



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**“CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN TRES HORTALIZAS PRODUCIDAS EN EL  
ESTADO DE MÉXICO”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA  
EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA

**I.A.I. ITZEL ROJAS PUEBLA**

**TUTOR ACADÉMICO:**

DRA. ANA TARÍN GUTIÉRREZ IBÁÑEZ.

**TUTORES ADJUNTOS:**

DR. JESÚS RICARDO SÁNCHEZ PALE.

DRA. LUZ RAQUEL BERNAL MARTÍNEZ

**EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉXICO. ENERO, 2017.**

El presente trabajo fue financiado a través del proyecto **“Calidad Microbiológica de tres Hortalizas producidas en el Estado de México”**, con número de clave **3791/2014/CID** de la **Universidad Autónoma del Estado de México**

# **CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN TRES HORTALIZAS PRODUCIDAS EN EL ESTADO DE MÉXICO**

## **RESUMEN.**

**Rojas Puebla Itzel<sup>1</sup>,\*Gutiérrez Ibáñez Ana Tarín<sup>2</sup>, Sánchez Pale Jesús Ricardo<sup>2</sup>, Bernal Martínez Luz Raquel<sup>2</sup>, Velázquez Garduño Gisela<sup>3</sup>, Eslava Campos Carlos Alberto<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Estudiante de postgrado de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales **Universidad Autónoma del Estado de México** Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Universitario "El Cerrillo" Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo de México C.P. 50200, México. <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrícolas **Universidad Autónoma del Estado de México** Campus Universitario "El Cerrillo" Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo de México C.P. 50200, México. Tel +52 1(722) 2965518, 2965529. 2965531 Ext. 192. e-mail: atarini@uaemex.mx \* **Universidad Autónoma de México** <sup>3</sup>**Universidad Tecnológica del Valle de Toluca**, Santa María Atarasquillo, Lerma, México. <sup>4</sup> Unidad de hemato Oncología e investigación, **Hospital Infantil de México.** "Federico Gómez/Facultad de Medicina UNAM. Dr. Márquez 162, col. De los Doctores, C.P 06720, Ciudad de México.

La creciente preocupación de los consumidores por mantener una dieta sana y equilibrada, ha hecho que el consumo de hortalizas frescas aumente. Al mismo tiempo han incrementado los problemas de salud de los consumidores debido a la contaminación de alimentos por bacterias enteropatógenas, siendo las hortalizas, para

consumo en fresco, las que presentan mayores posibilidades de convertirse en vehículos de microorganismos patógenos. Debido a la importancia de las hortalizas como fuente de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la calidad de origen microbiológico de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L), cilantro (*Coriandrum sativum* L) y espinaca (*Spinacia oleracea* L), producidos en Calimaya, Toluca y Tenango del Valle, Estado de México. Los estudios se realizaron durante el proceso de cosecha del ciclo de cultivo 2015, se determinó la cantidad de Mesófilos Aerobios (MA), Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF) presentes en 180 muestras de hortalizas, seis muestras de agua de riego y seis de suelo de cultivo. Se utilizaron las metodologías establecidas en las Normas Oficiales Mexicanas: y la Normatividad de la Organización Nacional Francesa para la Estandarización (AFNOR) NF V08-60. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y un análisis de varianza para localidades y una prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Los resultados obtenidos arrojan que, para las muestras de hortalizas, el nivel de microorganismos MA, CT y CF, se encontraron dentro de los límites máximos permisibles por las NOM. Se comprobó la presencia de bacterias CF en las hortalizas, por lo que se realizó un análisis confirmativo mediante una resiembra en medios selectivos, una comprobación bioquímica y serológica, confirmando la presencia de bacterias del género *Escherichia coli* del Serotipo O105 ab flagelar. Los análisis de agua de riego de la lechuga cultivada en el municipio de Calimaya sobrepasaron los límites de CF 12 UFC/mL.

**Palabras clave:** Calidad-microbiológica. ETA. Hortaliza. Serotipificación

# MICROBIOLOGICAL QUALITY OF THREE GREEN LEAFY VEGETABLES PRODUCED IN TOLUCA VALLEY

## ABSTRACT.

The consumption of fresh vegetables has increased, mainly due to the growing concern of consumers to maintain a healthy and balanced diet. Unfortunately the health problems caused by the ingestion of this type of food as a result of its contamination with enteropathogenic bacteria, has also been increased, because fresh vegetables are potential carriers of pathogenic microorganisms. The aim of this research was to determine the microbiological quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and spinach (*Spinacia oleracea* L.) produced in Calimaya, Toluca and Tenango del Valle, State of México, México, because the fresh consumption of these vegetables are considered as important source of foodborne illness. The study was carried out during the harvesting of the cycle 2015. Aerobic Mesophiles (AM), Total Coliforms (TC) and Fecal Coliforms (FC) present in 180 vegetable samples, six water samples of irrigation, and six soil samples were evaluated, according to Official Mexican Standards NOM-109-SSA1-1994, NOM-110-SSA1-1994, NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, and NOM-093-SSA1-1994 and the Normativity of the French National Organization for Standardization NF V08-60. A completely randomized experimental design was used to evaluate the microbiological parameters among locations. An analysis of variance (ANOVA) was performed on the data gathered from the different evaluations with 95% level of significance. Tukey's test ( $P < 0.05$ ) was used to compare the means of the specific treatments. According to the results, the amount of MA, TC and FC were found within the maximum limits allowed by Official Mexican Standards. It

was verified the presence of FC bacteria in the vegetables, for which a confirmatory analysis was carried out by a reseeded in selective medium as well as biochemical and serological tests, confirming the presence of bacteria of the genus *Escherichia coli* of serotype O105 ab flagellar. The analysis of irrigation water of lettuce grown in Calimaya exceeded the limits of FC in 12 CFU/mL.

**Key words:** Microbiological quality. ETA. Vegetable. Serotyping.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	4
DEDICATORIA.....	5
RESUMEN.....	8
ABSTRAC. ....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	19
2.1. Contaminación microbiológica en hortalizas por enterobacterias. ....	19
2.2. Hortalizas de hoja verde como vehículo para contraer Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).....	20
2.3. Cultivo de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L). ....	21
2.3.1. Origen .....	21
2.3.2. Clasificación Taxonómica .....	22
2.3.3. Descripción de la Planta .....	22
2.3.4. Generalidades del cultivo.....	23
2.3.5. Producción Internacional .....	24
2.3.6. Producción Nacional.....	25
2.3.7. Contaminación microbiológica .....	27
2.4. Cultivo de cilantro( <i>Coriandrum sativum</i> L.),.....	28
2.4.1. Origen .....	28
2.4.2. Clasificación Taxonómica .....	28
2.4.3. Descripción de la planta.....	29
2.4.4. Generalidades del cultivo.....	29
2.4.5. Producción Internacional .....	31
2.4.6. Producción Nacional.....	34
2.4.7. Producción Estatal.....	35
2.4.8. Contaminación microbiológica del cilantro.....	35

2.5.	Cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L).	35
2.5.1.	Origen	35
2.5.2.	Clasificación Taxonómica	36
2.5.3.	Descripción de la planta	36
2.5.4.	Generalidades del cultivo	37
2.5.5.	Producción Internacional	38
2.5.6.	Producción Nacional	40
2.5.7.	Producción Estatal	42
2.5.8.	Contaminación microbiológica de la espinaca.	42
2.6.	Inocuidad Alimentaria	42
2.7.	Definición de peligro	43
2.7.1.	Tipos de peligros	43
2.8.	Riesgo en inocuidad	44
2.9.	Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)	45
2.10.	Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)	45
2.11.	Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)	46
2.12.	Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)	46
2.13.	Sistema de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC)	47
2.14.	Métodos más utilizados para el análisis microbiológico de los alimentos	47
2.14.1.	Recuento en placa	47
2.12.2.	Método del número más probable	48
2.12.2.	Técnicas de reducción de colorantes	48
2.12.3.	Recuento microscópico directo	48
2.15.	Principales microorganismos indicadores de contaminación microbiológica en los alimentos	49
2.15.1.	Microorganismos Mesófilos Aerobios	49
2.15.2.	Grupo coliformes	49
2.16.	Organismos relacionados con la Inocuidad Agroalimentaria	50
2.16.1.	<i>Escherichia coli</i>	52
2.16.2.	<i>Salmonella</i> spp.	52
2.16.3.	<i>Listeria monocytogenes</i>	53

2.17.	Pruebas Bioquímicas para Enterobacterias .....	54
2.18.	Serotipificación .....	55
III.	OBJETIVOS .....	56
3.1.	GENERAL.....	56
3.2.	ESPECÍFICOS.....	56
IV.	HIPÓTESIS.....	57
V.	JUSTIFICACIÓN.....	58
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
6.1.	Muestreo.....	60
6.2.	Ubicación geográfica de los municipios estudiados.....	61
6.3.	Tamaño de la muestra .....	62
6.4.	Manejo de muestras .....	62
6.5.	Preparación de las muestras para el análisis microbiológico.....	63
6.6.	Siembra y Determinación de Bacterias Mesófilas Aerobias.....	63
6.7.	Siembra y Determinación de Coliformes Totales y Fecales.....	63
6.8.	Pruebas bioquímicas y de identificación de las enterobacterias.....	644
VII.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	66
VIII.	RESULTADOS.....	68
8.1.	Artículo.....	69
IX.	CONCLUSIONES GENERALES.....	87
X.	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países importadores y exportadores de lechuga mexicana.....	24
Figura 2. Volumen de la producción nacional 2006-2015.....	25
Figura 3. Volumen de producción Principales entidades productoras.....	26
Figura 4. Estados con potencial productivo de lechuga.....	27
Figura 5. Principales países productores del cultivo de cilantro.....	32
Figura 6. Principales países importadores del cultivo de cilantro.....	33
Figura 7. Productores del cultivo de cilantro en México.....	34
Figura 8. Principales países productores de espinaca.....	39
Figura 9. Principales países exportadores del cultivo de espinaca.....	40
Figura 10. Principales Estados productores de espinaca en México.....	41
Figura 11. Mapa de ubicación de los Municipios del Estado de México donde se realizó el experimento.....	61

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación geográfica de los municipios.....	62
---	----

## I. INTRODUCCIÓN.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), el 60% de todas las muertes en el mundo se deben a las enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) tales como las cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad (Olaizola *et al.*, 2006). Uno de los factores de riesgo más comunes a todas estas patologías es una alimentación inadecuada (Gil *et al.*, 2010). La creciente preocupación de algunos consumidores por mantener una dieta sana y equilibrada, ha hecho que el consumo de hortalizas frescas haya aumentado, constituyendo un grupo de nutrientes indispensable para la salud y bienestar (OMS, 2002). No obstante, se han incrementado los problemas de salud de los consumidores por la contaminación de bacterias enteropatógenas en este tipo de alimentos (Ávila-Quezada, 2008) siendo las hortalizas para consumo en fresco las que presentan mayores posibilidades de convertirse en vehículos para que microorganismos patógenos afecten al consumidor. El mercado establece, en muchos casos, la calidad de la hortaliza sólo en función de sus características organolépticas: color, textura, tamaño, aroma, sabor y consistencia, dejando de lado, la posible presencia de gérmenes patógenos que podrían representar un riesgo para la salud humana (OMS, 2002).

El consumo de hortalizas frescas ha incrementado en las últimas décadas, siendo estos productos los responsables de una amplia incidencia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), estos pueden contaminarse en cualquier punto de producción, desde el cultivo, cosecha, procesamiento, distribución y preparación final (Lynch *et al.*, 2007).

Los productos hortofrutícolas asociados con más frecuencia a ETA, incluyen productos como: lechuga, espinaca, germinados, tomates, bayas y melón cataloupe, mientras que los agentes etiológicos más comunes son virus como el *Norovirus* y virus de la Hepatitis A y bacterias como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Olaimat y Holley, 2012).

Luna (2006), reportó la presencia de *E. coli* y *Listeria* spp., en muestras de espinaca. En el 2010 se detectaron cerca de 5,000 casos por intoxicación alimentaria bacteriana, debido al consumo de cilantro y otras hortalizas consumidas en fresco, sin especificar el patógeno. Así mismo se reporta que la microflora de los vegetales varía ampliamente y refleja las condiciones sanitarias con las que es establecido el cultivo (Raj *et al.*, 2005). Barrantes *et al.*, (2010). Reportaron la presencia de bacterias enteropatógenas como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* en el cultivo de lechuga. Puig *et al.*, (2013). Indicaron la presencia de *E. coli* en espinaca.

La Food and Drug Administration (FDA) en 2015, lanzó un comunicado que menciona el cierre de la frontera de exportación México-Estados Unidos, debido a la presencia de brotes de bacterias y parásitos intestinales ocasionados por consumo de cilantro fresco mexicano, los investigadores de la FDA, aseguraron que la causa de dichos brotes fue provocada por heces humanas depositadas a las orillas de los terrenos de cultivo de estas hortalizas (FDA, 2015).

La calidad microbiológica de las hortalizas se puede ver alterada por diferentes fuentes de contaminación, encontrándose entre estas el agua de riego y suelos de cultivo contaminados, malas prácticas agrícolas y recolecciones inadecuadas (Orosco *et al.*, 2008). Todo lo anterior tiene un fuerte impacto en la salud de los consumidores ya que solo la presencia de agentes enteropatógenos representa un riesgo a contraer una ETA.

La presente investigación tuvo como objetivo determinar: la calidad de origen microbiológico de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L), cilantro (*Coriandrum sativum* L) y espinaca (*Spinacia oleracea* L), producidos en Calimaya, Toluca y Tenango del Valle, Estado de México.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1. Contaminación microbiológica en hortalizas por enterobacterias.

En todo el mundo se ha incrementado la frecuencia de brotes de enfermedades gastrointestinales asociadas al consumo de frutas y hortalizas contaminadas (Rodríguez, 2004).

Dentro de los principales microorganismos patógenos de humanos que se han encontrado involucrados en estos brotes, están las bacterias como *Escherichia coli* 0157:H7 (Rodríguez, 2004), *Salmonella* (Rodríguez, 2004) y *Listeria monocytogenes* (Anderson, 2005). En los Estados Unidos de América, el agente causal de la mayoría de los brotes de enfermedades ha sido *Salmonella* spp., por consumo de germinados contaminados, rebanadas de tomate, melón y sandía (Arias *et al.*, 2010). *Escherichia coli* 0157:H7 y *Shigella* spp. también se han asociado a brotes de enfermedades por consumo de diversas variedades de lechuga (Arispe, 2007). Por otra parte, enfermedades causadas por el virus de la Hepatitis A se han relacionado con el consumo de tomates y fresas azucaradas (De Roever, 1998).

La importancia de la investigación enfocada al diagnóstico de patógenos que pueden producir brotes de enfermedades radica en la identificación oportuna y la prevención. Es necesario identificar claramente el o los puntos de contaminación durante el proceso, y cuáles son los frutos con mayor probabilidad de retener patógenos. Algunos reportes indican que los patógenos de humanos tienen la habilidad de internarse en los tejidos de las frutas y hortalizas (Bartz, 1981; Ibarra *et al.*, 2004; Raj *et al.*, 2005). Esta habilidad de los microorganismos podría representar un riesgo para la salud humana si no se

tiene la precaución de lavar, desinfectar o eliminar la epidermis de los frutos (Ibarra *et al.*, 2004).

## **2.2. Hortalizas de hoja verde como vehículo para contraer Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).**

Las ETA, representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político (Fernández, 2000). Son el resultado de la falta de higiene en los alimentos. Esta falta se traduce en un alto número de brotes principalmente de origen microbiano. En los Estados Unidos de América, la incidencia anual de estos padecimientos se estima entre 24-81 millones de casos, mientras que en los países en vías de desarrollo el problema es más acentuado. Se ha estimado, por ejemplo, que en México el número de casos asciende a 200 millones por año (Fernández, 2000).

Los alimentos como las verduras, participan como vehículos de microorganismos patógenos. Estas, pueden contaminarse por una diversidad de fuentes dentro de las que destacan: El uso de agua de riego contaminada, el suelo de cultivo, la materia fecal humana o animal, el aire, el equipo de cultivo y manejo, los recipientes y utensilios, los materiales de transporte y el humano. El consumo de vegetales crudos, ha sido asociado a numerosos casos de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*. y *Escherichia coli* (Fernández, 2000).

Para producir alimentos seguros o de bajo riesgo hacia el humano es esencial poseer información veraz y reproducible que permita desarrollar programas destinados a

eliminar los peligros microbianos asociados al consumo de vegetales mínimamente procesados. Sin embargo, en México la información al respecto es muy limitada o nula. No se cuenta con suficiente información sobre la incidencia de enfermedades asociadas al consumo de ensaladas crudas, ni del comportamiento de microorganismos patógenos de importancia en los vegetales; además se sabe muy poco sobre la frecuencia de bacterias patógenas en ensaladas de verduras listas para su consumo. Esta información es indispensable ya que con base en ella es posible desarrollar medidas objetivas tendientes a disminuir o controlar las enfermedades por verduras. Aunque limitados, se tienen algunos reportes de la presencia de *Vibrio cholerae* y *Salmonella* en hortalizas de hoja verde por ejemplo: espinaca, lechuga, quelites, cilantro y acelga, que se expenden en mercados públicos de las ciudades de Guadalajara, Puebla y Estado de México (Gonzales, 2016).

