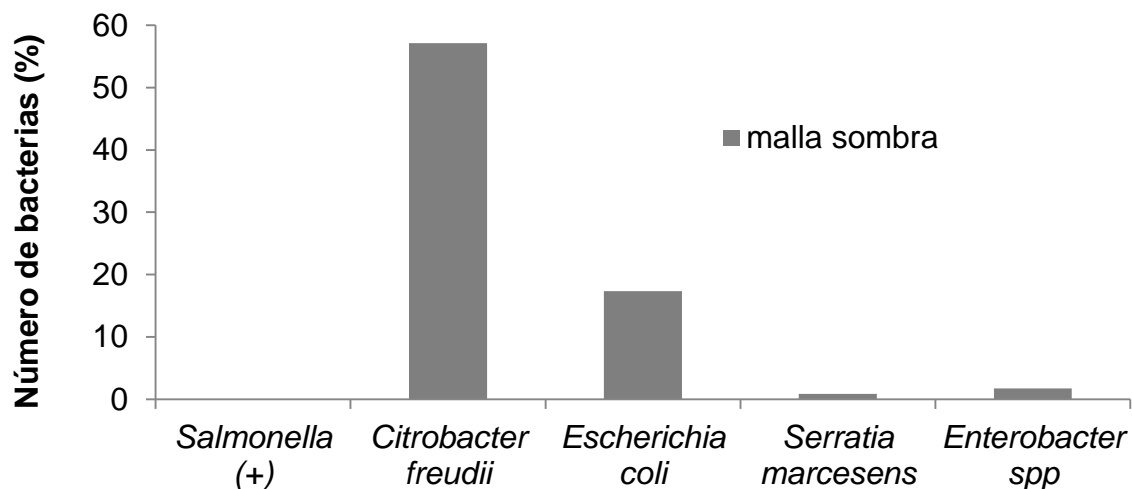


Figura 10. Bacterias presentes en material vegetal de malla sombra

Dada la importancia que representa para el mercado los productos frescos inocuos es importante que los productores realicen este tipo de estudios para determinar la calidad de sus productos y así poder permanecer en la cadena del consumidor. Por lo anterior se llevó a cabo esta investigación y de acuerdo a los resultados obtenidos no se encontró la presencia de *S. enterica* en las diferentes etapas fenológicas de la planta y producción en las modalidades de agricultura protegida donde se realizó el trabajo así como en agua y suelo, lo cual coinciden con los estudios realizados en productos importados como el melón, apio, cilantro, lechuga, perejil, cebolla cambray, fresas y tomates; en un total de 1028 muestras vegetales evaluadas, se encontró que en el 99% de éstas estuvieron libres de *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, (FDA, 2002).

Los resultados producto de la investigación realizada bajo agricultura protegida en tomate de habito indeterminado no se encontraron evidencias en la presencia de este patógeno lo que coincide con lo encontrado por Johannessen *et al.* (2002) en lechuga, ensaladas precortadas, germinados, champiñones y fresas, donde no detectaron la presencia de *E. coli* O157:H7 ni de *Salmonella* en ninguna de las muestras vegetales analizadas. De igual forma en una investigación realizada en Noruega que incluyó 890 muestras de vegetales, ninguna fue positiva para *S. spp* ni *E. coli* O157:H7, así como en

otros trabajos realizados en 2003 y 2004 por Mukherjee *et al.*, (2006) al no lograr aislar a este tipo de bacterias en 476 muestras analizadas de 32 cultivos orgánicos y convencionales en diferentes cultivos como tomate, lechugas, pimiento verde, repollo, pepino, fresas y manzanas entre otras. Por otro lado Johnston *et al.*, (2006) analizaron 466 muestras de vegetales de hoja verde y melón que provenían de Estados Unidos y México, en ninguna muestra se logró detectar la presencia de *E. coli* O157:H7 ni *S. spp.*, además Seow *et al.* (2012) reportaron que ninguna de las muestras analizadas de vegetales de Singapur que incluyeron una variedad de manzanas, naranjas, mangos, tomate, lechugas y germinados no fue positiva para *E. coli* O157:H7 o *S. spp.*, sin embargo según Francis *et al.*, (2009) los criterios microbiológicos para *Salmonella* debe ser de ausencia en un total de cinco muestras de 25 g; por otro lado Palacios *et al.*, (1999) mencionan que la detección de su presencia, independientemente de la cantidad encontrada, hace que los productos en los que se detecta se consideren contaminados e inutilizables, por el alto riesgo que supone para la salud pública.

