



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Penetración y permanencia de *Escherichia coli* y
Salmonella en plantas y frutos de tomate (*Lycopersicon*
esculentum Mill)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A :

ROSA LAURA OCAÑA DE JESÚS

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, febrero de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Penetración y permanencia de *Escherichia coli* y
Salmonella en plantas y frutos de tomate (*Lycopersicum
sculentum* Mill)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

P R E S E N T A :

ROSA LAURA OCAÑA DE JESÚS

COMITÉ DE TUTORES

Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibáñez

Dra. María Dolores Mariezcurrena Berasain

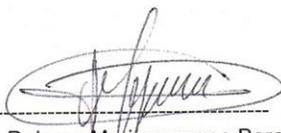
Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, febrero de 2018

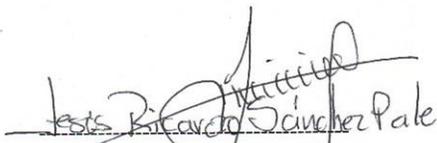
Por este medio los abajo firmantes, miembros del Comité de Tutores de la Tesis de Doctorado de la Ingeniera. Rosa Laura Ocaña de Jesús, damos el visto bueno y manifestamos que el trabajo cumple con las condiciones necesarias y suficientes para que sea sustentado y defendido a través del Examen de Grado respectivo. El trabajo de tesis se titula "Penetración y permanencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* en plantas y frutos de tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill)", el cual ha sido revisado y aprobado por el Comité de Tutores siguientes:



Dra. Ana Tarin Gutiérrez Ibáñez
Tutor Académico



Dra. María Dolores Mariézcurrena Berasain
Tutor Adjunto



Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale
Tutor Adjunto

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2018 año del 190 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este periodo de aprendizaje.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Posgrado.

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), quién a través de la Facultad de Ciencias Agrícolas me otorgó las facilidades para realizar mis estudios de posgrado, gracias por haberme permitido formarme y en ella gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso.

A la Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibáñez por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de este proyecto, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto.

A la Dra. María Dolores Mariezcurrena Berasain y al Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale por su asesoramiento apoyo, amistad y consejos en la realización de esta investigación.

Al Dr. Antonio Laguna Cerda por la paciencia, orientación y todo el apoyo brindado.

Al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitir el acceso a través de los Doctores Carlos Eslava Campos y Ulises Hernández Chiñas, así como por todo el apoyo, comentarios y aportaciones.

A todos mis profesores por sus enseñanzas y formación profesional.

Un profundo agradecimiento para Hugo, la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más difíciles. No fue sencillo sin embargo siempre me motivaste a seguir.

Muchas gracias, amor.

A mi pequeña Rosita, gracias por tu ternura y amor, detonantes de mi felicidad y esfuerzo.

A mi madre María Trinidad de Jesús Castillo, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores e infinito cariño.

A mis hermanos Rey y Mariela por escucharme en los momentos buenos y malos.

Son mi apoyo en la vida.

A Itzel Rojas Puebla y Alma Fabiola Araujo Guzmán por todo su apoyo, compañía y amistad que me han brindado en todo momento.

A todos aquellos que de una u otra forma tocaron mi vida, porque de ellos aprendí algo. Espero que tengan éxito en lo que emprendan y que Dios los bendiga en sus vidas.

DEDICATORIAS

A mi esposo:

Hugo Becerril Serrano

Tu impulso, cariño, comprensión y paciente espera me han permitido llegar a este momento.

A mi hija:

Rosa Aurora Becerril Ocaña

Dedico a ella cada esfuerzo que realice, fuiste mi motivación más grande.

A mi mamá y hermanos:

Ese apoyo incondicional me ha permitido culminar tan grande sueño.

Con el más grande amor este logro es totalmente para ustedes.

CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos.....	iv
Dedicatorias.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de figuras y cuadros.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
I. Introducción general.....	1
II. Revisión de literatura.....	3
2.1 Origen y distribución del cultivo de Tomate.....	3
2.2 Taxonomía del cultivo.....	5
2.3 Morfología del cultivo.....	5
2.4 Importancia del cultivo.....	9
2.5 Importancia de la Inocuidad Alimentaria.....	10
2.6 Microorganismos indicadores que afectan la Inocuidad Alimentaria.....	11
2.7 Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	12
2.8 Enfermedades Transmitidas por Alimentos relacionadas con el consumo de frutas y hortalizas.....	15
2.9 Fuentes y mecanismos de contaminación por patógenos a productos hortofrutícolas.....	16
2.9.1 Precosecha.....	17
2.9.2 Cosecha.....	20
2.9.3 Poscosecha.....	22
3.0 Microorganismos patógenos implicados en brotes importantes para México.....	22
3.1 Patógenos específicos.....	24
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	24

3.1.2 <i>Salmonella</i> (<i>Salmonella</i> Enteritidis)	26
3.2 Mecanismos de penetración y sobrevivencia de enteropatógenos en plantas	27
3.3 Métodos de identificación de enteropatógenos.....	30
3.3.1 Marcadores fenotípicos.	30
3.3.2 Marcadores genotípicos.....	30
3.3.3 Métodos basados en criterios morfológicos.....	31
3.3.4 Métodos basados en tinción diferencial.....	31
3.3.5 Métodos basados en pruebas bioquímicas.....	32
3.3.6 Serotipificación.....	32
3.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
3.4 Normatividad para la determinación de calidad microbiológica en México.....	34
III. Justificación.....	36
IV. Hipótesis.....	37
V. Objetivos.....	37
Objetivo General.....	37
Objetivos específicos.....	37
VI. Materiales y métodos.....	38
6.1 Etapa I: Calidad microbiológica de tomate producido bajo condiciones de invernadero en cinco municipios del Estado de México.....	38
6.1.1 Muestreo.....	39
6.1.2 Preparación de las muestras.	41
6.1.3 Mesófilos Aerobios	42
6.1.4 Coliformes Totales.....	42
6.1.5 Coliformes fecales.....	43

6.1.6	Diseño experimental y análisis estadístico.....	44
6.2	Etapa II: Penetración y permanencia de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> en plantas y frutos de tomate.....	45
6.2.1	Material vegetal y cepas bacterianas.....	46
6.2.2	Caracterización fenogenotípica.....	47
6.2.3	Inoculación.....	48
6.2.4	Toma de muestra.....	49
6.2.5	Diseño experimental.....	51
VII.	Resultados.....	53
	Artículo I. Calidad microbiológica del tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México.	54
	Artículo II. Persistencia, internalización y translocación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L)	61
	Artículo III. Movilidad y sobrevivencia de <i>Salmonella</i> serovar Enteritidis en plantas de tomate (<i>Solanum Lycopersicum</i> L).	93
VIII.	Discusión General.....	121
IX.	Conclusiones Generales	128
X.	Bibliografía consultada	129

Índice de figuras y cuadros

	Pág.
Figura 1. Tallo de tomate.....	6
Figura 2. Hoja de tomate.	7
Figura 3. Flor de tomate.	7
Figura 4. Frutos de tomate.	8
Figura 5. Cultivo de tomate en invernadero.....	9
Figura 6. Almacenamiento de tomate después de cosecha.....	17
Figura 7. Almacenamiento de tomate después de cosecha.....	22
Figura 8. Municipios del Estado de México muestreados.....	33
Figura 9. Cultivo de tomate. Tonatico, Edo. México.....	39
Figura 10. Frutos de tomate muestreados.	40
Figura 11. Agua utilizada para riego de cultivo de tomate.....	41
Figura 12. Mesófilos Aerobios en agar cuenta estándar.....	42
Figura 13. Crecimiento de Coliformes Totales en agar BRV.....	43
Figura 14. Crecimiento de Coliformes Fecales en agar BRV (a) y Picadura en agar MacConkey (b).....	44
Figura 15. Diagrama de trabajo en invernadero y laboratorio.....	45
Figura 16. Plántula de tomate variedad Cid (a) y Desarrollo de cultivo en invernadero (b).	47
Figura 17. Reactivación de cepas bacterianas.	47
Figura 18. Inoculación de cultivo de tomate aplicada al sustrato.....	48
Figura 19. Inoculación por punción en plantas de tomate.....	49
Figura 20. a) Crecimiento de <i>Salmonella</i> Enteritidis en agar Salmonella Shigela, b) <i>E. coli</i> O157:H7 en agar cromogenico y c) <i>E. coli</i> recuperada en tomate en agar MacConkey.....	51
Cuadro 1. Ubicación zona de estudio.....	38