## **2.3. Cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L).**

### **2.3.1. Origen.**

El origen de la lechuga se encuentra en la cuenca del Mediterráneo en la costa meridional, hay quienes afirman que es originaria de la India o del Asia Central, la lechuga aparece en las tumbas egipcias a manera de pinturas, por el año 4500 A.C., fue introducida a China en los años 600 a 900 D.C., posiblemente en el nuevo Mundo con la llegada de los primeros exploradores y cultivada inicialmente en el área del Caribe. Se acepta que las lechugas conocidas actualmente se derivaron de *Lactuca serriola*, pero se cree que ocurrieron hibridaciones entre distintas especies y un proceso

evolutivo que dio origen a la lechuga actual (Bartz, 1981; Ibarra *et al.*, 2004; Raj *et al.*, 2005).

### **2.3.2. Clasificación Taxonómica.**

**Taxón:** *Lactuca sativa* L.

**Género:** *Lactuca*

**Familia:** Asteraceae

**Subfamilia:** Cichorioideae

**Tribu:** Cichorieae

**Subtributo:** Lactucinae

**Número de registro:** 21360

Lugar de publicación: Sp. Pl. 2: 795. 1753

Nombre Verificado el: 02-Oct-1996 por ARS Systematic Botanists.

Última modificación: 19-Mar-2009

El sitio de prioridad de especies es: Western Regional PI Station (W6)

Accesos: 2621 en Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal.

(NCBI, 2017).

### **2.3.3. Descripción de la Planta.**

La raíz de la lechuga es de tipo pivotante, en el tallo se encuentra un jugo lechoso presenta hojas numerosas y grandes en densa roseta, las flores de la lechuga son amarillas y los granos alargados, las semillas de las mismas son largas (4-5 mm), su color generalmente es blanco crema (Raj *et al.*, 2005).

#### **2.3.4. Generalidades del cultivo.**

Establecimiento: La plántula de Lechuga se obtiene 25 días después de la siembra, y a esta fecha ya estará lista para su trasplante. Son aconsejables densidades que oscilan entre 11 y 13 plantas por m<sup>2</sup> (SAGARPA, 2014).

Con una distancia entre plantas de 25 cm Densidad de siembra: 11-13 plantas/m<sup>2</sup>

Tiempo de cosecha: a los 60-90 días después de la siembra dependiendo la variedad.

Necesidades de agua: El consumo de agua durante todo el ciclo de cultivo de una lechuga es de aproximadamente 37,5 litros. Fertilización: cuatro kg de composta por metro cuadrado al inicio de la siembra o trasplante e incorporación localizada de 50 a 100 gramos (puño) de composta cada dos meses (SAGARPA, 2014).

Cosecha: La lechuga de hoja puede ser cortada siempre que sea suficientemente grande para usarse. Cortar una planta cada dos (dejando una en medio) a nivel del suelo, les da a las otras plantas más espacio para crecer. La lechuga de hoja alcanza su tamaño máximo en 50 días después del trasplante. La madurez está basada en la compactación de la cabeza. Una cabeza compacta es la que requiere de una fuerza manual moderada para ser comprimida, es considerada apta para ser cosechada. Una cabeza muy suelta está inmadura y una muy firme o extremadamente dura es considerada sobre madura. Las cabezas inmaduras y maduras tienen mucho mejor sabor que las sobre maduras y también tienen menos problemas en postcosecha. Para almacenar lechuga, lavar, escurrir el agua, secar y poner en una bolsa plástica en el refrigerador. La lechuga se guarda mejor a 0°C y con alta humedad (96%). Cosecha de semilla: Para la obtención de semilla, dejar que la planta termine su ciclo completo hasta que genere flores y después frutos y cuando estos ya estén secos, recolectar la semilla, esto ocurre aproximadamente a los 190 días después de la siembra (SAGARPA, 2014).

### 2.3.5. Producción Internacional.

La lechuga es principalmente producida en China (13, 500,000 Ton), India (6,1 millones de Ton), Rusia (2,7 millones de Ton) y Japón (2,2 millones de Ton), La cosecha mundial de lechuga, alcanza anualmente 24,9 millones de Ton, México es el 9º productor mundial de esta hortaliza, de los más de 100 países que cultivan este producto con 1,5% del volumen total (SAGARPA, 2016).

Estados Unidos es el principal comprador de lechuga mexicana: anualmente adquiere 136 mil Ton (Figura 1).

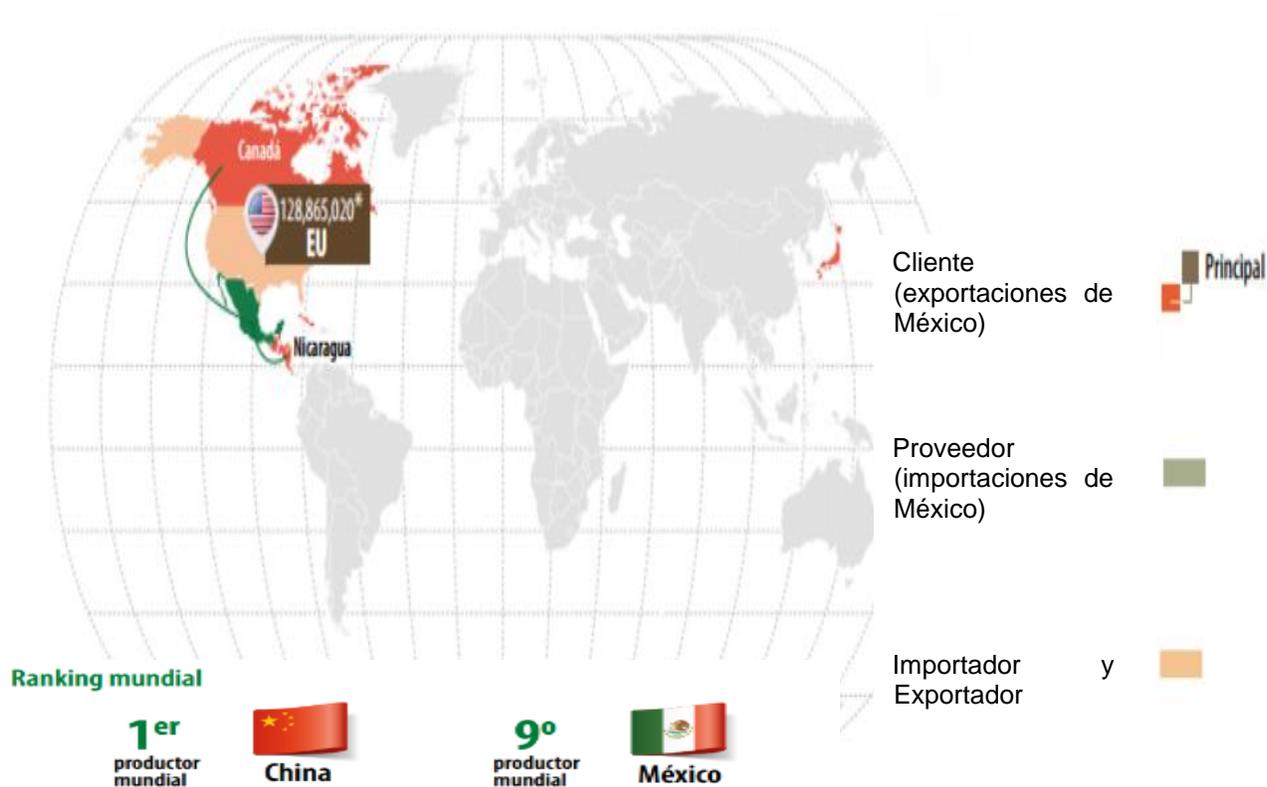


Figura 1. Principales países importadores y exportadores de lechuga mexicana.

(SAGARPA, 2016).

### 2.3.6. Producción Nacional.

La superficie sembrada y los rendimientos de la hortaliza continúan aumentando, lo cual determinó en 2015 una producción superior en 7,6% con respecto a la producción de 2006 (Figura 2).

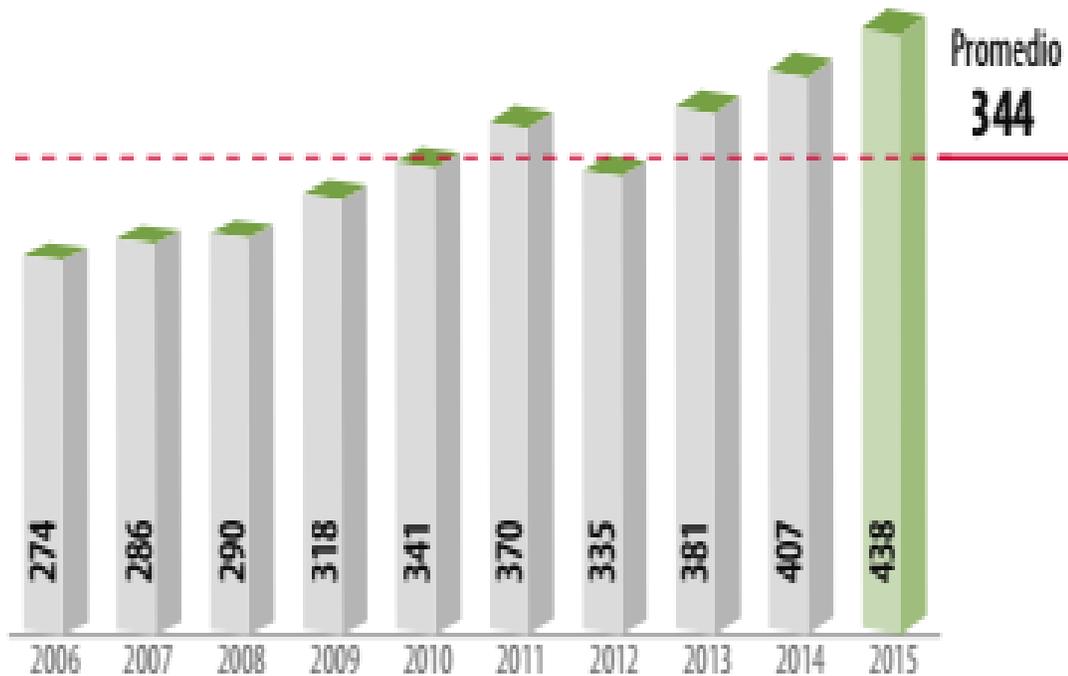


Figura 2. Volumen de la producción nacional 2006-2015 (miles de Ton).

(SAGARPA, 2016).

Guanajuato se posiciona como líder indiscutible con 26% del volumen nacional y un valor de cosecha de 313 millones de pesos, seguido por Zacatecas, Baja California, Puebla, Aguascalientes, Querétaro, Michoacán, Estado de México, Tlaxcala y San Luis Potosí (Figura 3).

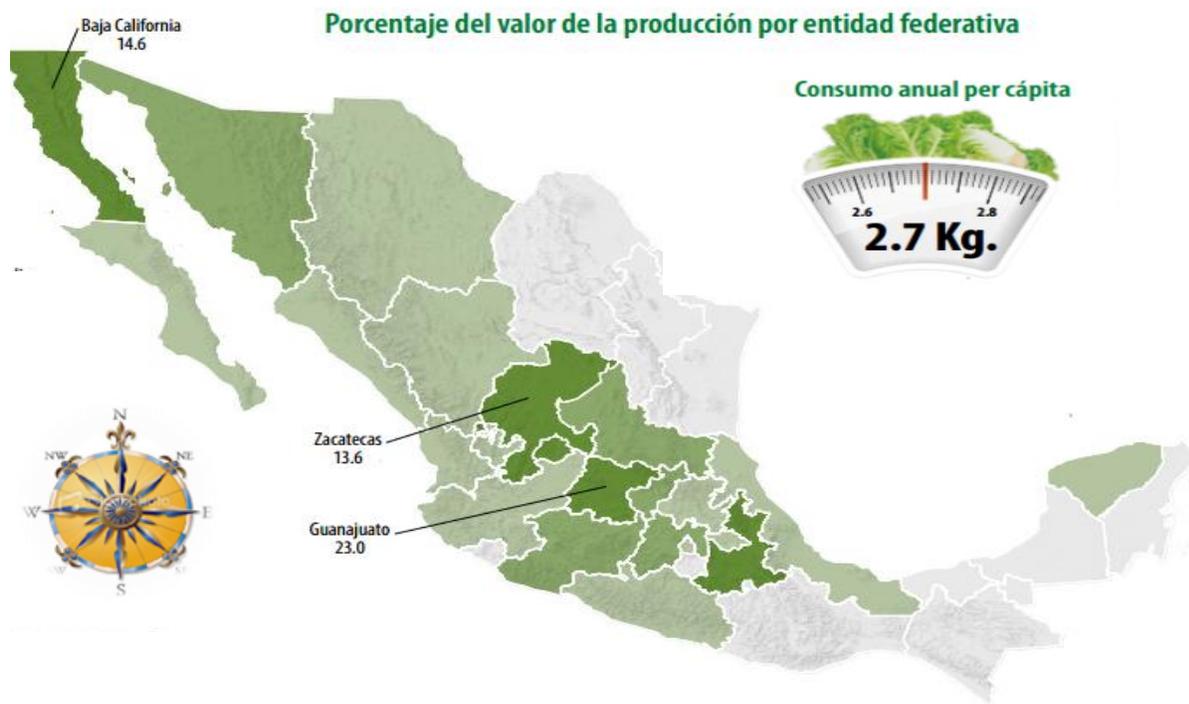


Figura 3. Volumen de producción de las principales entidades productoras.  
(SAGARPA, 2016).

Debido a las características geográficas para la producción de lechuga (altitud de 800 a 2,500 msnm, lluvia 1,000 a 1,400 mm, temperatura 12 a 21 °C, suelos ligeros de textura franca, migajónarcillolimoso o migajón-arenoso y pH de 6,0 – 6,8) Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Nayarit presentan condiciones óptimas que pueden ser aprovechadas para cultivar la lechuga (Figura 4).



Figura 4. Estados con potencial productivo de lechuga (SAGARPA, 2016).

### 2.3.7. Contaminación microbiológica.

Los alimentos de consumo crudo, como la lechuga, presentan un mayor riesgo de ser vehículos para bacterias enteropatógenas, pues no existe una etapa de procesamiento posterior a la cosecha, que elimine las cargas microbianas iniciales, existen diversos estudios, relacionados con la contaminación microbiológica de esta especie de hoja verde, entre ellos el realizado por Puig *et al*, (2013). Donde se demostró la existencia de *salmonella* spp. los resultados de dicha investigación muestran que las hortalizas analizadas cumplen con los parámetros establecidos por las legislaciones vigentes, sin embargo la existencia de la enterobacteria muestra que las lechugas analizadas no son aptas para consumo humano (Puig *et al.*, 2013).

## **2.4. Cultivo de cilantro (*Coriandrum sativum* L).**

### **2.4.1. Origen.**

El cilantro es una hierba aromática cuyo origen está en Oriente Medio. En la antigüedad se usaba como planta con poder aromático y medicinal. En algunas tumbas de los egipcios se representaba al cilantro como una ofrenda a las personas fallecidas y con la cual se homenajeaba a los muertos. Los romanos lo usaron en brebajes y condimentos alimenticios, actualmente se usa para condimentar numerosos platos de cocina y constituye una hierba muy apreciada junto con otras muchas hierbas que le dan sabor y aroma a nuestros platos (Muñoz, 2002).

### **2.4.2. Clasificación Taxonómica.**

**Taxón:** *Coriandrum sativum* L.

**Género:** *Coriandrum*

**Familia:** Apiaceae

**Subfamilia:** Apioideae

**Tribu:** Coriandreae

Número de registro: 11523

Lugar de publicación: Sp. Pl. 1: 256. 1753

Nombre Verificado en: 20-May-1992 por ARS Systematic Botanists.

Última modificación: 09-may-2011

El sitio de prioridad de especies es: Estación PI Central Norte Central (NC7)

(NCBI, 2017).

### **2.4.3. Descripción de la planta.**

Es una planta herbácea, de tallos erectos, lisos, cilíndricos, ramificados en la parte superior, alcanza una altura de 40 a 60 cm. El sistema radicular es frágil al principio, pero una vez establecido, provee un buen anclaje y una buena capacidad para la absorción de agua y nutrientes para la planta. Las hojas inferiores son pecioladas, pinnadas, con segmentos ovales, en forma de cuña; las superiores son casi sentadas bi-tripinnadas, con segmentos agudos. Las flores son pequeñas, blancas o ligeramente rosadas, dispuestas en umbelas terminales. El fruto es un diaquenio, globoso, con diez costillas primarias longitudinales y ocho secundarias, constituidas por mericarpios fuertemente unidos de color amarillo marrón; tienen un sabor suave agradable o fuerte picante, contiene dos semillas una por cada aquenio (Muñoz, 2002).

### **2.4.4. Generalidades del cultivo.**

El cilantro (*Coriandrum sativum* L.), es la especie hortícola cultivada por sus hojas y semillas, es un cultivo rentable, tiene un alto potencial de rendimiento, se necesitan de 20 a 25 kg de semilla de buena calidad por una hectárea, para obtener una producción 8,000 kg/ha con un rendimiento de 7,3 a 10 kg/m<sup>2</sup> dependiendo de la experiencia y tecnología del productor (Morales *et al.*, 2011).