En las muestras obtenidas en el Rancho el Trébol, Villa de Arista, San Luis Potosí donde se tomaron muestras de agua y suelo en los dos sistemas de producción no se encontraron evidencias en la presencia de estos patógenos estos resultados coinciden con ensayos que fueron regados con agua convencional sin *Salmonella* en muestras de agua, suelo y planta obtenidas por Palacios *et al.*, (1999).

Por otro lado al manejar los diferentes medios selectivos para el aislamiento de bacterias patógenas se encontró que las colonias con características presuntivas para *S. enterica* crecieron en verde brillante presentando colonias rosas, sobre fondo rosa, sin embargo al realizar las pruebas bioquímicas correspondientes resultaron positivas para *E. coli*. Al igual que *Salmonella* han sido previamente ligados como vehículo para la infección de frutas y hortalizas particularmente *E. coli* O157:H7 (Johnston *et al.* 2005), por tal motivo se buscó la presencia de ésta bacteria se observaron los medios positivos bajo luz UV a una longitud de onda de 365 nm, sin embargo no presentaron fluorescencia por lo que se descarta la presencia de *E. coli* O157:H7 en tomate. Así mismo, este estudio reveló que *E. coli* solamente se encontró en la etapa vegetativa-reproductiva, lo que se le puede atribuir al manipuleo del personal y herramientas utilizadas en el manejo de la planta al momento de llevar a cabo las diferentes prácticas agronómicas hasta la

cosecha, en malla sombra e invernadero, es probable que sea un indicador de contaminación fecal ya que los microorganismos entéricos de origen fecal pueden contaminar las manos después de la defecación o al entrar en contacto con ropa sucia o superficies contaminadas con materia fecal o por visitas a los sanitarios cercanos a las instalaciones, además de que el personal no utiliza cofias, guantes o desinfectante al realizar estas prácticas. Para esta bacteria en alimentos debe ser menor a 10 UFC.g (RTCA, 2009); mientras que en ensaladas mixtas de vegetales debe ser menor a 10^2 UFC de acuerdo a lo mencionado por Francis *et al.*, (1999).

Así mismo, este estudio reveló que en toda la etapa de producción de tomate incluyendo el suelo y agua hubo presencia de *C. freundii*, en algunas muestras se detectó la presencia de *C. diversus*, *S. marcesens*, y *E. spp*, estas bacterias se encuentran dentro del grupo de los coliformes fecales, las cuales pueden llegar a causar un daño de salud al humano al consumir productos contaminados durante la etapa de manejo y producción de tomate por estas bacterias. Además de ser un excelente parámetro o indicador de contaminación fecal debido a que comparten características bioquímicas y de resistencia con algunas bacterias patógenas como *E. coli*. Aunque estos patógenos facultativos (*C. freundii*) están comúnmente presentes en el suelo, agua y plantas (Schwaiger Karin *et al.*, 2011), por lo cual su presencia no siempre pudiera ser ligada a la presencia de una contaminación fecal. La presencia de bacterias coliformes termotolerantes en una muestra ha sido tradicionalmente asociada con contaminación fecal, las bacterias coliformes termotolerantes de origen no fecal (*E. spp.*) han sido aisladas comúnmente de vegetales (Ostenvik, 1998). Por lo tanto, el vínculo natural entre bacterias coliformes termotolerantes como *E. spp.* y los vegetales, limita el valor de las bacterias coliformes termotolerantes como un indicador de contaminación fecal en vegetales (Johannessen *et al.*, 2002).

Se conoce poco sobre la interacción de los microorganismos patógenos con microorganismos deterioradores de los productos vegetales, entre otros. Dicha interacción es principalmente antagónica reportándose para el caso de las bacterias ácido láctico que son componentes importantes de la flora nativa de las frutas y hortalizas. Esta interacción puede ser debida entre otras cosas a la mala, manejo del cultivo, disminución del pH, soluciones nutritivas, generación de peróxido de hidrógeno,

competencia por nutrientes y producción de compuestos antimicrobianos, tales como bacteriocinas o antibióticos (Francis, *et al.*, 1999), esto pudiera ayudar a explicar la razón por la cual no se lograron detectar microorganismos patógenos en las muestras analizadas.