Resumen

La presencia de bacterias patógenas, como *Escherichia coli* y *Salmonella*, afecta la calidad e inocuidad de las hortalizas que se consumen en fresco y se relaciona con graves problemas de salud. El tomate procedente de México es una de las hortalizas que ha presentado alertas sanitarias por la presencia de enteropatógenos. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* en cinco localidades del Estado de México, así como evaluar la capacidad de *E. coli* y *Salmonella* serovar Enteritidis de penetrar, permanecer y moverse en plantas y frutos de tomate. El estudio comprendió dos etapas (E): E I. Para detectar la presencia de enteropatógenos se determinó la calidad microbiológica de frutos de tomate producidos bajo condiciones de invernaderos en cinco Municipios del Estado de México. Se realizó un análisis microbiológico de muestras de agua de riego, suelo y de 100 frutos de tomate de la variedad Cid para determinar Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Se utilizó la metodología establecida por las Normas Oficiales Mexicanas y se compararon los recuentos con los límites máximos permisibles. E II. Para evaluar la capacidad de *E. coli* y *Salmonella* serovar Enteritidis de penetrar, permanecer y moverse en plantas y frutos de tomate, se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad “Cid”) en condiciones de invernadero y se evaluaron cuatro tratamientos, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (EcH O105ab), T4 (*Salmonella* Enteritidis) y el grupo testigo. Los tratamientos costaron con 100 plantas cada uno y cuatro formas de inoculación: en el sustrato, en el tallo, en el pecíolo y en el pedúnculo. Se realizaron muestreos en etapa vegetativa, floración, fructificación y madurez fisiológica para cuantificar en placa las

UFC/g y así identificar la movilidad en los órganos de la planta separados al punto de inoculación.

Los resultados de la EI en agua para Coliformes Totales y Fecales se encontraron dentro de los parámetros permitidos por la norma NOM-127-SSA1-1999. El análisis realizado en suelo demostró la ausencia de estos microorganismos. Para los frutos, el nivel de microorganismos de Mesófilos Aerobios se encontró dentro de los límites máximos permitidos por la norma NOM- 093-SSA1-1994. Para Coliformes Fecales, los municipios de Coatepec Harinas y Texcaltitlán sobrepasaron el límite permitido por la misma norma. En la EII a los 120 días, la recuperación de bacterias en la planta fue del 23 % (*E. coli* O157:H7), 28 % (EcT O157:H16), 55 % (EcH O105ab) y 35 % (*Salmonella* Enteritidis) con la inoculación al sustrato, mientras que con la inoculación por punción, la recuperación fue (en igual orden) del 5 %, 3 % , 4 % y 8 % a los 30 días; del 42 %, 39 %, 13 % y 36 % a los 65 días y del 37 %, 35 %, 30 % y 20 % a los 90 días.

Las cepas utilizadas mostraron la capacidad de entrar a la planta de tomate y de permanecer en ella y transportarse hasta llegar al fruto, sin producir síntomas que indiquen su presencia, por lo que el consumo de sus frutos implica riesgos a la salud.

Palabras clave: Patógeno, Bacteria, *Escherichia coli*, *Salmonella*, Calidad.

Abstract

The presence of pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* and *Salmonella*, affects the quality and safety of vegetables that are consumed fresh and is associated with serious health problems. The tomato from Mexico is one of the vegetables that has presented health alerts by the presence of enteropathogens. The objective of the present study was to detect the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in five localities of the State of México, as well as to evaluate the ability of *E. coli* and *Salmonella* serovar Enteritidis to penetrate, stay and remain in plants and tomato fruits. The study included two stages (SI): Was determined to tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microbiological quality produced under greenhouse conditions in 5 municipalities of the State of Mexico. A microbiological analysis of samples of irrigation water, soil and 100 tomato fruits variety cid was performed to determine Aerobic Mesophiles, Total Coliforms and Fecal Coliforms. The methodology used were those according to the Official Mexican Standards. The results for SI showed a zero level of pollution in water and soil samples. For fruits, levels of Aerobic Mesophilic were within the maximum limits permitted by the standards. For Fecal Coliforms, municipalities of Coatepec and Texcaltitlan exceeded the allowed limit. SII. To evaluate the ability of *E. coli* and *Salmonella* serovar Enteritidis penetrate, remain and move in plants and fruits of tomato. A completely randomized experimental design was followed for which a tomato crop ("Cid" variety) was established under greenhouse conditions and three treatments were evaluated, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (EcH O105ab), T4 (*Salmonella* Enteritidis) and a T5 control, with 100 plants each and four forms of inoculation: in the substrate, stem, petiole and the peduncle. Samples were carried out in vegetative stage, flowering, fruiting and physiological