En términos generales las necesidades óptimas para el desarrollo y producción del cultivo de cilantro son: temperaturas óptimas del suelo que van desde los 10°C a 24°C, le perjudican los climas demasiado fríos, la distancia entre plantas es de 15 a 20 cm, se siembra preferentemente a principios de la primavera, aunque puede ser sembrado

todo el año. El cilantro se produce mejor en suelos húmedos con buen drenaje (Muñoz, 2002).

Suele florecer a los 40 o 50 días de nacido, las semillas se maduran a los 80 o 100 días de la siembra. Prefiere las condiciones cálidas sobre los 20 °C pero puede prosperar en climas más frescos y soportar heladas ligeras. La planta prefiere alta intensidad lumínica para crecer. Los días largos y cálidos favorecen la germinación temprana. La siembra debe hacerse directa pues el cilantro no se repone bien al trasplante, en cuanto al riego se ha demostrado que la producción de hojas o de semillas es mayor cuando se utiliza riego moderado, sin embargo, éste no afecta considerablemente su productividad. Para el control de malezas, las apiáceas tienen una baja capacidad de competencia. Las malezas le restan al cultivo nutrientes del suelo, espacio, agua y luz, por eso es muy importante que el cultivo se encuentre libre de maleza la mayor parte de su crecimiento (Cabrera y Salazar, 2004).

Es un cultivo que requiere poco tiempo para completar su ciclo vegetativo, utiliza pocas cantidades de nitrógeno, fósforo y potasio, además tiene una gran capacidad de adaptación a los suelos, incluso a los más secos, pero prefiere el suelo permeable, con un pH próximo a 7 (neutro), bien drenado, profundo, fresco y suelto. No tolera los suelos arcillosos, fríos y las humedades excesivas tampoco le son en absoluto beneficiosas (Smith, 2007).

El consumo de cilantro a nivel mundial ha ido aumentando en los últimos años, se usa principalmente para consumo en fresco o como condimento, también es usado en la medicina cuando hay debilidad estomacal o de las vías digestivas. Por otra parte en la

industria de alimentos se usa para dar sabor a las confituras, licores, a los alimentos enlatados, además es ampliamente usado en la elaboración de embutidos, también lo usan por sus efectos bactericidas y/o fungicidas o para la extracción de aceites (Muñoz, 2002).

Actualmente se considera que el cultivo de cilantro es una de las especies de mayores implicaciones económicas, con un buen rendimiento, tiene un precio considerado a nivel internacional. Se calcula que las especias mueven alrededor de US\$ 6,000 millones en el mercado mundial y que el sector está creciendo entre un 5 y 6 % por año. Por lo que es necesario que el producto sea de buena calidad, pero sobre todo que se encuentre libre de microorganismos que afecten la salud del consumidor con la finalidad de que el sector siga creciendo (Ordoñez, 2010).

#### **2.4.5. Producción Internacional.**

Para 2010, Rusia fue el principal productor de cilantro en el mundo, con una participación de 22%, le sigue India con 20%; Marruecos 18%; México ocupa el cuarto lugar con un 15%, seguido de Rumania con 10%, Argentina 8%, Irán 5% y Pakistán con 2% (Figura 5).

### Principales países productores del cultivo de cilantro

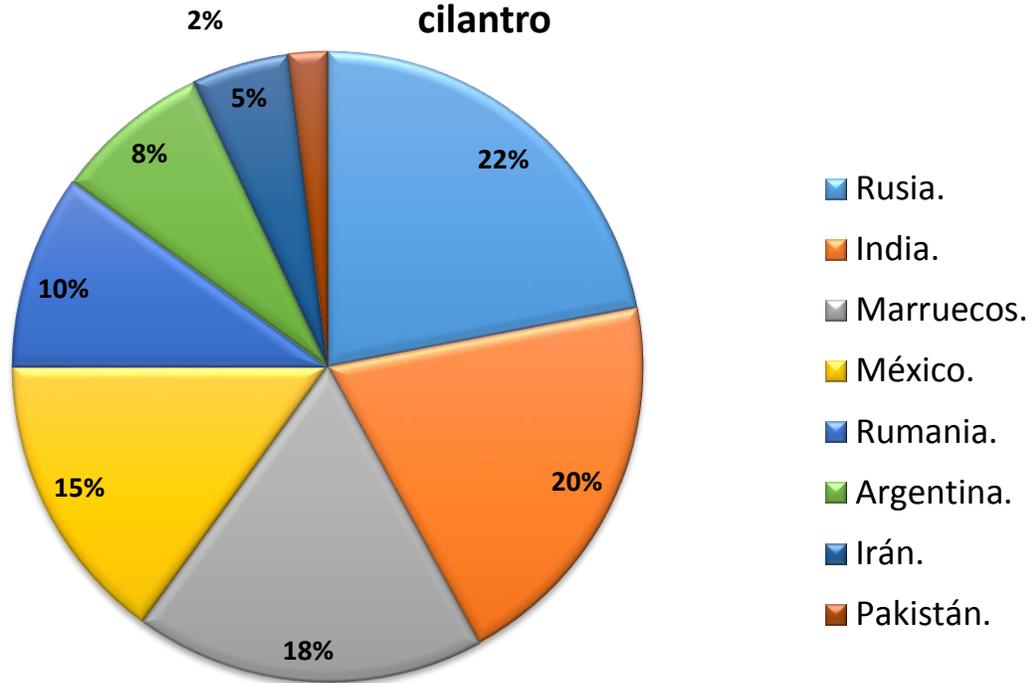


Figura 5. Principales países productores del cultivo de cilantro. (SAGARPA / SENASICA, 2014).

En cuanto a las importaciones Alemania ocupa el primer sitio con 35% a nivel mundial, Estados Unidos tiene el segundo lugar con 30% le sigue Sri Lanka con 20% y Japón con un 15% de la producción mundial (Figura 6).

### Principales países importadores del cultivo de cilantro

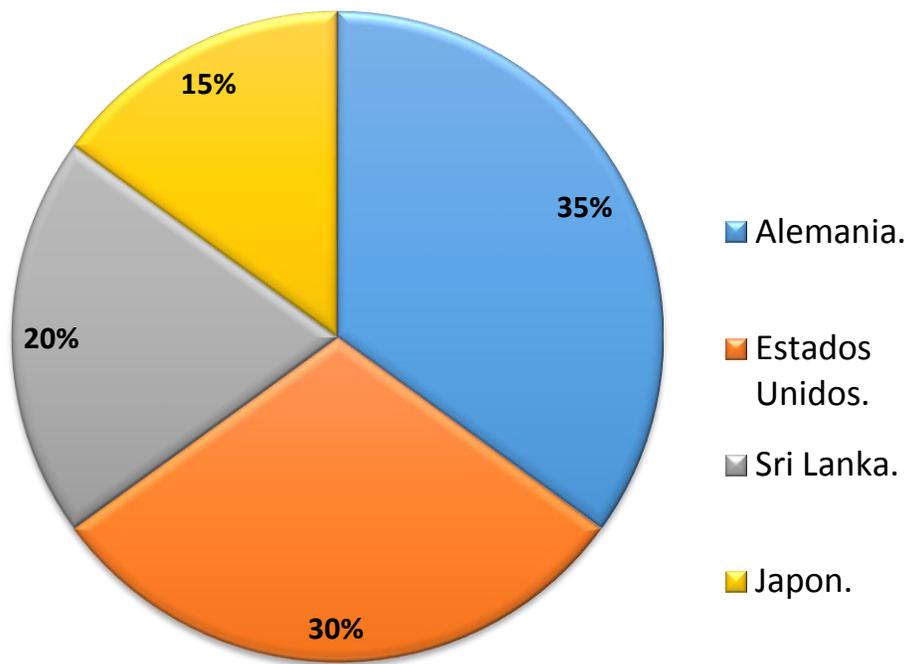


Figura 6. Principales países importadores del cultivo de cilantro.  
(SAGARPA / SENASICA, 2014).

Con respecto a las figuras 5 y 6, puede observarse que Rusia y la India son los principales productores del cultivo de cilantro, México solo produce el 15% de cilantro a nivel mundial y es considerado como exportador de este cultivo teniendo como principal mercado a los Estados Unidos, por lo cual es de gran importancia mejorar la calidad e inocuidad del cilantro durante toda la cadena de producción, para que esto permita incrementar el mercado de exportación. Por otra parte, Alemania y Estados Unidos ocupan los primeros lugares como países importadores de este cultivo (SAGARPA / SENASICA, 2014).

#### 2.4.6. Producción Nacional.

En la República Mexicana se produce cilantro durante todo el año, sin embargo, durante los primeros meses (primavera), es cuando se genera la máxima producción nacional, siendo el Estado de Puebla el mayor productor y es quien abastece al mercado nacional y la mitad del norteamericano (SIAP/SAGARPA, 2014).

Durante 2014, se produjeron en toda la República Mexicana 27, 223,34 Ton de cilantro, siendo el principal productor el Estado de Puebla, cuya producción representó el 45,0% del total nacional, el segundo lugar lo obtuvo, Baja California con 15,0%, siguen en la lista los Estados de Sonora, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco y México con 12%, 10%, 8%, 6%, y 4% respectivamente. Las zonas productoras del cilantro de mayor importancia a lo largo del territorio nacional se encuentran en la zona central, occidente y la zona noroeste (Figura 7).



Figura 7. Productores del cultivo de cilantro en México (SIAP/SAGARPA, 2014).

#### **2.4.7. Producción Estatal.**

El Estado de México no es considerado dentro de los principales productores del cultivo de cilantro, sin embargo, produce aproximadamente 825,92 toneladas de cilantro anualmente, gran parte de esta producción va a parar a los mercados internacionales, principalmente norteamericanos (SIAP/SAGARPA, 2014).

#### **2.4.8. Contaminación microbiológica del cilantro.**

En agosto de 2013, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América. Publicó en su página actualizaciones sobre un brote por la posible contaminación involucrando a una mezcla de ensalada propiedad de la empresa Taylor Farms de México, S. de R.L. de C.V., El análisis preliminar de los resultados de la investigación, realizada a un grupo de personas que comieron en un restaurante de Texas, no mostró una relación con la empresa Taylor Farms de México (Raj *et al.*, 2005). Sin embargo, la investigación sigue en curso. Actualmente, el CDC está colaborando con el Departamento de Salud, Servicios Humanos y los Departamentos Públicos de Salud para investigar casos de Ciclosporiosis, reportados entre personas registradas como enfermas en el estado de Texas (Raj *et al.*, 2005).

### **2.5. Cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L).**

#### **2.5.1. Origen.**

La espinaca es originaria de las regiones asiáticas principalmente de Persia, fue introducida a España por los árabes en el Siglo XI y posteriormente comenzó a

difundirse por Europa donde se establecieron cultivos para su explotación, principalmente en Holanda, Inglaterra y Francia para posteriormente cultivarse en otros países y aun más tarde en América (Borrego y Josep, 2002).

### **2.5.2. Clasificación taxonómica.**

**Taxón:** *Spinacia oleracea* L.

**Género:** *Spinacia*

**Familia:** Chenopodiaceae

**Subfamilia:** Chenopodioideae

**Tribu:** Anserineae

Número de modelo: 35256

Lugar de publicación: Sp. Pl. 2: 1027. 1753

Nombre Verificado el: 11-Mar-2004 por ARS Systematic Botanists.

Última modificación: 11-Mar-2004

El sitio de prioridad de especies es: Estación PI Central Norte Central (NC7)

Adhesiones: 615 en Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas

(NCBI, 2017).

### **2.5.3. Descripción de la planta.**

La espinaca es una planta anual, su raíz es pivotante, poco ramificada de desarrollo superficial; es de tallo erecto de 30 cm a 1 m, en el que se sitúan las flores, de hojas caulíferas, más o menos alternas y pecioladas, de forma y consistencia muy variables, en función de la variedad. Peciolo cóncavo y a menudo rojo en su base, con longitud variable, que va disminuyendo poco a poco a medida que soporta las hojas de más

reciente formación y va desapareciendo en las hojas que se sitúan en la parte más alta del tallo (Arias *et al.*, 2010).

Existen plantas masculinas, femeninas e incluso hermafroditas que se diferencian fácilmente, ya que las femeninas poseen mayor número de hojas basales, tardan más en desarrollar la semilla y por ello son más productivas. Las flores masculinas, agrupadas en números de 6-12 en las espigas terminales o axilares presentan color verde y están formadas por un perianto con 4-5 pétalos y 4 estambres. Las flores femeninas se reúnen en glomérulos axilares y están formadas por un perianto tetradentado, con ovarios uniovulares, estilo único y estigma dividido en 3-5 segmentos (Jiménez *et al.*, 2010).

#### **2.5.4. Generalidades del cultivo.**

Las necesidades óptimas para el desarrollo y producción del cultivo de espinaca son: temperaturas mínimas de 3°C a 8°C, máximas de 20°C a 23°C, óptimas de 18°C y una humedad relativa de 60% a 80 % (Gile *et al.*, 2009).

Las condiciones de iluminación y temperatura influyen decisivamente sobre la duración del estado de “roseta”. Al alargarse los días (más de 14 horas de luz diurna) y al superar los 15°C de temperatura, las plantas pasan de la fase vegetativa (roseta) a la de “elevación” y producción (emisión de tallo y flores) (Morales, 2010). La producción se reduce si el calor es excesivo y a lo largo del fotoperiodo, dado que las plantas pertenecen en la fase de roseta muy poco tiempo, con lo que se alcanza un crecimiento adecuado (Gorini, 2009).

Es una especie bastante exigente en cuanto a suelo y prefiere terrenos fértiles, de buena estructura física y de reacción química equilibrada. Por lo tanto, el terreno debe ser fértil, profundo, bien drenado, de consistencia media, ligeramente suelto, rico en materia orgánica y nitrógeno, del que la espinaca es muy exigente. No debe secarse muy fácilmente, ni permitir el estancamiento de agua. En suelos ácidos con pH inferior a 6,5, se desarrolla mal, a pH ligeramente alcalino se produce el enrojecimiento del peciolo y a pH muy elevado es muy susceptible a la clorosis (Gorini, 2009).

#### **2.5.5. Producción Internacional.**

La producción de espinaca en el año 2012. Se distribuyó de la siguiente manera: China fue el principal productor de espinaca en el mundo, con una participación de 68%, le sigue Estados Unidos con 12%; Japón y Turquía con 10%, Indonesia, Irán, Pakistán y Francia con 5%; República de Corea, Bélgica, Alemania, Italia, España, Kenia y Grecia con 3% y Bangladesh, Egipto, Perú, Países bajos, Túnez y México con tan solo 2% de participación en la producción (Figura 8).

## Principales Países productores de espinaca

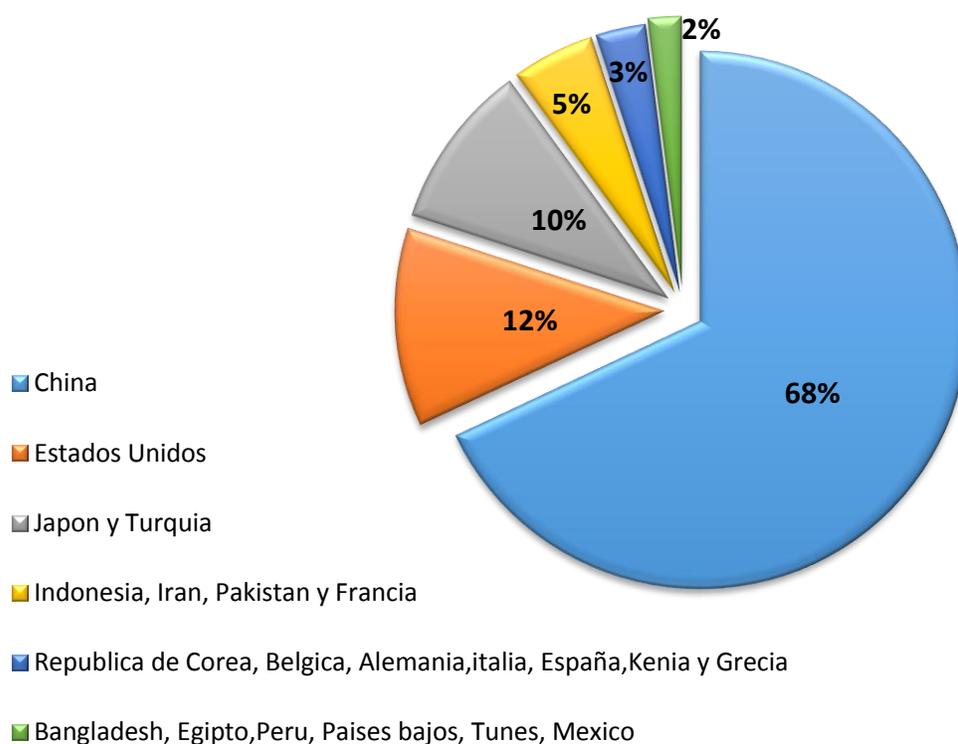


Figura 8. Principales países productores de espinaca (SIAP/SAGARPA, 2014).

En exportaciones mundiales, China ocupa el primer sitio, con 37% del volumen de exportaciones mundiales de espinaca; Bélgica tiene el segundo lugar con 20%; y España en tercer lugar, con 18% del total mundial (Figura 9).