CONCLUSIONES

Existe ausencia de *Salmonella enterica* en la producción de tomate bajo agricultura protegida en las modalidades invernadero semihidropónico y malla sombra *in situ*, ya que no se pudo determinar la presencia de esta bacteria en las diferentes etapas fenológicas de la planta, así como en agua de riego y suelo.

Se detectó la presencia de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal en las plantas de tomate lo que se le puede atribuir al personal que realiza el manejo cultural y agronómico, ya que esta bacteria solamente se encontró en la etapa vegetativa-reproductiva y cosecha-empaque y no se detectó en suelo, agua de riego y raíz.

Este problema fitosanitario se le atribuye a la falta de medidas de seguridad al realizar las diferentes prácticas como el sistema de tutorado, podas de brotes laterales, hojas, flores, frutos, poda de brote apical, poda especializada de hojas, entre otras.

La presencia de *Citrobacter freundii* en las diferentes vías transmisoras no están ligadas a una contaminación fecal ya que la bacteria puede encontrarse comúnmente en el agua, suelo y plantas.

Se sugiere la implementación de estrategias de control de inocuidad alimentaria durante la etapa de formación, desarrollo, pre cosecha y cosecha del cultivo de tomate para mejorar la calidad microbiológica y disminuir la probabilidad de la transmisión de estos patógenos, particularmente en alimentos de consumo fresco como el tomate.

Los hallazgos del presente estudio generan una base importante para contribuir y continuar con este tema de investigación ya que es muy importante obtener resultados que establezcan el riesgo asociado al consumo de alimentos específicos y la presencia de estos patógenos bajo agricultura protegida.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Monem, M.H. and Dowidar, A. 1990. Recovering of *Salmonella* from soil in Eastern region of Saudi Arabia Kingdom. J. Egypt Public Health Assoc. 65: 61-75.
- Bager, F. and Petersent, J. 1991. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. Acta Vet. Scand. 32:473-481.
- Barak, J.D., Liang, A., and Narm, K.E. 2008. Differential attachment to and subsequent contamination of agricultural crops by *Salmonella enterica*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74 (17) 5568–5570.
- Barak, J.D., Kramer, L.C. and Hao, L.Y. 2011. Colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* is cultivar dependent, and type 1 trichomes are preferred colonization sites. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 77 (2) 498–504.
- Batz, M. B., Hoffman, S., and Morris, J. G. 2011. Ranking the risks: the 10 pathogen-food combinations with the greatest burden on public health. Emerging Pathogens Institute .University of Florida, , Gainesville, FL. 67pp.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., and Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environmental Microbiology . 12(9) 2385–2397.
- Biniam, G.M. and Mogessie, A.P. 2010. Microbial load, prevalence and antibiograms of *Salmonella* and *Shigella* in lettuce and green peppers. Ethiopian Journal Of Health Sciences. Vol.20 (1) 41-48.
- Boore, A.L., Hoekstra, R.M., Iwamoto, M., Fields, P.I., Bishop, R.D. and Swerdlow, D.L. 2015. *Salmonella enterica* infections in the United States and assessment of coefficients of variation: A novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996–2011. PLOS ONE 10 (12) 1-11.
- Botero, L.A. 2009. Artículos técnicos de *Salmonella* en aves. Genética, reproducción, nutrición y sanidad. Memorias ASPA. VI Seminario avícola del oriente. http://www.engormix.com/MA-avicultura/articulos/salmonelosis-aviar/165-topic_70-p20.htm.
- Brandl, M.T. and Mandrell, R.E. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68 (7) 3614–3621.
- Brandl, M.T., Cox, E.C. and Teplitski, M. 2013. *Salmonella* interactions with plants and their associated microbiota. Phytopathology 103:316-325.