maturity to quantify in petri dish CFU/g and know if the bacteria managed to move around and recover in root, stem, flower and fruit. In the SII at 120 days the recovery of bacteria in the plant was 23 % (*E. coli* O157:H7), 28 % (EcT O157:H16), 55 % (EcH O105ab) and 35 % (*Salmonella* Enteritidis) whit inoculation to the substrate while the inoculation by puncture the recovery was (in the same order) of 5 %, 3 %, 4 % and 8 % at 30 days; 37%, 35 %, 30 % and 20% at 90 days; and 42%, 39%, 13 % and 36 % at 65 days. The strains submit the ability to enter the tomato plant and to stay in it and transported to the fruit, without producing that indicate their presence, so the consumption of its fruit Involves health risks

Key words: Pathogen, Bacterium, *Escherichia coli*, *Salmonella*, Quality.

I. Introducción general

A nivel mundial las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones sociales y económicas (Castro *et al.*, 2006).

En años recientes, la frecuencia de brotes asociados al consumo de productos hortofrutícolas se ha elevado, particularmente como resultado del incremento en la demanda por los productos mínimamente procesados (Beuchat, 2002). La presencia de bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. afecta la inocuidad de frutas y hortalizas frescas y se refleja en problemas de salud humana y la incidencia de brotes diarreicos e implicaciones clínicas de mayor importancia en quienes consumen estos productos (Ukuku y Sapers, 2001). El resultado son miles de hospitalizaciones y pérdidas económicas en la industria de alimentos (Mandrell 2009; Batz *et al.*, 2011).

Éstos patógenos de humanos pueden contaminar los productos en todas las etapas del ciclo de producción, de la granja a la mesa. La interpretación de los datos sobre la persistencia de *Salmonella* y *E. coli* patógenas en las condiciones típicas de campo sigue siendo controvertida (Greene *et al.*, 2008). Una vez depositada en el campo con deyecciones animales, estiércol incorrectamente procesado y agua de mala calidad entre otros vectores, los microorganismos enteropatógenos pueden persistir durante largos períodos de tiempo en la raíz, o incluso llegar a tejidos internos (Islam *et al.*, 2004a; Islam *et al.*, 2004b). La gran capacidad de adaptación y, por tanto, de sobrevivencia que presentan los microorganismos patógenos, hace particularmente compleja la intervención en la cadena

productiva, es necesario la prevención de condiciones propicias para su desarrollo y así evitar riesgos a la salud.

La comprensión de las prácticas de cultivo y postcosecha sobre la susceptibilidad de los cultivos a patógenos humanos podría resultar en una reducción significativa de la cantidad y gravedad de brotes alimentarios.

Por lo anteriormente descrito, el objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Escherichia coli* y salmonella en cinco localidades del Estado de México, así como evaluar la capacidad de *E. coli* y *Salmonella* serovar Enteritidis de penetrar, permanecer y moverse en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

II. Revisión de literatura

La disponibilidad de variedades, nuevos métodos de cultivo y la creciente demanda de hortalizas han incentivado la producción mundial de tomate rojo. El volumen cosechado a nivel mundial, el consumo total, así como el consumo promedio per cápita registran tendencia al alza durante la década reciente. China se mantiene como el principal productor y consumidor. Estados Unidos es el principal importador mundial, mientras que México es el principal proveedor externo de esta hortaliza para ese país con una exportación de 1, 606,964 toneladas (SIAP, 2017). En general, la productividad del tomate o jitomate por unidad de superficie continúa creciendo. Los rendimientos varían en un amplio rango en función de las tecnologías empleadas, desde el cultivo a cielo abierto, hasta la producción en invernaderos. Las inversiones en agricultura protegida están orientadas a mejorar los niveles de rentabilidad del cultivo, principalmente de la producción destinada al mercado de exportación que debe cumplir con todas las características de calidad para participar en el mercado internacional (FIRA, 2016; SIAP, 2017).