## Paises exportadores de espinaca en el mundo

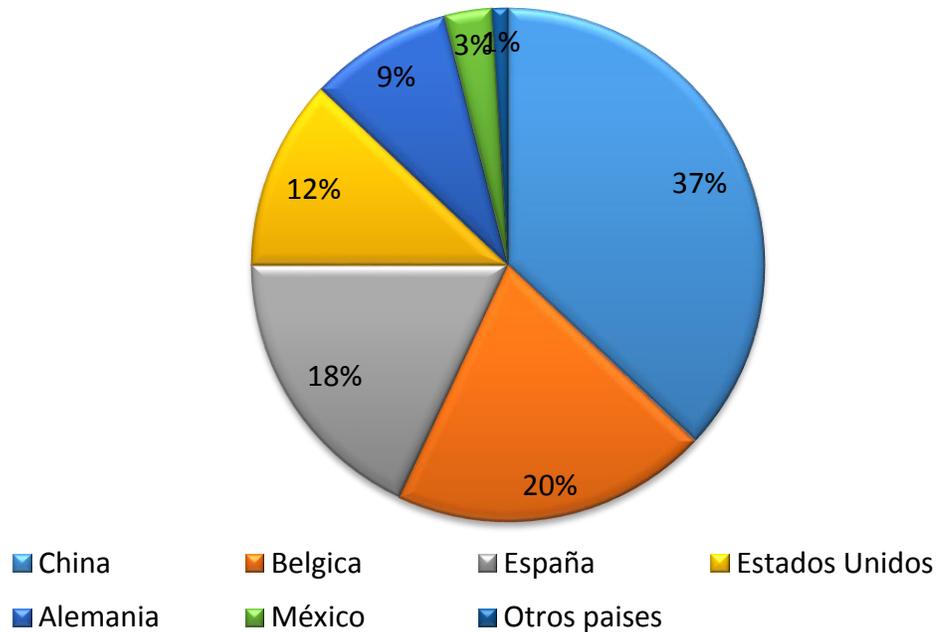


Figura 9. Principales países exportadores del cultivo de espinaca.

(SIAP/SAGARPA, 2014).

Con respecto a las figuras 8 y 9, puede observarse que México solo produce el 3% de espinaca a nivel mundial, pero se coloca dentro de los 10 principales países exportadores de éste producto, por lo cual es de gran importancia mejorar la calidad e inocuidad de la espinaca, para que esto permita incrementar el mercado de exportación.

### 2.5.6. Producción Nacional.

Durante el año 2013, se produjeron en todo México 20,417,12 Ton de espinaca, siendo el principal productor el Estado de Baja California, cuya producción representa el 28% del total nacional, el segundo lugar, Puebla y México con 23%, tercer lugar, Guanajuato

con 7%, cuarto lugar, Tlaxcala con 6%. Siguen en la lista Aguascalientes con 4%, Querétaro con 3%, Sinaloa con 2% e Hidalgo con un 1%. Regionalmente, a todo lo largo del territorio nacional se distribuye la producción de espinaca, sin embargo las zonas productoras de mayor importancia son la zona noroeste y la zona centro (Figura 10).



Figura 10. Principales Estados productores de espinaca en México.

(SIAP/SAGARPA, 2013).

### **2.5.7. Producción Estatal.**

El Estado de México es considerado dentro de los principales productores de espinaca pues produce aproximadamente 4, 576,25 Ton anualmente (SIAP/SAGARPA, 2013).

### **2.5.8. Contaminación microbiológica de la espinaca.**

La espinaca es una especie hortícola de hoja verde cuyo consumo principalmente es en crudo teniendo en cuenta que los vegetales que se consumen crudos o mínimamente procesados se pueden contaminar durante la producción y constituir una vía de transmisión de parásitos y bacterias patógenas para el hombre, se considera importante determinar la calidad microbiológica de hortalizas como la espinaca ya que comprender la complejidad del problema es el primer paso para lograr una alta calidad en los productos hortícolas. Al nivel actual de la tecnología no es posible eliminar el riesgo en forma total, ejemplo de ello son las investigaciones realizadas por Luna (2006), quien reportó la presencia de *E. coli* y *Listeria* spp., en muestras de espinaca, por lo que hay que establecer medidas para reducirlo. Es preferible, más efectivo y económico prevenir la contaminación microbiana en las frutas y hortalizas que eliminarla una vez que tiene lugar (Luna, 2006).

### **2.6. Inocuidad Alimentaria.**

La inocuidad implica la ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas y cualquier otra sustancia que pueda hacer nocivo al alimento para la salud (Morón y Dárdano, 2001).

## **2.7. Definición de peligro.**

Es una propiedad biológica, química o física que puede determinar que el alimento deje de ser inocuo (OPS-OMS, 2013).

### **2.7.1. Tipos de peligros.**

#### **a) Peligros biológicos.**

Son aquellos causados por microorganismos patógenos, bacterias, virus y parásitos que pueden ocasionar enfermedades a los humanos (OIRSA-VIFINEX, 2002). Algunos de los patógenos microbiológicos asociados con las frutas y hortalizas frescas son *Salmonella* spp., *Shigella* spp. cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, virus análogos al de Norwalk, virus de la Hepatitis A y parásitos tales como *Ciclospora*. Algunos de estos patógenos están asociados al entorno agrícola, mientras que otros pueden proceder de trabajadores infectados o agua contaminada (OMS-FAO, 2007). Algunos reportes indican que los patógenos de humanos tienen la habilidad de internarse en los tejidos de las frutas y hortalizas (Bartz y Showalter, 1981; Ibarra-Sánchez *et al.*, 2004; Raj *et al.*, 2005); esta habilidad de los microorganismos podría representar un riesgo para la salud humana.

#### **b) Peligros químicos.**

Un peligro químico se considera como la posibilidad de que el producto alimenticio se contamine con cualquier compuesto o elemento químico durante cualquier etapa de la cadena productiva y que, al entrar al organismo, ya sea ingerido, inhalado o por vía cutánea, sea un peligro para la salud. Existen peligros químicos naturales como son las

toxinas producidas por hongos, que principalmente se llegan a desarrollar en los cereales o frutos secos. También se consideran peligros químicos los metales pesados como plomo, arsénico, mercurio y cadmio que se pueden encontrar en los terrenos de cultivo y el agua; así como sanitizantes y agentes de limpieza utilizados en el proceso productivo, aceites y lubricantes utilizados en la maquina o equipo de cosecha y empaque, plaguicidas, antibióticos y hormonas aplicadas a los cultivos (OIRSA, 2002).

### **c) Peligros físicos.**

Los peligros físicos son materiales extraños al alimento, como astillas de vidrio, grapas, pedazos de madera, piedras, tornillos, entre otros; que de alguna forma pueden llegar al producto (llevados por los trabajadores, provenientes del equipo o del material de empaque) (OIRSA, 2002).

## **2.8. Riesgo en inocuidad.**

El riesgo en inocuidad es la estimación de la probabilidad que un agente contaminante, presente en un alimento, cause daño a la salud humana (FDA/USDA, 1998). Los riesgos tan solo sugieren por lo que no debería hacerse (Osuna *et al.*, 2011). Los factores que influyen en la presencia de riesgos de contaminación en los procesos productivos de alimentos son (Osuna *et al.*, 2011):

- ⚠ Almacenamiento inadecuado de materia prima y producto terminado.
- ⚠ Malos hábitos de higiene y de procesos de los manipuladores.
- ⚠ Malas condiciones de las instalaciones físicas de la empresa.
- ⚠ Equipos inadecuados, deficientes, faltos de mantenimiento.

- ⚠ Instalaciones sanitarias inadecuadas o deficientes.
- ⚠ Inexistencia de facilidades para limpieza y desinfección obligatoria.
- ⚠ Mal manejo de residuos sólidos y líquidos.
- ⚠ Inadecuado control de plagas.
- ⚠ Falta de capacitación y técnicas

## **2.9. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).**

Son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos y/o agua que contengan: bacterias, virus, parásitos, toxinas y/o sustancias tóxicas (INTI, 2003) en cantidades suficientes para afectar la salud o vida del consumidor.

## **2.10. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).**

Conjunto de medidas higiénico-sanitarias mínimas que se realizan en el sitio de producción primaria de vegetales, para asegurar que se minimiza la posibilidad de contaminación física, química y biológica de un vegetal o producto fresco (LFSV, 2007).

Las BPA incluyen métodos de cultivo, cosecha, selección, almacenamiento transporte etc. de los productos agrícola, desarrolladas y aplicadas para asegurar su buena condición sanitaria, mediante la reducción de los peligros de contaminación biológica, química y física (SAGARPA/SENASICA, 2006).

Las Buenas Prácticas Agrícolas combinan una serie de tecnologías y técnicas destinadas a obtener productos frescos, saludables, de calidad superior, con altos rendimientos económicos, haciendo énfasis en el manejo integrado de plagas y

enfermedades, conservando los recursos naturales y el medio ambiente, minimizando los riesgos para la salud humana (Villalobos, 2003).

### **2.11. Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).**

Las BPM son el conjunto de procedimientos, condiciones, y controles que se aplican en las plantas de empaque, las cuales incluyen limpieza y desinfección del equipo, utensilios, instalaciones físicas y sanitarias, así como higiene y salud del personal antes y durante dichos procesos con el objetivo de disminuir los riesgos de contaminación de los productos empacados (SAGARPA/SENASICA, 2006).

### **2.12. Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).**

Sistema preventivo, que antes de basarse en el análisis del producto final, requiere que el control se realice en los puntos identificados como críticos es decir donde podría ocasionarse algún riesgo, a lo largo de todo el proceso de elaboración del producto, siendo por ello mucho más efectivo para garantizar la inocuidad, y puede ser utilizado por todos los sectores productivos, incluyendo el alimentario. Su aplicación entre otras ventajas, facilita las labores de inspección y control durante los procesos (COVENIN, 2002).

### **2.13. Sistema de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC).**

Conjunto de elementos, métodos y herramientas eficaces, diseñadas y aplicadas bajo condiciones naturales de producción y/o manejo de un alimento, con la finalidad de reducir las probabilidades de que un contaminante de origen biológico, químico y/o

físico se posicione sobre este y comprometa la salud de quien lo consume (Osuna *et al.*, 2011).

## **2.14. Métodos más utilizados para el análisis microbiológico de los alimentos.**

Los principales métodos utilizados para identificar y contar la presencia de microorganismos son:

### **2.14.1. Recuento en placa.**

Es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias en un alimento (Cano, 2006).

El método más utilizado para el conteo de microorganismos presentes en un alimento una ventaja importante de esta técnica es que mide el número de células viables, se requiere por lo general 24 horas para que se formen colonias visibles. Esta técnica no detecta a todos los microorganismos presentes, pero si las más significativas para la calidad del alimento, por ejemplo, a los Mesófilos Aerobios que son un indicador general de la población que puede estar presente en una determinada muestra (Rojas *et al.*, 2006).

Se basa en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra

bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar colonias (Camacho *et al.*, 2009).

Las bacterias son un organismo unicelular capaz de reproducirse por sí mismo por bipartición (meiosis) y cuya velocidad de crecimiento depende de las condiciones del medio en que se encuentre. Estas condiciones son: temperatura, acidez, oxígeno y nutrientes. Estas condiciones son de interés sanitario debido a que se encuentran en el medio y su presencia en alimentos es frecuente (Bravo, 2004).

#### **2.14.2. Método del número más probable.**

Es un cálculo estadístico del número de células viables. Se basa en la determinación de presencia o ausencias de un determinado tipo de microorganismo (Cano, 2006).

#### **2.14.3. Técnicas de reducción de colorantes.**

Para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora. Está basado en el uso de colorantes que pasan por un proceso de reducción (Cano, 2006).

#### **2.14.4. Recuento microscópico directo.**

Tanto para células viables como para las no viables y se prepara en portaobjetos corrientes o especiales, se tiñen con un colorante adecuado y se cuentan las células (Rugama y Castillo, 2010).

## **2.15. Principales microorganismos indicadores de contaminación microbiológica en los alimentos.**

### **2.15.1. Microorganismos Mesófilos Aerobios.**

Son todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30°C, pero pueden hacerlo en rangos bien amplios de temperaturas inferiores y mayores a los 30°C. Todas las bacterias patógenicas de origen alimenticio son mesófilas.

Esta determinación nos indica el grado de contaminación de una muestra y las condiciones que han favorecido o reducido la carga microbiana. También es un indicador de calidad sanitaria del alimento, se utiliza para monitorear la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura. Se lleva a cabo a partir de diluciones decimales de la muestra, que se inoculan en placas vertidas en Agar Cuenta Estándar. Las placas se inoculan en condiciones de aerobiosis, a una temperatura de 35 °C durante 24 a 48 h. Es importante aplicar las reglas de la NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa (Moreno *et al.*, 2014).

### **2.15.2. Grupo Coliformes.**

Las bacterias coliformes constituyen un grupo heterogéneo de amplia diversidad en términos de género y especie. Pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y agrupa los géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Forman parte de la microbiota normal aerobia del intestino, por lo general no provocan enfermedades, incluso contribuyen al mantenimiento de la salud.

La mayoría de las definiciones de bacterias coliformes están basadas en sus características bioquímicas comunes. Los Métodos Estándar, describen a los miembros del grupo de bacterias coliformes como:

- Todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas Gram negativas y algunas Gram positivas no formadoras de esporas, de morfología bacilar que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas luego de una incubación durante 48 h a 35°C.
- Todas las bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas Gram negativas, no formadoras de esporas, bacilares, que desarrollan colonias rojas con brillo metálico cuando se incuban por 24 h a 35°C.

Este grupo se subdivide en dos subgrupos: Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF), este último está compuesto fundamentalmente por *Escherichia coli* (EC) (90%) y algunas especies de los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter* (Hildebrand, 1996). La definición de miembros del grupo coliforme se ha ampliado para incluir a bacterias que poseen otras características, tales como la reacción  $\beta$ -D galactosidasa positiva (reacción enzima-sustrato) (APHA, 1998).

## **2.16. Organismos relacionados con la Inocuidad Agroalimentaria.**

### **2.16.1. *Escherichia coli*.**

*Escherichia coli* se describió por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich. Fue nombrada inicialmente como "*Bacterium coli commune*", pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor (Kaper, 2005).

Los representantes de esta especie son bacilos Gram negativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1,1-1,5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2,0-6,0  $\mu\text{m}$  de largo. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos peritricos o no móviles (Scheutz *et al.*, 2005).

*E. coli* forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (TGI) del ser humano, otros mamíferos y las aves y constituye una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización.

*Escherichia coli* se considera el microorganismo indicador de contaminación fecal por excelencia (Edberg *et al.*, 2000). Sin embargo, es necesario tomar en consideración que, aunque *E. coli* se ha considerado el indicador de contaminación fecal, dentro de la especie se han descrito grupos patógenos capaces de causar enfermedades intestinales y extraintestinales en el ser humano y los animales, que no se tienen en cuenta cuando se realizan análisis de calidad microbiológica (Ishii y Sadowski, 2008).

Se distinguen dos grandes grupos de *E. coli* patógenas según el tipo de infección que provocan. Un primer grupo está constituido por las cepas de *Escherichia coli* responsables de infecciones extraintestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal) y un segundo grupo constituido por cepas patógenas intestinales, responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales.

Dentro del segundo grupo se han realizado diferentes clasificaciones. Una de las más utilizadas es la que toma en consideración sus factores de virulencia y patogénesis. Según esta clasificación, se distinguen seis grupos diferentes: *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli*

enteropatógenas (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (ADEC) (Rodríguez, 2002; Kaper *et al.*, 2005).

Es importante destacar que en una revisión de dicha nomenclatura se propuso la creación de un nuevo grupo que estaría formado por las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC, de sus siglas en inglés), también conocidas como *E. coli* productoras de verotoxinas. Este grupo englobaría al grupo de las EHEC y algunos serotipos que no poseen los factores de virulencia necesarios para causar patógenesis, aunque sí son capaces de producir las toxinas Shiga (Rodríguez, 2002).

#### **2.16.2. *Salmonella* spp.**

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*). Fermentan glucosa, maltosa y manitol, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. Son generalmente catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitratos a nitritos. Son viables en diferentes condiciones ambientales, sobreviven a la refrigeración y congelación y mueren por calentamiento (mayor a los 70 °C) (Elmer, 2000).

La *Salmonella* es un género bacteriano importante que causa uno de los formularios más comunes de la intoxicación alimentaria por todo el mundo. A lo largo de la historia la fiebre tifoidea - causada por Tifus serovar *enterica de las Salmonelas*- accionó la conexión entre esta enfermedad y contaminó eventual la comida o las bebidas, al ser una bacteria enteropatógena, esta es transmitida por contaminación cruzada proveniente de los intestinos de los animales de sangre caliente, esta es depositada

mediante las heces, las vías de transferencia pueden ser mediante suelo, aire, agua, herramientas, personas que puedan estar en contacto con la materia fecal.

Las frutas y hortalizas contaminadas con *salmonella*, suponen un grave problema de salud nivel mundial, sin embargo, el principal punto de control debe ser el manejo desde la siembra hasta el consumo de los alimentos (Elmer, 2000).

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie entérica, que comprende la mayoría de los serotipos con subespecie *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Caffer-Teragno, 2000).

### **2.16.3. *Listeria monocytogenes*.**

Es una bacteria Gram positiva y catalasa positiva, anaerobia facultativa, no esporógena, con forma de bacilos cortos, a veces cocoides. Su tamaño consiste entre 0,5 a 2 micras de largo por 0,5 micras de ancho. Este microorganismo presenta como particularidad una motilidad tipo “tumbling” a los 20 – 25 °C pero es inmóvil a los 35°C (Forsythe, 2003).