- Brandl, M.T., Miller, W.G., Bates, A.H., and Mandrell, R.E. 2005. Production of autoinducer in *Salmonella enterica* serovar Thompson contributes to its fitness in chickens but not on cilantro leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71 (5) 2653–2662.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J. Tauxe, R. and Swaminathan, B. 2000. GUEST COMMENTARY. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38 (7) 2465–2467.
- Brunia, A. K. 2008. Foodborne microbial pathogens. Mechanism and Pathogenesis. Ed Springer. USA, 201-216.
- Burr, R., Effler, P., Kanenaka, R., Nakata, Holland, B., Angulo, F.J. 2005. Emergence of *Salmonella* serotype Enteritidis phage type 4 in Hawaii traced to locally-produced eggs. *International Journal of Infectious Diseases*. No. 9, 340—346.
- Caffer, M.I., Terragno, R. y Binsztein, N. 2008. Manual de procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp.* Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. Departamento de Bacteriología. Buenos Aires, Argentina. 76pp.
- Caro, A., Got, P., Lesne, J., Binard, S. and Baleux, B. 1999. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella* Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:3229-3232.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2005. Outbreaks of *Salmonella* infections associated with eating Roma tomatoes. United States and Canada 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 54(13) 325–328.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2011. National enteric disease surveillance: *Salmonella* surveillance overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. 12pp.
- CFSAN-FDA (Center for Food Safety and Applied Nutrition- U.S. Food and Drug Administration). 2001. Analysis & evaluation of preventive control measures for the control & reduction/elimination of microbial hazards on fresh & fresh-cut produce. A Report of the Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the United States Department of Health and Human Services. No. 223-98-2333.
- Chen, H., Fraser, A.D.E. and Yamazaki, H. 1993. Evaluation of the toxicity of *Salmonella* selective media for shortening the enrichment period. *Int. J. Food Microbiol.* 18:151-159.
- Chin, J. 2001. El control de las enfermedades transmisibles. 17 ed. Informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública. Publicación científica y técnica no. 581. Washington, E.U.A., p. 552-560.

- Cooley, M. B., Miller, W. G., and Mandrell, R. E. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69(8), p.4915-4926.
- Cummings, K., Barrett, E., Mohle-Boetani, J.C., Brooks, J.T. Farrar, J., Hunt, T., Fiore, A., Komatsu, K., Werner, S.B. y Slutsker, L. 2001. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 7 (6), p.1046-1048.
- D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Warburton, D.W. 1992. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 16:41-50.
- De Brito, A. M., Gagne, S. y Antoun, H. 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting *Rhizobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:194-199.
- DeWaal, C. S., Tian, X. A., and Plunkett, D. 2009. Outbreak alert. Analyzing foodborne. Outbreaks 1998 to 2007. Closing the gaps in our federal food-safety net. Eleventh Edition. Center for Science in the Public Interest, Washington, DC. 24pp.
- Dong, Y., Iniguez, A.L., Ahmer, B.M. and Triplett, E.W. 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69 (3), p.1783–1790.
- Doyle, M.P. and Erickson, M.C. 2008. Summer meeting 2007 the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology*. 105:317–330.
- Farmer JJ. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D. C., ASM Press, 1999; 442-58.
- Fatica, M.K. and Schneider, K.R. 2011. *Salmonella* and produce survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence*. Vol. 2(6) 573-579.
- FDA (Food and Drug Administration). 2002. Mejorando la Seguridad y Calidad de Frutas y Hortalizas Frescas: Manual de Formación para Instructores. Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition. U. S. Food and Drug Administration (FDA). Maryland, USA. 350 p.
- FDA (Food and Drug Administration). 2010. FDA trend analysis report on the occurrence of foodborne illness risk factors in selected institutional foodservice,