2.1 Origen y distribución del cultivo de tomate

El tomate o jitomate es originario de la América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México. La palabra jitomate proviene del náhuatl: *xictomatl* = literalmente “tomate de ombligo”, de *xictli* “ombligo” y *tomatl* “tomate” (SIAP, 2017). Éste se puede cultivar a cielo abierto y es el principal cultivo que se desarrolla bajo el sistema de agricultura protegida (SIAP, 2017).

En 2015, la producción de tomate Saladette representó el 79.9% del total de la producción de tomate en México, el tomate bola el 16.5% y el tomate cherry el 3.6%. La producción de tomate Saladette se concentra en cinco estados: Sinaloa 23.1% de la producción nacional de esta variedad en 2015, Michoacán 9%, San Luis Potosí 8.9%, Baja California 5.7% y Zacatecas 5.2% del volumen nacional de este tipo de tomate. La producción a cielo abierto, durante el año agrícola 2015 representó el 46.9%; en esta modalidad los principales estados productores son: Sinaloa, Michoacán y Zacatecas. En tanto, la producción en agricultura protegida (invernaderos y malla sombra) representó el 53.1%. Los principales estados productores de tomate Saladette en condiciones de agricultura protegida son Sinaloa, San Luis Potosí, Puebla, Baja California y Coahuila. (FIRA, 2016). En el Estado de México para el 2016 tuvo una producción de 106,423 toneladas y los principales municipios productores son Jocotitlán, Coatepec Harinas, Zacualpan y Luvianos (SEDAGRO, 2016).

2.2 Taxonomía del cultivo

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Superdivisión: Embryophyta

División: Tracheophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Asteranae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: Solanum

Especie: *Solanum lycopersicum* L.

Fuente: (NCBI, 2017).

2.3 Morfología del cultivo

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas) (Jaramillo *et al.*, 2007; SAGARPA, 2010).

Sistema radicular: Está formado por la raíz principal (corta y débil), numerosas raíces secundarias y por las raíces adventicias. Si se seccionara transversalmente la raíz principal desde fuera hasta dentro, se encontraría la epidermis (se ubican los pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes), el cortex y el cilindro central (se sitúa el xilema, conjunto de vasos especializados en el transporte de los nutrientes). Los tomates

sembrados en forma directa, tienen un sistema radicular pivotante, profundo y poco ramificado, en tanto que los sembrados por trasplante poseen raíces muy ramificadas y superficiales (Jaramillo *et al.*, 2007; SAGARPA, 2010).

Tallo: éste es un eje que tiene un grosor de 2 a 4 cm en su base, sobre él se desarrollan las hojas, los tallos secundarios (ramificación simpoidal) e inflorescencias (Figura 1). Su estructura, desde fuera hacia dentro, consta de: epidermis, de la que parten hacia el exterior los pelos glandulares, corteza o cortex, cuyas células más externas son fotosintéticas y las más internas son colenquimáticas, cilindro vascular y tejido medular. Éste tiene la propiedad de emitir raíces cuando se pone en contacto con el suelo, característica importante que se aprovecha en las operaciones culturales de aporque (labor que consiste en acumular suelo alrededor de los tallos de las plantas que crecen a cierta altura) dándole mayor anclaje a la planta (Jaramillo *et al.*, 2007).



Figura 1. Tallo de tomate.
Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

Hoja: son compuestas e imparipinnadas con foliolos peciolados, lobulados, con borde



Figura 2. Hoja de tomate.
Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

dentado y recubiertos de pelos glandulares. Por cada rama de la planta se desarrollan entre 7 y 9 hojas, los cuales se disponen de forma alterna sobre el tallo. (Figura 2). El mesófilo o tejido parenquimático está recubierto por una epidermis superior e inferior, ambas sin cloroplastos.

La epidermis inferior presenta un alto número de estomas. Dentro del parénquima, la zona superior o zona en empalizada, es rica en cloroplastos. Los haces vasculares son prominentes, sobre todo en el envés, y constan de un nervio principal (Jaramillo *et al.*, 2007).

Flor: Es perfecta o hermafrodita, regular e hipógina y consta de cinco o más sépalos y de seis o más pétalos; tiene un pistilo con cinco estambres, unidos en sus anteras y formando un tubo que encierra el pistilo. Las flores se agrupan en racimos simples ramificados que se desarrollan en el tallo y en las ramas del lado opuesto a las hojas. Un racimo puede reunir de 4 a 20 flores dependiendo de la variedad cultivada y las condiciones de desarrollo de la planta. Las flores son amarillas y normalmente pequeñas (uno a dos cm de diámetro). La primera



Figura 3. Flor de tomate.
Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal (Figura 3). Las

inflorescencias se desarrollan cada 2 a 3 hojas en las axilas (Tanaka y Fujita, 1974; Jaramillo *et al.*, 2007).