Es un microorganismo psicótrofo y su rango de crecimiento oscila entre 0°C a 45°C siendo las condiciones óptimas entre 30°C y 37°C. Puede crecer a niveles de pH entre 4,4 y 9,4.

Es una bacteria oportunista. Puede multiplicarse fuera del huésped aún con bajas exigencias en cuanto a nutrientes. Comparada con otras bacterias patógenas que no producen esporas y que son transmitidas por los alimentos, *Listeria monocytogenes* presenta la particularidad de resistir distintas condiciones de estrés como congelación,

secado, acidez y frío, pudiéndose adaptar a éstas mediante la producción de biofilms, (Koch y Stark, 2006).

Se conocen seis especies del género *Listeria* de las cuales *L. innocua* y *L. grayi* se consideran no patógenas, mientras *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* raramente causan infección en humanos. De esta manera *L. monocytogenes* permanece como la especie más importante, destacándose además su capacidad de producir  $\beta$ -hemólisis en agar sangre (Forsythe, 2003).

### **2.18. Pruebas Bioquímicas para Enterobacterias.**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Robles, 2009).

La forma usual de detectar una enzima se basa en el principio de que, si está presente, utiliza un sustrato determinado que ha sido puesto adrede en el medio de cultivo o en una prueba bioquímica determinada. Los productos resultantes de la acción enzimática se detecta a través de indicadores de pH o por el apareamiento de pigmentos que hacen virar el color del medio.

### **a. Serotipificación.**

Uno de los sistemas más frecuentemente utilizados en la clasificación intraespecífica de las bacterias patógenas es el serotipado, este sistema se basa en la detección de tres antígenos celulares, el antígeno somático designado como antígeno O, que forma parte de la estructura del lipopolisacárido, el antígeno flagelar, designado como antígeno H, que forma parte del flagelo bacteriano de las cepas móviles y el antígeno K, presente en aquellas bacterias que poseen cápsula. La serotipificación constituye una herramienta muy valiosa que en combinación con otros métodos puede ayudar a la identificación de cepas patógenas de esta especie (Kaper, 2005; Scheutz y Strockbine, 2005).

En la actualidad se han descrito un total de 174 antígenos O y 55 antígenos H. Los últimos descritos fueron el O181 y el H56. No obstante continúa la descripción de nuevos antígenos, que aún no se han sido incorporados a esta nomenclatura (DebRoy *et al.*, 2011).

### **III. OBJETIVOS.**

#### **3.1. GENERAL.**

Determinar la contaminación de origen microbiológico en muestras del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L), cilantro (*Coriandrum sativum* L) y espinaca (*Spinacia oleracea* L), producidos en tres municipios del Estado de México.

#### **3.2. ESPECÍFICOS.**

Para cumplir con el objetivo general se establecieron los siguientes objetivos específicos.

- ❖ Identificar las UFC/mL de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Fecales presentes en las muestras de hortaliza, suelo y agua de riego.
- ❖ Cuantificar las UFC/mL de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Fecales presentes en las muestras de hortaliza, suelo y agua de riego.
- ❖ Identificar las cepas de Coliformes Fecales presentes en las muestras mediante análisis bioquímicos y serológicos.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

La calidad microbiológica de los cultivos de lechuga, espinaca y cilantro sembrados en Tenango del Valle, Toluca de Lerdo y Calimaya, Estado de México, puede encontrarse dentro de los límites permitidos por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994.

## V. JUSTIFICACIÓN.

El cultivo de hortalizas se ha incrementado notablemente en producción y demanda a nivel nacional y mundial en los últimos años. Este incremento debe estar asociado con la calidad del producto, por lo que es imprescindible ofrecer al consumidor un producto inocuo. El surgimiento de medidas tales como las relacionadas con la inocuidad de los alimentos, es una nueva barrera que enfrentaran los productores de frutas y hortalizas en nuestro país. Para superar esta barrera es necesaria la implementación de metodologías que contribuyan en el aseguramiento de la inocuidad de los productos del campo y lograr así mantener la competitividad de frutas y hortalizas en el mercado. Para producir alimentos seguros o de bajo riesgo para el humano es esencial poseer información veraz y reproducible que permita desarrollar programas destinados a eliminar los peligros microbianos y de toxicidad por plaguicidas asociados al consumo de vegetales mínimamente procesados. Sin embargo, en México la información al respecto es muy limitada o nula (Rosas *et al.*, 2006). No se cuenta con suficiente información sobre la incidencia de enfermedades asociadas al consumo de ensaladas crudas, ni del comportamiento de microorganismos patógenos de importancia en los vegetales; además se sabe muy poco sobre la frecuencia de bacterias patógenas en ensaladas de verduras listas para su consumo (Fernández, 2000). Esta información es indispensable ya que con base en ella es posible desarrollar medidas objetivas tendientes a disminuir o controlar las enfermedades por verduras. Aunque limitados, se tienen algunos reportes de la presencia *Salmonella* y *E. coli* en diferentes verduras que se expenden en mercados públicos de las ciudades México (Rosas *et al.*, 2006) Sin embargo, en atención a la forma como se cultivan, cosechan, transportan y

comercializan las verduras, es de esperarse la presencia de microorganismos patógenos en ellas. Por ello se pretende determinar la cantidad de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales presentes en muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L), cilantro (*Coriandrum sativum* L) y espinaca (*Spinacia oleracea* L), producidos en tres municipios del Estado de México.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1. Muestreo.**

Para el análisis microbiológico se colectaron muestras de cilantro (variedad Hércules), de lechuga (variedad Romana) y de espinaca (variedad Vikingo), durante la etapa de cosecha del ciclo 2015, el muestreo se realizó en tres municipios del Estado de México (Tenango del Valle, Toluca de Lerdo y Calimaya), siendo estas las localidades con mayor superficie de siembra de hortalizas para consumo en fresco. Las parcelas muestreadas contaban con una superficie sembrada de 500 m<sup>2</sup>, las muestras fueron tomadas de forma aleatoria siguiendo un patrón de zig-zag, para cubrir toda la superficie del terreno; se analizaron un total de 180 muestras, teniendo 60 muestras por hortaliza. Se colectaron 10 muestras, por cada una de las parcelas comerciales (dos por municipio). Se recolectaron 10 mL de agua de riego de los cultivos, mientras que para el análisis de suelo se tomó una muestra compuesta del suelo de cada una de las parcelas, usando el muestreo 5 de oros tratando de cubrir toda la superficie de siembra (Figura 11).

## Estado de México

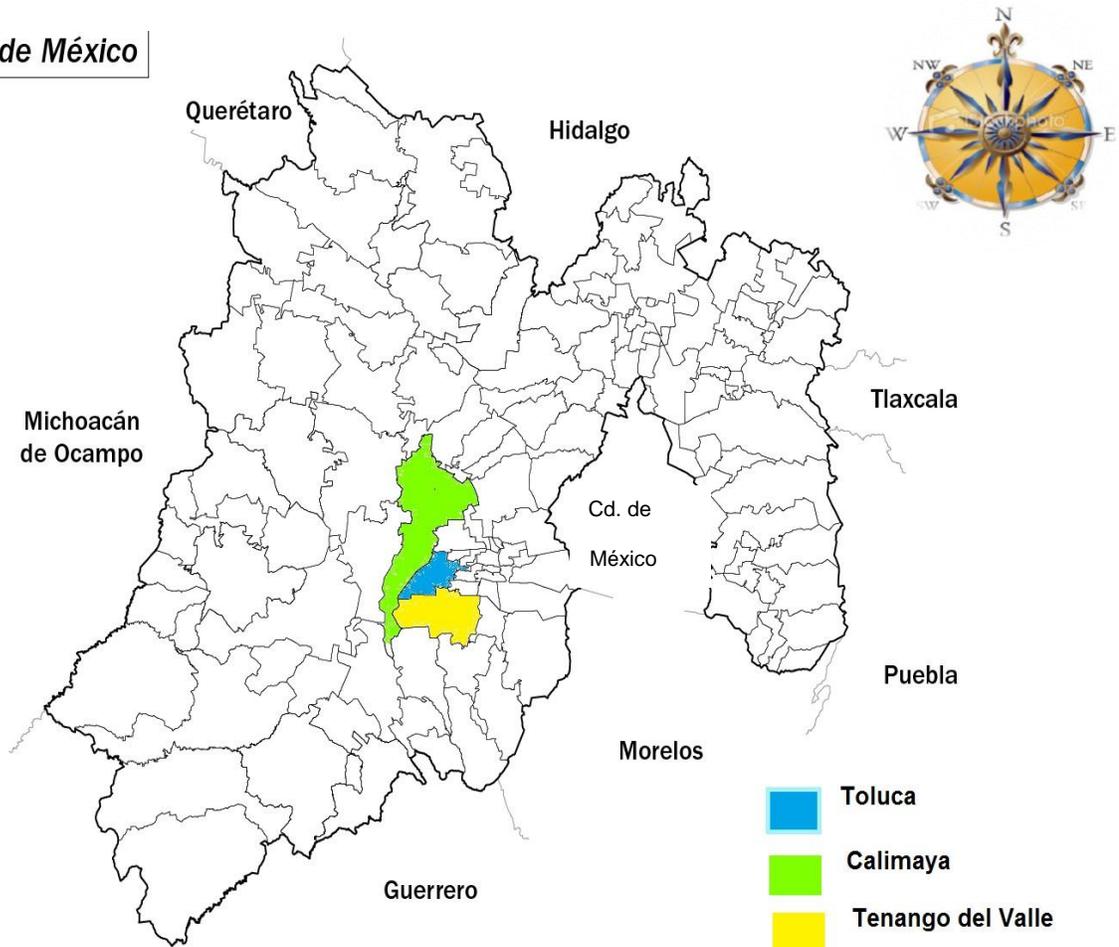


Figura 11. Mapa de ubicación de los Municipios del Estado de México donde se realizó el experimento Fuente: Propia del proyecto.

### 6.2. Ubicación geográfica de los municipios estudiados.

Las características geográficas de los tres municipios de estudio se indican en el

Cuadro 1.

Cuadro 1. Ubicación geográfica de los municipios.

<b>Municipio</b>	<b>altitud m.s.n.m</b>	<b>latitud norte</b>	<b>longitud oeste</b>
<b>Toluca</b>	2680	19° 16' 41.1''	99° 39' 23.1''
<b>Calimaya</b>	2,600	19° 10' 25"	99° 37' 02"
<b>Tenango del Valle</b>	2.600	18° 39' 7''	99° 31' 37''

Fuente: SIAP/SAGRPA, 2014.

### **6.3. Tamaño de la muestra.**

El tamaño de muestras se determinó en función las parcelas seleccionadas, las cuales tuvieron una superficie de 500 m<sup>2</sup>, por lo que se decidió recolectar 10 muestras de cada hortaliza.

### **6.4. Manejo de muestras.**

Las muestras fueron transportadas en condiciones de refrigeración, en una hielera al Laboratorio de Calidad de los Productos Agropecuarios de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Se colectó una muestra compuesta de suelo de cada uno de las parcelas, dicha muestra fue obtenida de distintas partes de las camas de siembra y una muestra de agua de riego, obtenida de los pozos de almacenamiento de agua. De la misma forma fueron rotulados y transportados de forma individual.

Todo el material fue recolectado y transportado como lo señala la NOM-109-SSA11994 Bienes y servicios. Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

### **6.5. Preparación de las muestras para el análisis microbiológico.**

Estas se procesaron conforme lo indica el método microbiológico regido por la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

Se pesó asépticamente 1 g de cada muestra vegetal homogenizada con 9 mL de agua peptonada salina estéril (0,1% peptona + 0,85% NaCl), 1 mL de éste se agregó a tubos con 9 mL de agua peptonada (dilución primaria), a partir de esta se prepararon diluciones decimales seriadas, ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). Las muestras de suelo fueron procesadas de la misma manera. Mientras que las muestras de agua, fueron sembradas de manera directa en los medios de cultivo correspondientes.

### **6.6. Siembra y Determinación de Bacterias Mesófilas Aerobias.**

Una vez preparadas las diluciones de las muestras, se procedió a determinar MA, de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994, empleándose la técnica de vertido en placa. Para ello se tomó una alícuota de 1 mL de cada dilución y se colocó en el centro de una caja Petri estéril. Posteriormente se agregó el Agar para Cuenta Estándar (marca BD BIOXON®), se incubaron por 48 h a  $35 \pm 2$  °C. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron todas las colonias, siguiendo los lineamientos de esta misma norma, los resultados fueron reportados en UFC/mL de cada hortaliza.

### **6.7. Siembra y Determinación de Coliformes Totales y Fecales.**

Para la siembra de bacterias Coliformes Totales y Coliformes Fecales, se utilizó el medio Agar Rojo Violeta Bilis Lactosa (RBVA). Sembrándose por duplicado cada una de las

muestras, incubando a temperaturas y tiempos diferentes, para Coliformes Totales fue a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas y para Coliformes Fecales a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

La determinación del número total de Coliformes Totales y Fecales se realizó siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994.

Los datos obtenidos de los análisis microbiológicos en la hortaliza, agua y suelo, fueron el resultado del conteo de microorganismos presentes en las cajas petri sembradas, utilizando el método de cuanta total en placa, reportándose en UFC/mL, tal como lo establece, la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. “Método para la cuenta de microorganismos Coliformes Totales en placa”.

Para Mesófilos Aerobios la norma marca que se deben contar todas aquellas cajas que se encontraron en el intervalo de 25 y 250 UFC/mL. Sin embargo, para este trabajo se contabilizaron todas aquellas cajas que presentaron una carga bacteriana, no considerando aquellas que tuvieron un crecimiento extendido.

Debido a la presencia de Coliformes Fecales, se realizaron análisis para la identificación presuntiva de enterobacterias.

### **6.8. Pruebas Bioquímicas y de identificación de las enterobacterias.**

Se realizó la tinción de Gram para observar si las cepas correspondían al grupo de las bacterias Gram Positivas o Gram Negativas (Escartín, 2000).

Las colonias obtenidas, fueron resembradas en Agares específicos para *E.coli*; *Escherichia coli* 0157:H7. (marca DIBICO®) y Agar de Eosina y Azul de Metileno (marca BD BIOXON®); para *Salmonella*: Agar Salmonella y Shigella (marca BD BIOXON®), Verde Brillante (marca BD BIOXON®) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (marca DIBICO®).

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Donde la identificación a nivel de especie de las cepas presuntivas se determinó mediante la realización de una batería de pruebas bioquímicas específicas en tubo (Thampuran *et al.*, 2005), que incluyen producción de Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato, TSI, Hidrolisis de la Urea, Descarboxilación de Lisina, Arginina y Ornitina, Motilidad, Fermentación de Glucosa (Farmer, 2003; Forbes *et al.*, 1998).

El análisis se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Secretaría de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se realizó según el procedimiento descrito por Orskov y Orskov (1984). Se emplearon sueros específicos anti-O y anti-H. Las reacciones de aglutinación se efectuaron en microplacas de 96 pozos de fondo en forma de “u” (COSTAR). Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen la bacteria se desarrolló un esquema de serotipificación que consistió en someter a la muestra a una prueba con 96 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para detectar diferencias entre localidades se utilizó un diseño experimental completamente al azar y un análisis de varianza (ANDEVA) para localidades y una prueba de Tukey ( $p \leq 95\%$ ) con el programa Stat Graphics plus 5,0, 1999-2000. Los datos de los microorganismos analizados (MA, CT y CF) se reportaron en UFC/mL, y se compararon con los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos por la NOM-093- SSA1-1994. Para MA el LMP debe ser  $\leq 150000$  UFC/mL, para CF, la muestra no debe exceder de 100 UFC/mL, esta NOM no contempla CT, sin embargo, en este estudio se consideró como indicador de calidad.

## VIII. RESULTADOS.

Como resultado de esta investigación se envió un artículo científico que lleva por nombre **Calidad microbiológico de tres hortalizas de hoja verde producidas en el Valle de Toluca**, A la revista **Ciencia e Investigación Agraria** de la Facultad de Agronomía e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Indexada a OCLC, LATINDEX, SciELO, y Scopus. El cual se encuentra en revisión.



**REVISTA CIENCIA E INVESTIGACION AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA E INGENIERIA FORESTAL**  
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE**

Vicuña Mackenna 4860 (Campus San Joaquín)

Casilla 306, Santiago 22, Chile

Teléfonos: (562) 2354 4154 –2354 1653

E-mail: [rcia@uc.cl](mailto:rcia@uc.cl)



---

Santiago, Chile January 17, 2017

Dr.  
Ana Tarín Gutierrez Ibañez  
Facultad de Ciencias Agrícolas  
Universidad Autónoma del Estado de México  
México

Dear Dr. Tarín Gutierrez Ibañez,

Through this we inform you that your article "Calidad microbiológica del cultivo de tres hortalizas de hoja verde producidas en el Valle de Toluca.", authors Itzel Rojas Puebla, Ana Tarín Gutiérrez Ibañez, Jesús Ricardo Sánchez Pale, Luz Raquel Bernal Martínez, Gisela Velázquez Garduño, Carlos Alberto Eslava Campos, has been received through our website.