- restaurant, and retail food store facility types (1998–2008). Washington, DC. 225pp.
- Fernández-Escartín, E., Saldaña-Lozano, J. y Mireles-Hernández, C. 1993. Incidencia de *Salmonella* en carnes crudas. Influencia del enriquecimiento en la recuperación del microorganismo. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 25:263-269.
- Fernández-Crehuet, M. y Espigares, M. 1995. Contaminación del agua: contaminación biológica. En: Estudio Sanitario del Agua. J.A. Pérez y M. Espigares (eds.). Capítulo 4. pp.: 51-66. Ed. Universidad de Granada.
- Francis GA, Thomas C, O’Beirne D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Int J Food Sci Technol 34:1–22.
- Francis, G.A., Thomas, C. and O’Beirne, D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. International Journal of Food Science and Technology. 34:1–22.
- González, F.T. y Rojas, H.R.A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud pública de México. Enfermedades emergentes. Guadalajara, Jalisco, México. Vol. 47(5) 388-390.
- González, P.J., Pereira, S.N., Soto, V.Z. Hernández, A.E. y Villarreal, C.J. 2014. Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte. Barranquilla. Vol. 30 (1) 73-94.
- Greene, S.K., Daly, E.R., Talbot, E.A. Demma, L.J. Holbauer, S., Patel, N.J., Hill, T.A., Walderhaug, M.O., Hoekstra, R.M., Lynch, M.F. and Painter, J.A. 2008. Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005. Epidemiol. Infect. 136: 157-165.
- Grimont, P.A.D. and Weill, F.J., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* and Institut Pasteur. 9Th. ed. 166 pp.
- Gu, G., Hu, J., Cevallos-Cevallos, J.M., Richardson S.M., Bartz, J.A. and H. C. van Bruggen, A. 2011. Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in tomato plants. PLoS ONE. Vol. 6 (11) 1-11.
- Guo, X., Chen, J., Brackett, R. E., and Beuchat, L. R. 2001. Survival of Salmonellae on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67 (10) 4760–4764.
- Guo, X., Chen, J., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 2002. Survival of *Salmonella* on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil. Journal of Food Protection. Vol. 65(2):274-279.

- Guo, X., Iersel, M.W. V., Chen, J., Brackett, B.E. and Beuchat, L.R. 2002. Evidence of association of *Salmonellae* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68(7) 3639–3643.
- Gupta, S.K., Nalluswami, K., Snider, C., Perch, M., Balasegaram, M., Burmeister, D., Lockett, J., Sandt, C., Hoekstra, R.M. and Montgomery, S. 2007. Outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, 2004: a useful method for subtyping exposures in field investigations. *Epidemiol. Infect.* 135:1165–1173.
- Hassen, A.; Jedidi, N.; Kallali, H.; Boudabous, A. y Ennabli, M. 1996. Isolation of *Salmonella* in wastewaters and study of indicator bacteria survival in soils. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 73: 173-177.
- Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P. and Mølbak , K. 2003. Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *British Medical Journal*. Vol. 326 (7385): 357.
- Hyeon, J.Y., Chon, J.W., Park, J.H., Kim, M.S., Oh, Y.H., Choi, I.S., and Seo, K.H. 2013. A Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates obtained from food and human sources. *Osong Public Health and Research Perspectives*. Vol. 4(1) 27-33.
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., and Jiang, X. 2004. Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 1 (1) 27-35.
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. and Jiang, X. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70 (4) 2497–2502.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. *Modern food microbiology*. Seventh Edition. *Food Science Text Series*. USA, p. 619-639.
- Johannessen, G. S., Loncarevic, S. and Kruse, H. 2002. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*. 77:199-204.
- Johnson, K. E., Thorpe, C. M., and Sears, C. L. 2006. The emerging clinical importance of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*. Vol.43 (12) 1587-95.

- Johnston, L.M., Jaykus, L.A., Moll, D., Martínez, M.C., Anciso, J., Mora, B. and Moe, C.L. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*, Vol. 68 (9) 1840–1847.
- Jurado, J.R., Arenas, M.C., Doblas, D.A., Rivero, A. y Torre-Cisneros, J. 2010. Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonellas*. *Medicine*. 10 (52) 3497-501.
- Klerks, M.M., Franz, E., Gent-Pelzer, M.V., Zijlstra, C. and Bruggen, A.V. 2007. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME Journal* . Vol: 1: 620–631.
- Korsack, N., Degeye, J.N., Etienne, G., China, and Daube, G. 2004. Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. *J. Food Prot.* 67:2158-2164.
- Kroupitski.Y., Brandl, M.T., Pinto, R. Belausov, E., Tamir-Ariel, D. Burdman, S. and Sela, S. 2013. Identification of *Salmonella enterica* genes with a role in persistence on lettuce leaves during cold storage by recombinase-based in vivo expression technology. *Phytopathology*. Vol. 103 (4) 362-372.
- Lake, R., Hudson, A. and Cressey P. 2002. Risk profile: *Salmonella* (non typhoid) in poultry (whole and pieces). Institute of Environmental Science & Research Limited. Christchurch Science Centre, New Zealand. 63pp.
- León, J.S., Jaykus, L.A. and Moe, C.L. 2009. Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables. In: *Microbiologically safe foods*, In: Heredia N, Wesley I, García S., John Wiley & Sons, (eds) Inc.: New Jersey, USA. 255-290.
- Lynch, M.F., Tauxe, R.V., and Hedberg, C.W. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiol. Infect.* 137:307-315.
- Mandrell, R.E. 2009. Enteric human pathogens associated with fresh produce: Sources, transport, and ecology. In: *microbial safety of fresh produce*. X. Fan, B. A. Niemira, C. J. Doona, F. E. Feeherry, and R. B. Gravani, eds. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologies, Ames, IA.
- Marin, C., Hernandez, A. and Lainez, M. 2009. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult Sci.* vol. 88(2) 424-31.
- Marvasi, M., Cox, C.E., Xu, Y., Noel, J. N., James J. G., and Teplitski, M. 2013. Differential regulation of *Salmonella* Typhimurium genes involved in O-antigen capsule production and their role in persistence within tomato fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. Vol. 26 (7) 793–800.

- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A.T., Buesing, K.M. and Diez-Gonzalez. 2006, Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper midwest. *Journal of Food Protection*, Vol. 69(8) 1928–1936.
- Murase, T., Yamada, M., Muto, T., Matsushima, A. and Yamai, S. 2000. Fecal excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following a food-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38(9) 3495–3497.
- Niemira, B.A. 2011. Influence of refrigerated storage time on efficacy of irradiation to reduce *Salmonella* on sliced Roma tomatoes. *Journal of Food Protection*, Vol. 74 (6) 990–993.
- Noel, J.T., Arrach, N., Alagely, A., McClelland, M. and Teplitski, M. 2010. Specific responses of *Salmonella enterica* to tomato varieties and fruit ripeness identified by in vivo expression technology. *PLoS ONE*. Vol. 5(8): e12406. doi:10.1371/journal.pone.0012406.
- Noel, J.T., Joy, J., Smith, J.N., Fatica, M., Schneider, K.R., Ahmer, B.M.M. and Teplitski. 2010. *Salmonella* SdiA recognizes N-acyl homoserine lactone signals from *Pectobacterium carotovorum* in vitro, but not in a bacterial soft rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 23 (3) 273–282.
- Oboegbulem, S.I.1993. Comparison of two enrichment media and three selective media for isolation of salmonellae from fresh chicken carcass fluids and sewer swabs. *Int. J. Food Microbiol*. 18:167-170.
- Odumeru, J.A. and León-Velarde, C.G. 2012. *Salmonella* detection methods for food and food ingredients, *Salmonella* a dangerous foodborne pathogen. Editorial InTech. Capítulo 17, p. 373-392.
- Østensvik, Ø. 1998. Faecal indicator bacteria in drinking water. *Nor. Veterinaertidsskr*. 110, 606–614.
- Palacios, M.P., Lupiola, P., Del Nero, E., Pardo, A., Rodríguez, F., Pita, M.L. y Tejedor, M.T. 1999. Primeros resultados del estudio de la persistencia de *Salmonella* en la zona no saturada del suelo agrícola. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo*. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón. ICIA: Tenerife. ISBN 84-699-1258-5. 127-130p.
- Paluszac Z, A Ligocka, B B Breza, H Olszewska (2003) The survival of selected fecal bacteria in peat soil amended with slurry. *Electronic J. Polish Agric. Universities*. Vol 6, No. 2.
- Pan, W., & Schaffner, D. W. 2010. Modeling the growth of *Salmonella* in cut red round tomatoes as a function of temperature. *Journal of Food Protection*, 73(8), p. 1502 -1505.