Best regards,

Valentina Lopresti Fuenzalida

Managing Editor

Ciencia e Investigación Agraria

## **Calidad microbiológica del cultivo de tres hortalizas de hoja verde producidas en el Valle de Toluca.**

**Rojas Puebla Itzel<sup>1,\*</sup>, Gutiérrez Ibáñez Ana Tarín<sup>2</sup>, Sánchez Pale Jesús Ricardo<sup>2</sup>, Bernal Martínez Luz Raquel<sup>2</sup>, Velázquez Garduño Gisela<sup>3</sup>, Eslava Campos Carlos Alberto<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Estudiante de postgrado de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales <sup>Universidad</sup> **Autónoma del Estado de México** Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Universitario “El Cerrillo” Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo de México C.P. 50200, México. <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrícolas **Universidad Autónoma del Estado de México** Campus Universitario “El Cerrillo” Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km. 15 entronque al Cerrillo Toluca, Edo de México C.P. 50200, México. Tel +52 1(722) 2965518, 2965529. 2965531 Ext. 192. e-mail: atarini@uaemex.mx \* **Universidad Autónoma de México** <sup>3</sup>**Universidad Tecnológica del Valle de Toluca**, Santa María Atarasquillo, Lerma, México. <sup>4</sup> Unidad de hemato Oncología e investigación, **Hospital Infantil de México. “Federico Gómez/Facultad de Medicina UNAM**. Dr. Márquez 162, col. De los Doctores, C.P 06720, Ciudad de México.

### **Resumen**

**Rojas, P. I<sup>1,\*</sup>, Gutiérrez, I. A. T.<sup>2</sup>, Sánchez, P. J. R.<sup>2</sup>, Bernal, M. L. R.<sup>2</sup>, Velázquez, G. G.<sup>3</sup>, Eslava C. C. A.<sup>4</sup> 2016. Calidad microbiológica del cultivo de tres hortalizas de hoja verde producidas en el Valle de Toluca. Cien. Inv. Agr.** La creciente preocupación de los consumidores por mantener una dieta sana y equilibrada, ha hecho que el consumo de hortalizas frescas aumente. Al mismo tiempo han incrementado los problemas de salud de los consumidores debido a la contaminación de alimentos por bacterias enteropatógenas, siendo las hortalizas, para consumo en fresco, las que presentan mayores posibilidades de convertirse en vehículos de microorganismos patógenos. Debido a la importancia de las hortalizas como fuente de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la calidad de origen microbiológico de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L), cilantro (*Coriandrum sativum* L) y espinaca (*Spinacia oleracea* L), producidos en Calimaya, Toluca y Tenango del Valle, Estado de México. Los estudios se realizaron durante el proceso de cosecha del ciclo 2015., se determinó la cantidad de Mesófilos Aerobios (MA), Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF) presentes en 180 muestras de hortalizas, seis muestras de agua de riego y seis de suelo de cultivo. Se utilizaron las metodologías establecidas en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y la Normatividad de la Organización Nacional Francesa para la Estandarización (AFNOR) NF V08-60. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y un análisis de varianza (ANDEVA) para localidades y una prueba de Tukey ( $p \leq 95\%$ ).

Los resultados obtenidos arrojan que para las muestras de hortalizas, el nivel de microorganismos MA, CT y CF, se encontraron dentro de los límites máximos permisibles por las NOM, aunque existió presencia de bacterias CF en las hortalizas, por lo que se realizó un análisis confirmativo mediante una resiembra en medios selectivos y una comprobación bioquímica y serológica, confirmando la presencia de bacterias del género *Escherichia coli* del Serotipo O105 ab flagelar. Los análisis de agua de riego de la lechuga cultivada en el municipio de Calimaya sobrepasaron los límites de CF 112 UFC/mL.

**Palabras clave:** calidad-microbiológica, ETA, hortaliza, serotipificación

## Introducción

El consumo en fresco de frutas y hortalizas se ha incrementado en las últimas décadas, sobretudo en la comida rápida y conveniente, siendo estos productos los responsables de una amplia incidencia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), estos pueden contaminarse en cualquier punto de la cadena productiva, desde el cultivo, cosecha, procesamiento, distribución y preparación final (Lynch *et al.*, 2007).

Los productos hortofrutícolas asociados con más frecuencia a ETA, incluyen productos como: lechuga, espinaca, germinados, tomates, bayas y melón cantaloupe, mientras que los agentes etiológicos más comunes son virus: Norovirus y Hepatitis A y bacterias: *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Olaimat y Holley, 2012).

Luna (2006), reportó la presencia de *E. coli* y *Listeria* spp. , en muestras de espinaca. En el 2010 se detectaron cerca de 5,000 casos por intoxicación bacteriana, asociada al consumo de cilantro y otras hortalizas mínimamente procesadas, consumidas en fresco sin especificar el patógeno. Así mismo se reporta que la microflora de los vegetales varía ampliamente y refleja las condiciones sanitarias con las que es establecido el cultivo (Raj *et al.*,2005). Barrantes *et al.* (2010), reportaron la presencia de bacterias enteropatógenas como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* spp., en el cultivo de lechuga. Puig *et al.* (2013), indicaron la presencia de *E. coli* en espinaca.

La Food and Drug Administration (FDA) en 2015, lanzó un comunicado que menciona el cierre de la frontera de exportación México-Estados Unidos, al existir brotes de *salmonella* ocasionados por consumo de cilantro fresco mexicano, La causa de dichos brotes fue provocada por heces humanas, depositadas a las orillas de los terrenos de cultivo (FDA,2015).

La calidad microbiológica de las hortalizas se puede ver alterada por diferentes fuentes de contaminación, encontrándose entre estas el agua de riego y suelos de cultivo contaminados, malas

prácticas agrícolas y recolecciones inadecuadas (Orozco *et al.*, 2008). Todo lo anterior tiene un fuerte impacto en la salud de los consumidores ya que la presencia de agentes enteropatógenos representa un riesgo a contraer una ETA, el objetivo de esta investigación fue determinar la contaminación de origen microbiológico presente en muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), cilantro (*Coriandrum sativum*) y espinaca (*Spinacia oleracea*), producidos en Calimaya, Toluca y Tenango del Valle Estado de México.

### Metodología

Para el análisis microbiológico se colectaron muestras de cilantro (variedad Hércules), lechuga (variedad Romana) y espinaca (variedad Vikingo), durante el ciclo de cultivo 2015, el muestreo se realizó en tres municipios del Estado de México (Tenango del Valle, Toluca de Lerdo y Calimaya) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica de los municipios.

Municipio	altitud m.s.n.m	latitud norte	longitud oeste
Toluca	2680	19° 16' 41.1''	99° 39' 23.1''
Calimaya	2,600	19° 10' 25"	99° 37' 02"
Tenango del Valle	2.600	18° 39' 7''	99° 31' 37''

Fuente: SIAP/SAGRPA, 2014

Siendo estas las localidades con mayor superficie de siembra de hortalizas para consumo en fresco. Las parcelas muestreadas contaban con un área de 500 m<sup>2</sup>, las muestras fueron tomadas

de forma aleatoria a plantas desarrolladas, siguiendo un patrón de zig-zag, cubriendo toda la superficie del terreno; se analizaron un total de 180 muestras: 60 muestras por hortaliza, 10 muestras, por cada parcela comercial (2 por municipio). Se colectaron 10 mL de agua de riego de cada parcela, para el análisis de suelo se tomó una muestra compuesta de cada una de las parcelas, utilizando el muestreo de 5 de oros tratando de cubrir toda la superficie de siembra a una profundidad de 20 cm.

Los análisis microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio de Calidad de los Productos Agropecuarios, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Todas las muestras fueron recolectadas y transportadas como lo señala la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 Bienes y Servicios “Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”. Estas se procesaron conforme lo indica el método microbiológico regido por la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”. Se tomaron como microorganismos indicadores: MA, CT y CF. Para la determinación de MA, se siguió la metodología descrita en la NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. La determinación de CT se efectuó acorde a la NOM-113-SSA1-1994 y para CF se utilizó la norma NF V08-60 (1996) de la Organización Nacional Francesa para la Estandarización (AFNOR).

Se pesó asépticamente 1 g de cada muestra vegetal homogenizada con 9 mL de agua peptonada salina estéril (0.1% peptona + 0.85% NaCl), 1 mL de éste se agregó a tubos con 9 mL de agua peptonada (dilución primaria), a partir de esta se prepararon diluciones decimales seriadas, ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). Las muestras de suelo fueron procesadas de la misma manera. Mientras que las muestras de agua, fueron sembradas de manera directa en los medios de cultivo correspondientes.

A partir de las diluciones se determinó MA, de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994, empleándose la técnica de vertido en placa. Para ello se tomó una alícuota de 1mL de cada dilución y se colocó en el centro de una caja Petri estéril. Posteriormente se agregó el Agar para Cuenta Estándar (BD BIOXON®), las muestras homogenizadas se incubaron por 48 h a  $35 \pm 2$  °C. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron todas las colonias, siguiendo los lineamientos de esta misma norma, los resultados fueron reportados en UFC/mL de cada hortaliza.

Para la determinación de CT y CF, se utilizó Agar Rojo Violeta Bilis Lactosa, las cajas se incubaron a temperaturas diferentes, para CT  $35 \pm 2$  °C durante 48 h y CF  $45 \pm 2$  °C durante 24 h. Posteriormente, se efectuó la lectura y conteo de colonias, todas las muestras se sembraron por duplicado y se incluyó una caja sin inóculo como control negativo.

Debido a la presencia de CF, se realizaron análisis para la identificación presuntiva de enterobacterias. Se realizó la tinción de Gram para observar si las cepas correspondían al grupo de las bacterias Gram Positivas o Gram Negativas (Escartín, 2000), y posteriormente se tomaron 10 colonias de CF y fueron resembradas en agares específicos: para la identificación presuntiva de *E.coli* las colonias se sembraron en Agar *Escherichia coli* 0157:H7 (DIBICO®) y Agar de Eosina y Azul de Metileno (BD BIOXON®), para la identificación de bacterias del género *Salmonella* se utilizó: Agar para *Salmonella* y *Shigella* (BD BIOXON®), Verde Brillante (BD BIOXON®) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (DIBICO®).

Los análisis bioquímicos fueron realizados, en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", se identificó a nivel de especie las cepas presuntivas, mediante la técnica propuesta por Thampuran *et al.* (2005), que incluyen producción de Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato, TSI (Triple Sugar Iron), Hidrolisis de la Urea, Descarboxilación de Lisina, Arginina y Ornitina, Movilidad, Fermentación de Glucosa. (Farmer, 2003; Forbes *et al.*, 1998).

El análisis de Serotipificación fue realizado en el Laboratorio de microbiología de la Secretaría de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El procedimiento a seguir fue el descrito por Orskov y Orskov (1984). Se emplearon sueros específicos anti-O y anti-H, las reacciones de aglutinación se efectuaron en microplacas de 96 pozos de fondo en forma de “u” (COSTAR). Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen la bacteria se desarrolló un esquema de serotipificación que consistió en someter a la muestra a una prueba con 96 antígenos somáticos (O), 96 flagelares (H). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular Orskov y Orskov (1984).

### **Diseño experimental**

Para detectar diferencias entre localidades se utilizó un diseño experimental completamente al azar y un análisis de varianza (ANDEVA) para localidades y una prueba de Tukey ( $p \leq 95\%$ ) con el programa Stat Graphics plus 5.0, 1999-2000. Los datos de los microorganismos analizados (MA, CT y CF) se reportaron en UFC/mL, y se compararon con los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos por la NOM-093-SSA1-1994. Para MA el LMP debe ser  $\leq 150000$  UFC/mL, para CF, la muestra no debe exceder de 100 UFC/mL, esta NOM no contempla CT, En este estudio se consideró como indicador de calidad.

## Resultados y Discusiones

Derivado del estudio los resultados de la cuenta de MA, CT y CF en hortalizas de hoja verde por municipio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedios obtenidos en los municipios por hortaliza.

Variable	Localidades			<i>P</i>	
	Calimaya	Toluca de Lerdo	Tenango del Valle		
Lechuga	MA	1926	1822	3978	0.7802
	CT	321	1123	1465	0.2862
	CF	94.28	77,50	4,28	0.0542
Espinaca	MA	17996.50	9347.30	37765.10	0.0761
	CT	4578.56	9906.79	8155.69	0.0511
	CF	20.88	2.06	2.59	0.0035
Cilantro	MA	1,700.60	12,286.20	25,585.40	0.0184
	CT	997.78	4,383.23	1,878.56	0.9313
	CF	38.75	20.93	57.82	0.4374

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias sobre Mililitro (medias de 60 muestras analizadas).  
 MA: Mesofilos Aerobios, CT: Coliformes Totales, CF: Coliformes Fecales.

El cuadro anterior muestra que todas las hortalizas se encuentran dentro de los LMP por las NOM, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de CT de lechuga, CF en espinaca, MA cilantro y CF cilantro, entre las hortalizas de cada localidad, con un nivel del 5% de significancia. Los resultados muestran que la lechuga presenta mayor cantidad de UFC/mL de CF, seguido por el cilantro y finalmente la espinaca. En cuanto a calidad microbiológica por municipios cabe mencionar que Tenango del Valle es el municipio que presenta mayor riesgo de incumplir con los Límites permisibles de UFC/mL en sus hortalizas sin embargo, está muy por debajo del límite permisible por las Normas Oficiales Mexicanas que hacen referencia a esta investigación, lo cual coincide con lo analizado por Luna *et al.*, 2006, en su estudio con espinaca detectando Coliformes Fecales, como *Listeria spp.*, Barrantes *et al.*(2011), detectó *Salmonella* en lechuga, así mismo Puig *et al.* (2013), reportaron a *E. coli* en hojas de espinaca, en ambos reportes las muestras analizadas por los autores no excedían los LMP, sin embargo existía presencia de bacterias enteropatógenas, no atribuyen la contaminación al agua o suelo del cultivo. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que al menos para el cultivo de lechuga del Municipio de Calimaya puede atribuirse al agua de riego ya que esta excede las 100 UFC/mL (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultado del análisis microbiológico realizado en muestras de agua de riego

Municipio	Hortaliza	UFC/mL		
		MA	CT	CF
Calimaya	Lechuga	3,321	1,326	112
	Espinaca	19,257	19,257	47
	Cilantro	15,149	1,093	28
Toluca de Lerdo	Lechuga	45,966	1,657	76
	Espinaca	51,548	14,367	57
	Cilantro	4,132	2,245	52
Tenango del Valle	Lechuga	2,256	532	88
	Espinaca	27,764	8,947	97
	Cilantro	30,496	12,008	41

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias sobre Mililitro. MA: Mesofilos Aerobios, CT: Coliformes Totales, CF: Coliformes Fecales.

Para el factor agua, el cultivo de lechuga procedente del municipio de Calimaya excede los LMP por las NOM, por lo que el origen de la contaminación microbiológica de dicha hortaliza de hoja verde sea la más contaminada, sin embargo, cabe señalar que las muestras de suelo analizadas se encuentran dentro de los límites establecidos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultado del análisis microbiológico realizado en muestras de suelo de cultivo

Municipio	Hortaliza	UFC/mL		
		MA	CT	CF
Calimaya	Lechuga	12,231	9,921	55
	Espinaca	16,472	12,465	28
	Cilantro	20,703	1,872	45
Toluca de Lerdo	Lechuga	22,955	892	37
	Espinaca	47,841	9,874	18
	Cilantro	32,194	11,135	85
Tenango del Valle	Lechuga	1,123	242	36
	Espinaca	21,746	5,737	56
	Cilantro	22,372	8,630	32

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias sobre Mililitro. MA: Mesofilos Aerobios, CT: Coliformes Totales, CF: Coliformes Fecales.

Los resultados muestran que al no pasar los LMP, por norma no sería un factor de riesgo para el producto final, sin embargo, la sola presencia de estos microorganismos nos indica que existe un factor que propicia la existencia de estos, pudiendo atribuirse a las malas prácticas agrícolas.

Las colonias bacterianas sometidas a la tinción dan un resultado Gram-.

Los resultados de la confirmación presuntiva de cepas enteropatógenas, utilizando agares específicos se observan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados del crecimiento de las bacterias enteropatógenas sembradas en medios específicos.

<b>Bacteria patógena</b>	<b>Medio de cultivo específico</b>	<b>Resultado</b>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	positivo
	Agar de eosina y azul de metileno	positivo
<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i> y <i>shigella</i>	negativo
	<i>Salmonella</i> y <i>shigella</i>	negativo
<i>Salmonella</i>	Verde brillante	negativo
	Agar xilosa lisina desoxicolato	negativo
<i>Listeria</i>	Medio base Oxford	negativo

Como puede observarse en el cuadro anterior, los resultados dan positivo únicamente para *E. coli* y descarta la posibilidad de estar en presencia de bacterias como *Salmonella*, *shigella* y *Listeria*.

Las pruebas bioquímicas permitieron identificar a las bacterias aisladas como *E. coli*. Estos resultados surgen de la comparación con la Matriz en damero simplificada para la identificación de las bacterias enteropatógenas del Diagnostico microbiológico Koneman (2008) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de resultados de las pruebas bioquímicas y lo establecido por Koneman (2008).

Prueba	Resultado	Koneman	Reacción
Lisina Hierro	+	+	Descarboxilación de la lisina: pico violeta / fondo violeta
Ornitina Indol	+	+/-	Color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el medio.
Movilidad	+	+	Se visualiza turbidez parcial
Citrato	-	-	El medio conserva el color verde original al no cambiar de color se considera como negativo
Ureasa	-	-	No existe producción de urea
Triple Azúcar Hierro	-	-	Pico de flauta ácido, profundidad ácido A/A
Rojo de Metilo	+	+	Existe fermentación de glucosa
Voges Proskauer	-	-	No se produce Acetoina

Las bacterias coliformes encontradas en las hortalizas analizadas, pertenecen al grupo de las bacterias comensales debido a que la prueba de serotipificación, da como resultado la pertenencia al serotipo *E. coli* O105ab flagelar es decir no presenta factores de virulencia por ello no pertenece al grupo de cepas patógenas.

## **Conclusiones**

- Los microorganismos indicadores de contaminación microbiológicas presentes en las hortalizas de hoja verde se encuentran dentro de los límites máximos permisibles establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas.
- Las bacterias encontradas en las muestras pertenecen a *Escherichia coli* serotipo O 105ab Flagelar.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen el apoyo recibido por los productores de las zonas muestreadas, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a la estudiante de posgrado. Al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Al Laboratorio de microbiología del departamento de salud pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El presente trabajo fue financiado a través del proyecto "Calidad Microbiológica de tres Hortalizas producidas en el Estado de México", con número de clave 3791/2014/CID de la Universidad Autónoma del Estado de México

## Referencias

Barrantes K, McCoy C, Achí R. (2010). Detection of Shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. *Braz J Microbiol.*; 41:993-1000.

Escartin, F.E. (2000). *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos* Editorial Universidad Autónoma de Queretaro, México, pp. 520-527.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2007). *Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)*. Roma: FAO, Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias. Dirección de Alimentación y Nutrición.

Farmer, J.J P.Barrone ,E., Jorgen,M Yollun ,R., . *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 1.8<sup>th</sup> ed. ASM Press.Washington,D.C.(2003). *Enterobacteriaceae: Introduction and identification*.Murray, Eds pp. 24-56.

FDA.(2015).<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/BuyStoreServeSafeFood/ucm455941.html>. S.-Mexico Partnership Enhances the Safety of Fresh Cilantro (*Coriandrum sativum*).

Forbes, B; Sahm, D y Weissfield, A. Bailey &Schott's (1998). *Diagnostic Microbiology*. 10<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc. USA,pp 56-58.

Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology* 45(5): 403-404.

Gila. A. (2010) *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* Calidad microbiológica en frutas de conchas comestibles expandidas en mercados populares de los municipios Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. 30(24-28).

Isaacs, S., J. Aramini, B. Ceibin, J. Farrar, R. Ahmed, D. Middleton, M. Howes, E. Chan, A.U. Chandran, L.J. Harris, S. Pichette, K. Campbell, A. Gupta, L.Y. Lior, M. Pearce, C. Clark, F. Rodgers, F. Jameison, I. Brophy y A. Ellis (2005). An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Protection* 68: 191-198.

Koneman Elmer W, Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda, Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. (2008) Woods Koneman. "Diagnóstico microbiológico-texto y atlas en color", Ed. Medica Panamericana, 6° edición.

Luna, G. M. L. y J. J. Luna, M.G. Spencer (2006). *El ABC para la seguridad Alimentaria en los Hogares*. Editorial Educación y Cultura, México, pp 74-77.

Lynch MF Bidol SA, Daly ER, Rickert RE, Hill TA, Taylor Jr TH, (2007) Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants, United States, 2005-2006. *MMWR*. 2007; 56:909-11.

NOM-092-SSA1-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. NOM-092-SSA1-1994. SSA. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. pp 8.

NOM-093-SSA1-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Apendice B. De las especificaciones sanitarias. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.

NOM-109-SSA1-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.

NOM-110-SSA-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA-1994. SSA. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. pp 9.

NOM-113-SSA1-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. NOM-113-SSA1-1994. SSA. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. pp 10.

Olaimat, A.,and R.A. Holley. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiol. 32(1):119.

Orozco, L., R. E. Rico y E. E. Fernández (2008). Microbiological Profile of Greenhouses in a Farm Producing Hydroponic Tomatoes. *Journal of Food Protection* 1: 60-65.

Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. *Meth Microbiol.* (1984); 14 (3):43–112.

Puig. P. Y, Leyva C. V., Rodríguez. S. A., Carrera V., P, L. Molejón, Pérez. M. Y., Dueñas. M. O. (2013). Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*:13(1):111-119.

Raj, B.S., M. Chandra y R. Agarwal (2005). Interaction of *Salmonella* enteritica Subspecies enteritica Serovar Typhimurium and mung bean (*Phaseolus aureus*) plants. *Journal of Food Protection* 68: 476-481.

SAGARPA-SIAP. (2015). Cierre de la producción agrícola Nacional. Disponible en línea:<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. consultado: marzo 2015.

Thampuran, N., Surendraraj, A., Surendran, P. K. J. (2005). “Prevalence and characterization of typical and atypical *Escherichia coli* from fish sold at retail in Cochin, India” *Journal of Food Protection*, 68(10): 2208-11.

## IX. CONCLUSIONES GENERALES.

- Los microorganismos indicadores de contaminación microbiológicas presentes en las hortalizas analizadas se encuentran dentro de los límites máximos permisibles establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas.
- El agua con la que se riega la lechuga del municipio de Calimaya sobrepasa los límites permisibles, pudiendo ser la causa de la contaminación encontrada en la hortaliza
- Las bacterias aisladas en las tres hortalizas analizadas fueron bacilos Gram-Negativos
- Las bacterias encontradas en las muestras pertenecen al género *Escherichia coli*
- La caracterización serológica reporta la presencia del serotipo O 105ab Flagelar, es decir pertenecen a la clasificación de las bacterias comensales.

## **X. BIBLIOGRAFÍA CITADA.**

Adams y Moss. 2006. Food Microbiology. Zaragoza (España). Revista The Royal Society of Chemistry. 67. Pp 156-158.

Anderson, Ma. R. P., 2005. enfermedades de origen alimentario. Su prevención. Ed. España. S. A.pp.57-61.

Anónimo 2010. Global Agricultural Trade System [en línea]. Foreign Agricultural Services-U.S. Dept. of Agriculture. Estados Unidos, pp 27.

Anónimo, 2009. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Tomatoes. Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA-U.S. Dept. of Health and Human Services. Estados Unidos,pp 109-112.

Arias, J. L; Tapia, M.S.; Jiménez, R.A. 2010. El cultivo de la espinaca y su manejo fitosanitario en Colombia. Bogota Colombia: Universidad de Bogota "Jorge Tadeo Lozano". Pp 56.

Arispe, I. y Tapia, M. S. 2007. Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores agroalimentarios [en línea], 13 (Enero-Junio): [fecha de consulta: 07 de mayo de 2012]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=199216580008>

Avendaño B., Rindermann R., Lugo S. y Mungora A., 2006. La Inocuidad Alimentaria en México. " Las hortalizas frescas de exportación ". Baja California/ México: Universidad Autónoma de Baja California.ed. Acribia, S.A.pp 56.

Ávila-Quezada.G.; Sánchez. E.; Muñoz. E.; Martínez. L.; Villalobos. E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. Revista Phytón. 77 pp.129-136.

Barrantes K, McCoy C, Achí R. 2010. Detection of *Shigella* in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. Braz J Microbiol.; 41:993-1000.

Barrera, 2010. Programa Universitario de Alimentos-UNAM. [En línea] <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001311>. consultado el 17 de octubre 2015.

Bartz, J y R. K. Showalter. 1981. Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. Phytopathology 71:515-518.

Borrego, M. y Josep, V., 2002. horticultura herbacea especial. Madrid: S.A. mundi-prensa libros. pp.124-126.

Brandl, M. & Mandrell, R., 2002. Fitness of *Salmonella enterica* Thompson in the cilantro *phyllosphere*. [En línea] consultado en: <http://aem.asm.org/content/68/7/3614.short> , el 8 de Noviembre de 2014.

Bravo.V. A.P. y Ortega. G. J. E. 2004. Determinación de Coloformas Totales y *E coli* en muestras de hortalizas. Revista de la Universidad de la Cuenca, Madrid, España. pp 121-135.

Cabrera, F. A. V. y Salazar, E. I. E. 2004. Produccion de Hortalizas de Clima Cálido. Revista de microbiologia. Colombia.Universidad Nacional de Colombia.pp 45-5

Caffer, M. I.; Teragno, R. 2000." Manual de Procedimientos para la caracterización de *Salmonella*", hospital "Dr. Carlos G. Malbran". Pp 117.

Camacho, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2da. ed. Facultad de Química, UNAM. México [En línea] consultado en: [http://depa.fquim.unam.mx/archivero/Tecnicas-Basicas-Coliformes-enplaca\\_6528.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/archivero/Tecnicas-Basicas-Coliformes-enplaca_6528.pdf)

Camelo, A. F. L. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Del campo al mercado. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. pp 119.132.

Cano, R. S. 2006. Métodos de Análisis Microbiológico. Normas ISO. Available at: <http://WWW.faostat.com/193.43.36.221/site/339/default.aspx>

Carbajal, H. P. C. 1986. El Cultivo de la Espinaca. Revista de horticultura de La Habana Cuba. Ed Pueblo y Educación, pp. 258.

CDC (Center for Disease Control). 2002. Multistate Outbreaks of *Salmonella* Serotype *Poona*. Infections Asociated with Eating Cantaloupe Mexico., United States and Canada. Revista Python ed.13. pp 156-161.

Cerrillo, M. C.; Parrilla. C. J.L.; Vázquez. C. L.; Martínez. N. 2007. *Brotos de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario* Vol. 35. [En línea]: <http://www.ticscalidadenserviciosalimenticios.com.mx/etas/> [Consultado el: 23 de Enero 2015]

CISAN, 2012. Consejo para la Información sobre Seguridad de Alimentos y Nutrición. [En línea] consultado en: [http://cisan.org.ar/sitio\\_test/articulo\\_ampliado.php?id=173&hash=ba844db1cadff8ae52fa6d1c07de5019](http://cisan.org.ar/sitio_test/articulo_ampliado.php?id=173&hash=ba844db1cadff8ae52fa6d1c07de5019), el 02 Diciembre 2015.

CNBI. (The National Center for Biotechnology Information).2016. [En línea] consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . el 02 Diciembre 2015.

Coetsier, C.; Vannuffel, P.; Blondeel, N.; Deneff, J.; Cocito, C.; Gala, J. 2000. Duplex PCR for differential identification of *Microbacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol.* 38:3048-3054. consultado en: <http://www.cristinaarendain.com/2012/02/el-cilantro-la-hierba-mas-utilizada-en-el-mundo>, el 20 Noviembre de 2014.consultado 16 de julio 2016.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 2002. Norma venezolana. Directrices generales para la aplicación del sistema HACCP en el sector alimentario. Caracas: COVENIN. NVC 3802:2002. pp 617-132.

Cruz, G. L.; Campaña, A. C.; Viramontes, S.E.; Báez, S. R. 2010. Una herramienta de comparación de las métricas del tomate y el sistema de gestión SQF 1000, para la producción en invernadero en México [en línea] 2010, 11 (Diciembre): [fecha de consulta: 06 de mayo de 2012]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=81315809002>

D' Aoust, J. Y. 1994. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 13: 207-216.

De Roever, C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. Food Control. Vol 9 pp321-347.

Díaz, T.; Caballero, A.; Díaz, J.; Cardona, M.; Morejón, P.; Sánchez, Y. 2006. Estudio, control y prevención de las ETA: infección e intoxicación por alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Cuba. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 26 pp 95-100.

Douglas, R.C. 2014 Microbiología de las Enterobacterias. Revista de la Universidad Autónoma de Nicaragua. Vol. 18 pp 34-41.

Doyle, M. P., Beucat, L. R., Montville, T. J. 2001. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y fronteras. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España. pp. 799.

Durango, J.; Arrieta, G.; Mattar, S. 2004. Presencia de *Salmonella* spp en un área del Caribe Colombiano: un riesgo para la salud pública. Revista Biomédica. Vol 24. Pp 89-96

Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J. 2000 *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. J. Revista de Microbiología y Bacteriología de la Universidad de Venezuela, Vol.10 pp 106–116.

Elmer W. Koneman 2008- “Diagnóstico microbiológico-texto y atlas en color”, Ed. Medica Panamericana, 6° edición, pp 145-173.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak caused by contaminated natural water supplied by facility owned by local community. Jap. J. Infect. Dis. 2001; 54 (9): 247-248. 143.

Erro, E. 2002. Introducción al Análisis de Puntos Críticos de Control (HACCP). Consultoría & Asesoría. Membership International HACCP Alliance. pp. 1-11.

Escarpilli. Graciela. 2011. Situación de las enfermedades. (En línea), Disponible en: [http://www.amimc.org.mx/revista/2011/31\\_4/situacion.pdf](http://www.amimc.org.mx/revista/2011/31_4/situacion.pdf) [Consultado el: 15 noviembre 2015]

Escartin, F.E. (2000). Microbiología e Inocuidad de los Alimentos Editorial Universidad Autónoma de Queretaro, México, pp. 520-527.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2007. Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Roma: FAO, Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias. Dirección de Alimentación y Nutrición, pp 234-252.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

(HACCP). Roma: FAO, Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias. Dirección de Alimentación y Nutrición.

FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2012. Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. FAOSTAT. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/home/es/> disponible en [Consultado el: 22 de Enero 2015]

FAO/OMS. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud).2004. Evaluación de riesgos de *listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Roma: FAO.Vol. pp 87.

FAO/OMS. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud).2005. Comisión del Codex Alimentarius. Italia: FAO. Taller Nacional sobre las BPM y HACCP en el control de alimentos. Venezuela:

FAO-SENCAMER. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Servicio Autónomo Nacional de Normalización para la Calidad). [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/home/es/> disponible en [Consultado el: 22 de Enero 2015]

Farmer, J.J.P.; Barrone, E.; Jorgen, M, Yollun, R. 2003. Manual of Clinical Microbiology. Vol 1.8<sup>th</sup> ed. ASM Press.Washington,D.C Enterobacteriaceae: Introduction and identification. Murray. pp. 24-56.

FDA (Food and Drug Administration).2015. (en línea). Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/BuyStoreServeSafeFood/ucm455941.html>. (Consultado el 10 de junio de 2016).

FDA. (Food and Drug Administration). 2010. [En línea] Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/BuyStoreServeSafeFood/ucm455941.htm>. (Consultado el 25 de Noviembre de 2015).

FDA/USDA. (Food and Drug Administration/ Department of Agriculture). 1998. Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y vegetales frescos.pp.46-57.

Fein, S. B.; Lin, C. T. y Levy, A. S. 1995. Foodborne illness: percepcion, experience and preventive behaviors in the United States. Journal of Food Protection, 58 (12):1405-1411.

Félix, F. A., Campas B. O., Meza, M. M. Calidad sanitaria de los alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México [en línea] 2005, 6 (Julio-Septiembre): [fecha de consulta: 16 de mayo de 2012]. Disponible en: [http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad\\_sanitaria.htm](http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm)

Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Boletón de la Universidad Autónoma de Querétaro, pp 16-23.

Ferratto, I. A. & Mondino, I. A. M., 2008. Revista Agromensajes. De la facultad de Agricultura. [En línea] consultado en: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/24/4AM24.htm>, el 20 Noviembre 2014.

Flores, T. G., Herrera, Rojas & Antonio, R., 2005. Salud pública Méx. *salud y bienestar*, Sep/Oct., 47(5), pp. 8-9.

Forbes, B; Sahm, D y Weissfield, A. Bailey & Schott's (1998). Diagnostic Microbiology. 10<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc. USA. pp 56-58.

Forsythe y Hayes, 2002. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. Zaragoza (España): ACRIBIA. 12(3): 103-4114.

Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology* 45(5): 403-404.

García, G. W. & Gutiérrez, E. P., 2010. Las enfermedades transmitidas por los alimentos en números. *Inocuidad de los alimentos*. 2(1): 23-26.

García, Ma. J., Povedano, M. Osuna, A., 2012. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales. España: OmniaScience. Pp 403-404.

Gardea, A. G., Higuera, G. y Cuamea, I., 2007. Buenas Prácticas en la producción de alimentos. México: Trillas. 12(3): 134-156

Geldreich, E. E. y Bordner, R.H. 1971. Fecal contamination of fruit and vegetables. A review. J. Milk Food Technol. 45(34):184–195.

Gentry-Weeks, C., Hutcheson, H., Kim, L., Bolte, D., Traub-Dargatz, J., Morley, P. 2002. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. J. Clin Microbiol. 40: 1487-1492.

Gil C, Esté ME, Tapia MS, Carmona A, Emaldi U. Hacia 1. Un programa de promoción del consumo de frutas y verduras en Venezuela. Rev Chil Nutr. 2006; 33 (Suppl 1):306-15.

Gil. A. 2010 Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 'Calidad microbiológica en frutas de conchas comestibles expandidas en mercados populares de los municipios Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. 30(24-28).

Gile, J., Ortegón, C. y Velázquez, P. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 21 (4): 487-492.

Gonzales. L.K. 2016. Microorganismos patógenos en hortalizas y frutas. XIII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jalisco; México.

González, T. y Rojas, R. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud Pública Méx. 47:388-390.