- Pao, S., Kelsey, D. F., & Long, W. 2009. Spray washing of tomatoes with chlorine dioxide to minimize *Salmonella* on inoculated fruit surfaces and cross contamination from revolving brushes. *Journal of Food Protection*. 72 (12), p. 2448-2452.
- Pao, S., Kelsey, D. F., Khalid, M. F. and Ettinger, M. R. 2007. Using aqueous chlorine dioxide to prevent contamination of tomatoes with *Salmonella enterica* and *Erwinia carotovora* during fruit washing. *Journal of Food Protection*. Vol 70 (3), p. 629-634.
- Patrick, M.E., Mahon, B.E., Zansky, S.M., Hurd, S. and Scallan, E. 2010. Riding in shopping carts and exposure to raw meat and poultry products: prevalence of and factors associated with, this risk factor for *Salmonella* and *Campylobacter* infection in children younger than 3 years. *J Food Prot.* 2010; 73 (6), pp. 1097-1100.
- Pokharel, B.M., Koirala, J., Dahal, R.K., Mishra K.S., Khadga, P.K. and Tuladhar N.R. 2006. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives. *International Journal of Infectious Diseases*. 10: 434-438.
- Puerta-García A. y Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. Unidad de enfermedades infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo. Hospitalario Universitario de Albacete. *Medicine*. Vol. 10 (51) 3426-31.
- Reissbrodt R., Tschäpe, H., Kingsley, R.A, and P.H., Williams (2000) Resuscitation by ferroxamine E of stressed *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from soil and water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4128-4130.
- Rodríguez, D.M., Torres, F.E. Gutiérrez, E.V., López, M.P. Martínez, M.M. Carrascal, A.K. 2008. Determinación de *Salmonella* Typhimurium en compost inoculado artificialmente empleado en un cultivo de lechuga. *Acta biol. Colomb.* Vol. 13 (3) 61-72.
- Rosas, G.A. y Acosta, V.M. 2001. Manual de manejo higiénico de los alimentos. Primera edición. Secretaría de Salud, Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios. Distrito Federal, México. 67pp.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. and Griffin, P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 17, (1) 7-15.
- Schwaiger Karin, et al., 2011, "Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany", *International Journal of Environmental Health Research*. 21 (3) 161–172.

- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C.S. and Bauer, J. Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. 2011. *International Journal of Environmental Health Research*. Vol. 21 (3) 161–172.
- Seow, J., Ágoston, R., Phua, L. and Yuk, H.G. 2012. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control*. Vol. 25: 39-44.
- Shi, X., Namvar, A., Kostrzynska, M., Hora, R. and Warriner, K., 2007. Persistence and growth of different *Salmonella* serovars on pre- and postharvest tomatoes. *Journal of Food Protection*. Vol. 70(12), p. 2725-2731.
- SMI (Standards for microbiology investigations). 2015. Identification of Enterobacteriaceae. *Public Health England*. Vol. 16 (4) 1-32.
- Steele, M. and Odumeru, J. 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of Food Protection*. Volume 67, (12),p. 2839-2849.
- Steele, M., Mahdi, A., and Odumeru, J. 2005. Microbial assessment of irrigation water used for production of fruit and vegetables in Ontario, Canada. *J. Food Prot.* 68:1388-1392.
- Stine, S.W., Song, I., Choi, C.Y., and Gerba, C.P. 2005. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *J. Food Prot.* 68:913-918.
- Teplitski, M., Schneider, K., Danyluk, M. y González, C. 2011. *Salmonella* y tomates: preguntas y respuestas para los consumidores. Universidad de Florida, EEUU. 5pp.
- Toth, B., Bodager, D., Hammond, R.M. Stenzel, S. Adams, J.K. Kass-Hout, T., Hoekstra, R.M. Mead, P.S. and Srikantiah, P. 2002. Outbreak of *Salmonella* serotype Javiana infections - Orlando, Florida. *Journal Morbidity and Mortality*. Vol. 51(31) 683-684.
- Trinetta, V., Morgan, M.T. and Linton, R.H. 2010. Use of high-concentration-short-time chlorine dioxide gas treatments for the inactivation of *Salmonella enterica* spp. inoculated onto Roma tomatoes. *Food Microbiology*. 27 :1009-1015.
- Turpin, P.E.; Maycroft, K.A.; Rowlands, C.L. and Wellington, E.M. 1993. Viable but non-culturable *Salmonella* in soils. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 421-427.
- Uribe, C. y Suárez, M. C. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Medical*. 37 (2) 151-158.

- USFDA (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) –CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition). 1998. Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. Washington. 40pp.
- Wei, C.L., Huang, J.M., Lin, W.F., Tamplin, M.L. and Bartz, J.A. 1995. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *Journal of Food Protection*. Vol. 58: 829-836.
- Winfield, M. D. y Groisman, E.A. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3687-3694.
- Zaidi, M.B., López, M.C. y Calva, E. 2006. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol.48 (2) 121-125.