Gorini, F., 2009. La Coltivazione dello Spinacio. Revista española de Microbiologia Ed Agricole Bologna. (4):14.

Hammer, W.C.K. 1999. Situación actual del comercio alimentario, incluidos los problemas relacionados con la calidad e inocuidad de los alimentos. Revista sociedad científica. Chile. 6 (1): 33-36. 141.

Harrison, R. 2004. Importancia de la inocuidad en la seguridad alimentaria. El Salvador: Centre for Food Economics Research, Department of Agricultural and Food Economics, the University of Reading 6 (1):149

Henson, Spencer. 2008. Measuring the impact of technical measures on trade in agricultural commodities. Centre for Food Economics Research, Department of Agricultural and Food Economics, the University of Reading. 3 (7): 33-141

Hernán, R. & Isshiki, M., 2001. El Cultivo de Algunas Hortalizas premisorias en Colombia. Colombia: PRODUMEDIOS. 6 (1):1145

Hernández, Cortez. Cecilia. Aguilera. Arreola. Ma. Guadalupe. Castro.Herrera L., Muñoz J., Medina H. Escherichia coli fecal resistente a antibióticos en niños sanos. Inducción por uso de antibióticos. Rev. Invest. Clin. 2002; 54 (7):108-112. 140.

Hildebrand J.M., Maguire H.C., Holliman R.E., Kangesu E. An outbreak of Escherichia coli O157 infection linked to paddling pools. Commun. Dis. Rep. CDR Rev. 1996; 6 (1): 33-36. 141.

Hornitzky M.A., Mercieca K., Bettelheim K.A., Djordjevic S.P. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shiga* toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. Appl Environ Microbiol. 2005, 71 (5):3405-3412. 142.

Hoshina K., Itagaki A., Seki R., Yamamoto K., Masuda S., Muku T., Okada N.

Hunter P.R. Drinking water and diarrheal disease due to Escherichia coli. J. Water Health. Hosteleria, Restauracion y Catering. Ilustrada ed. España: Acribia, S.A.

Ibarra-Sánchez, L. S., S. Alvarado-Casillas, M. O., Rodríguez-García, N. E., Martínez-Gonzales y A. Castillo. 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. Journal of Food Protection.67:1353-1358.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2002). Microorganisms in foods. (En línea). Disponible en: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), consultado el 30 de Enero de 2016.

ICMSF, 2000. Manual a color para la identificación de Microorganismos de los alimentos. Zaragoza (España): ACRIBIA, S.A.1(3). 234-238.

INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial). 2003. Cuadernillo para unidades de producción. Recomendaciones para la producción de alimentos (1) 7.

Isaacs, S., J. Aramini, B. Ceibin, J. Farrar, R. Ahmed, D. Middleton, M. Howes, E. Chan, A.U. Chandran, L.J. Harris, S. Pichette, K. Campbell, A. Gupta, L.Y. Lior, M. Pearce, C. Clark, F. Rodgers, F. Jameison, I. Brophy y A. Ellis (2005). An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Protection* 68: 191-198.

Ishii S. y Sadowsky M.J. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes Environ.* 2008; 23 (5): 101-108

Jay, J. M., 2002. Microbiología moderna de los alimentos. Informe de evento: Enfermedades transmitidas por alimentos, hasta el período epidemiológico 13 del año 2011. 4ed ed. España: Acribia, S.A.; 2 (3): 10-18

Jimenez, A.L. Arias. L.. Espinosa. L. Fuentes. C. Garzon. R. Gil. N. Niño. M. Rodriguez. S, 2010. Areas cultivadas, zonas productoras (a nivel mundial y nacional). En: El cultivo de la espinaca (*Spinacia oleracea L.*) y su manejo fitosanitario en Colombia. Bogota Colombia: Universidad de Bogota "Jorge Tadeo Lozano", pp. 20-21.

Jiménez. D. F. 2003. Enfermedades del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Ed. Limusa. México, D. F. 102p.

Kaper J.B. 2005; Pathogenic *Escherichia coli*. Int. J. Medical Microbiol. Revista de microbiología Clínica. Washington 295 (1): 355-356. 154.

Koneman Elmer W, Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda, Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. (2008) Woods Koneman. "Diagnóstico microbiológico-texto y atlas en color", Ed. Medica Panamericana, 6° edición.

Kyriakides, C. B. y. A., 2000. *E. Coli*. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.13(27) 35-56.

Lampel, K., Orlandi, P., Kornegay, L. 2000. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. Appl Environ Microbiol. (66):4539-4542.

Luna, G. M. L. y J. J. Luna, M.G. Spencer (2006). El ABC para la seguridad Alimentaria en los Hogares. Editorial Educación y Cultura, México, pp 74-77.

Lynch MF Bidol SA, Daly ER, Rickert RE, Hill TA, Taylor Jr TH, (2007) Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants, United States, 2005-2006. MMWR. 2007; 56:909-11.

Martínez, B., 2004. El manejo Higiénico de los Alimentos. México.Limusa S.A. de C.V. Limusa Noriega Editores. Martínez, F. B, Mexico. Vol 1 : 456

Martinez, K., 2010. promueve SAGARPA siembra de frutas y hortalizas.. [En línea] consultado en: <http://tecnoagro.com.mx/no-61/promueve-sagarpa-siembra-de-frutas-y-hortalizas>, el 15 Noviembre 2014.

Maya y Díaz, L. B. 2004. Mejoramiento de la calidad e inocuidad de las frutas y hortalizas frescas: un enfoque práctico manual para multiplicadores. Ed. Porrúa pp.222.

Michanie, S. 2004. *Listeria monocytogenes*. La bacteria emergente de los 80 [en línea]. [Fecha de consulta: 07 de mayo de 2012]. Disponible en: [http://www.bpm-haccp.com.ar/index\\_archivos/pdf/Listeria-monocytogenes.pdf](http://www.bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Listeria-monocytogenes.pdf)

Morales, I. D. B., 2010. El cultivo de la espinaca "*spinacea oleracea*". tecnoagro, pp. 24-27.

Moreno - Villanueva, J. A., 2014. Salud y buenos alimentos.es. [En línea]. Available at: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001311> consultado el 14 de Marzo de 2016.

Moreno.B; Díez. V; García. I.; Menes. L.; Gutiérrez.M. y Polledo.J.J.F., 2000. Microorganismos de los Alimentos. Zaragoza, España. Ed Acribia, S.A.pp. 87.98.

Morón, C., Dárdano, C. 2001. Importancia del códex Alimentarius en la seguridad alimentaria y en el comercio de los alimentos. Santo Domingo (República Dominicana):

FAO, Proyecto TCP/RLA/0065 “Fortalecimiento de los Comités Nacionales del Códex Alimentarius”.

Muñoz E, Martínez LR, 2002). Villalobos E. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton* (B. Aires). 2008; 77:129-36 Adams y Moss, *Food Microbiology*. Zaragoza (España): The Royal Society of Chemistry.

NOM-092-SSA1-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. NOM-092-SSA1-1994. SSA. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. pp 8.

NOM-093-SSA1-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Apéndice B. De las especificaciones sanitarias. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.

NOM-109-SSA1-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.

NOM-110-SSA-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-113-SSA1-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NOM-113-SSA1-1994. SSA. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. pp 10.

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. 10 pp.

Ochman, H., T. S. Whittam, D. A. Caugant and R. K. Selander. 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure *Escherichia coli* and *Shigella*. J. Gen. Microbiol. 129:2715-2726.

OIRSA. VIFINEX-República de China. 2002. Manual sobre inocuidad en frutas y hortalizas frescas. proyecto regional de fortalecimiento de la vigilancia fitosanitaria en cultivos de exportación no tradicional. San Salvador.

Olaimat, A., and R.A. Holley. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiol. 32(1):119.

Olaizola, A. Ramirez, R.N, Jimenez, S.J. 2006, saludybuenosalimentos.es. [En línea] Available at: Available at: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001311> consultado el 24 de Marzo de 2016.

OMS. 2002. Códex Alimentarius. Frutas y hortalizas frescas. p. 179. Disponible en línea: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003/16851-es.html>, consultado el 23 de junio de 2016.

OMS-FAO. 2007. Códex Alimentarius. Frutas y hortalizas frescas. p. 179. Disponible en línea: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003/16851-es.html>, consultado el 23 de junio de 2016.

OPS-OMS. 2003. Códex Alimentarius y seguridad Alimentaria. En busca de una buena salud. Disponible en línea: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003/16851-es.html>. Consultado el 21 de julio de 2016

Ordoñez, N., 2010. Revista Tecnoagro. Cilantro o Coriandro *Coriandrum sativum* L. [En línea] consultado en: <http://tecnoagro.com.mx/no-60/cilantro-o-coriandro-coriandrum-sativum-l>, el 28 Noviembre de 2014.

Orendain, C., 2012. El cilantro la hierba mas utilizada en el mundo. [En línea] consultado en: <http://www.cristinaorendain.com/2012/02/el-cilantro-la-hierba-mas-> consultado 18 de febrero de 2016.

Orozco, L., R. E. Rico y E. E. Fernández (2008). Microbiological Profile of Greenhouses in a Farm Producing Hydroponic Tomatoes. *Journal of Food Protection* 1: 60-65.

Orskov F, Orskov I...1984 Serotyping of *Escherichia coli*. *Meth Microbiol.Revista Argentina de Microbiologia*. 14 (3):43–112.

Osuna García, J. A., Y. Nolasco González, L. Ortega Navarrete, R. Sánchez Lucio y M. L. Guzmán Robles. 2011. Aplicación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación en frutas y hortalizas en Nayarit. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico No. 17, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México.

Osuna, J., 2012. Inocuidad Alimentaria Aumentan enfermedades Transmitidas por alimentos. [En línea] [Consultado el: 20 de Enero 2015] Available at: <http://www.noroeste.com.mx/publicaciones.php?id=757008>

Parrilla, C., Castañeda, C. & Nava, F., 2007. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario Vol. 35. En: Microbiología de los alimentos. Madrid España: Acribia, p. 364.

Puig. P. Y, Leyva C. V., Rodríguez. S. A., Carrera V., P, L. Molejón, Pérez. M. Y., Dueñas. M. O. (2013). Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. Revista Habanera de Ciencias Médicas:13(1):111-119.

Raj, B.S., M. Chandra y R. Agarwal (2005). Interaction of *Salmonella* enteritica Subspecies enteritica Serovar Typhimurium and mung bean (*Phaseolus aureus*) plants. Journal of Food Protection 68: 476-481.

Riveros, S. H. & Baquero, M., 2004. inocuidad, calidad, y sellos alimentarios. Ecuador.: Instituto Interoamericano de Cooperación para la Agricultura.(IICA). 8: 46-48.

Rodriguez, F., 2004. Produccion Horticola y seguridad alimentaria. España: Universidad de Almeria. Revista Electrónica de agricultura REDVET®, ISSN 695-750, Vol. VI, no. 09, Septiembre/2005.

Rodríguez, M. A., Guzmán, T. A., Escalona, R. A., Otero, F. M. 2005. Peligros bilógicos e Inocuidad de alimentos. Universidad de Granma. Ministerio de Educación Superior República de Cuba. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, no. 09, Septiembre/2005.

Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Rev. Salud Pública de México. 2002, 44 (5): 464-475.

Rojas, H. y R., González, F. T. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena polimerasa. 31:69-76.

Romero Cabello, Raúl 2007- "Microbiología y Parasitología Humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias", Ed. Médica Panamericana, 3º edición. 3: 234

Romero, R. C., 2007. Microbiología y Parasitología Humana.. México.: Médica Panamericana C. A. 3:21-23

Rosas, H. y R., González, F. T. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena polimerasa. 31:69-76

Rugama & Castillo, 2010 Inocuidad de alimentos. Universidad de Granma. Ministerio de Educación Superior República de Cuba. Revista Electrónica de ISSN 1695-7504, pp 09.

SAGARPA 2005. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Tomate. [en línea]: [fecha de consulta: 13 de agosto de 2013] Disponible en: [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx)

SAGARPA- ICAMEX. 2013. Cultivo del jitomate. México [en línea]: [fecha de consulta: 13 de agosto de 2013] Disponible en: [http://portal2.edomex.gob.mx/icamex/investigacion\\_publicaciones/horticola/jitomate/index.htm](http://portal2.edomex.gob.mx/icamex/investigacion_publicaciones/horticola/jitomate/index.htm)

SAGARPA, 2011. Estimación de importaciones y exportaciones agroalimentarias. [En línea] disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Estma\\_Exp\\_Edo.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Estma_Exp_Edo.pdf) [Consultado el: 18 de Enero 2015]

SAGARPA, 2012. SIAP. [En línea] disponible en [www.siap/sagarpa.mx](http://www.siap/sagarpa.mx) [consultado el 17 DICIEMBRE 2014].

SAGARPA, 2014. SAGARPA. [En línea] disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Glosario/Paginas/Buenas%20pr%C3%A1cticas%20agr%C3%ADcolas%20%28BPA%27s%29.aspx> [consultado el 26 enero 2015].

SAGARPA, 2015. Secretaria de Agricultura Ganadería Recursos Naturales Pesca y Alimentación. [En línea] consultado en: <http://www.SAGARPA.gob.mx/cierre-de-exportaciones-de-cilantro-doc>. el 22 Noviembre de 2015.

SAGARPA. (2014). Programa Integral de Desarrollo Rural Componente de Agricultura Familiar Periurbana y de Traspatio. [en línea]: [fecha de consulta: 1 de enero de 2017] Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/Documents/AgriculturaF/LECHUGA.pdf>

SAGARPA. 2005. Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo. Culiacán, Sinaloa, México, 9p.

SAGARPA. 2008. Brote de Salmonelosis en tomate mexicano disponible en: <http://www.wradio.com.mx/noticias/sin-evidencias-fda-de-que-tomate-rojo-mexicano-contenga-salmonela/20080612/nota/613388.aspx> consultado el 24 de noviembre de 2016.

SAGARPA/SENASICA, 2014. *PLAN DE ACCION PREVENTIVO CILANTRO*. [En línea] consultado en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/download./documento> el 8 Diciembre de 2014.

SAGARPA/SENASICA. 2006. Protocolo de aplicación voluntaria de Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manejo en los procesos de producción, cosecha y empacado de lechuga para consumo fresco. Versión 10 de Junio 2006.

SAGARPA/SIAP, 2014. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). [En línea] Available at: <http://www.siap.gob.mx/cierre-produccion-agricola-por-cultivo/> [Último acceso: 18 Enero 2015].

SAGARPA/SIAP. 2010. Monografía de Cultivos. Versión Agosto 2010. P. 10.

SAGARPA-SIAP. 2015. Cierre de la producción agrícola Nacional. Disponible en línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. consultado: Marzo 2015.

Saiki, R. K., d. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification cation of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Salazar, F. A. y Ivan. E., 2004. *Produccion de hortalizas de clima calido*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Scheutz F., Cheasty T., Woodward D., Smith H.R. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include

Verocytotoxin-producing E. coli (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. APMIS. 2005; 112 (6): 569-584.

SENASICA, 2014. plan de acción preventivo para cilantro .[En línea] consultado en: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/plan\\_accion\\_cilantro\\_senasica\\_2014.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/plan_accion_cilantro_senasica_2014.pdf), el 23 Junio de 2015.

SIAP/SAGARPA, 2014. cierre de la producción agrícola por cultivo cilantro [En línea] consultado en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/cilantro>, el 10 Noviembre de 2014.

SIAP/SAGARPA, 2013. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp). [En línea] Available at: [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp)

Smith, E. C., 2007. El gran manual del cultivador de hortalizas. Barcelona.: OMEGA.

Swaminathan B. y Matar G.M. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages. En: Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J., editors. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington, DC: America Society for Microbiology; 2001: 26-50.

Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persin D.H. Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. J. Clin. Microbiol. 1995; 3 (1): 2233-2239

Thampuran, N., Surendraraj, A., Surendran, P. K. J., 2005 “Prevalence and characterization of typical and atypical *Escherichia coli* from fish sold at retail in Cochin, India” *Journal of Food Protection*, 68(10): 2208-11.

Uria, A. D., 2009. Buenas Prácticas de Manufactura. Una guía para pequeños y medianos agroempresarios. San Jose, Costa Rica: IICA

Valerianes, P. M.A., 2013. Diseño de metodologías para la reducción de microorganismos Coliformes Fecales presentes en Hortalizas de hoja y tallo. Xalapa Veracruz: Universidad Veracruzana.

Vásquez, G.; Gómez, E.; Gamboa, E. 2007. Condiciones higiénico sanitarias de los servicios de alimentación en Instituciones infantiles del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar de Bucaramanga, Colombia. *Rev. Cub. Aliment. Nutr.* 17:23-33.

Villalobos, H. 2003. Buenas Prácticas para el Manejo de Productos Agrícolas. p. 123.

Wanke, C. A., J. B. Schorling, L. J. Barret, M. A. Desouza, R. L. Guerrant. 1991. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 10:746-751.

Weekly Report, Hepatitis an Outbreak Associated with Green Onions at a Restaurant.  
Monaca, Pennsylvania. November 28, 2003/52(47); 1155-1157.

Wilson, I. Inhibition and facilation of nucleic acid amplification. 1997. Appl Environ  
Microbiol. 63:3741-3751.

Yves Tirilly et al, C. M. B., 2002. Tecnología de las Hortalizas. España: Acribia, S.A.