Fruto: es una baya que presenta diferente tamaño, forma, color, consistencia y composición, según el cultivo que se trate. Está constituido por la epidermis o piel, la pulpa, el tejido placentario y las semillas. Internamente los frutos están divididos en lóculos, donde se forman las semillas y pueden ser bi, tri, tetra o pluriloculares. Los frutos maduros pueden ser rojos, rosados o amarillos, la maduración puede ser uniforme, pero



Figura 4. Frutos de tomate.
Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

existen algunas variedades que presentan hombros verdes debido a un factor genético (Figura 4). La exposición directa de los rayos del sol sobre los frutos con hombros verdes acrecienta su color a un verde más intenso, y en algunos casos toman una coloración amarilla; el cubrimiento de los frutos con el follaje reduce este fenómeno. Es importante al momento de elegir una variedad determinar si el mercado acepta esta característica. El fruto del

tomate está unido al pedúnculo por medio de una articulación en la que se encuentra un punto de abscisión, algunas variedades no tienen este punto de abscisión por lo que son definidas como variedades tipo “jointless”, y se usan principalmente para procesamiento ya que se requiere que el fruto se separe fácilmente del cáliz (Jaramillo *et al.*, 2007; SAGARPA, 2010).

Semilla

La semilla del tomate es pequeña, con dimensiones aproximadas de 5 x 4 x 2 mm, éstas pueden ser de forma globular, ovalada, achatada, casi redonda, ligeramente alargada, plana, arriñonada, triangular con la base puntiaguda. La semilla está constituida por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal, la cual está recubierta de pelos. Las semillas dentro del lóculo, en sus últimas etapas de desarrollo, aparecen inmersas en una sustancia gelatinosa (Figura 5) (Jaramillo *et al.*, 2007; SAGARPA, 2010).



**Figura 5. Semilla de tomate.
Fuente: SAGRAPA, 2016.**

2.4 Importancia del cultivo

El tomate es una de las especies hortícolas más importante para el consumo humano, y genera cuantiosos ingresos, empleos y un alto valor nutritivo para la dieta. Es una de la hortaliza que ocupa la mayor superficie sembrada en todo el mundo y se encuentra disponible todo el año (SIAP, 2016).

México tiene un lugar reconocido en el comercio internacional de hortalizas y el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las más importantes su valor radica en el rendimiento de producción y la demanda de mano de obra que genera. El Servicio de Información

Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), contabilizó más de 23 mil hectáreas sembradas con jitomate y una producción de poco más de un millón de toneladas, aunado a que posee cualidades y facilidades para adecuarse a la dieta alimenticia (Ramos *et al.*, 2006; SIAP, 2016). Es un alimento saludable cuyo consumo puede ser en fresco o procesado; en su mayoría se compone de agua y pocas calorías; los azúcares y ácidos orgánicos presentes le dan un sabor característico y demandado por los consumidores mexicanos y de otros países (SAGARPA, 2011). Es fuente de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio; además de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, de éstas el licopeno es una de las más importantes, ya que actúa como antioxidante, ayuda a regenerar las células del cuerpo, reduce y disminuye los radicales libres que producen el envejecimiento. La ingesta de tomate se relaciona con la disminución de las posibilidades de contraer cáncer, problemas de próstata; reducir el nivel de colesterol y presión arterial; regula y evita la retención de líquidos, ayuda a cicatrizar heridas, además que se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y es utilizado para depurar la sangre, para problemas de hígado, colitis y es empleado como laxante; razón por la cual su consumo requiere una garantía de inocuidad (Jaramillo *et al.*, 2007).

2.5 Importancia de la Inocuidad Alimentaria

La inocuidad en un alimento representa la garantía de que no causará daño al consumidor (Fernández, 2000). Esta cualidad es afectada por la presencia de peligros físicos, químicos y biológicos que pueden ser introducidos tanto en la producción primaria como en los procesos de empaque y/o transformación (OMS, 2017).

La situación mundial del comercio de los alimentos obliga a las empresas exportadoras a reforzar sus sistemas de control, así como adoptar y vigilar estrategias de control de la inocuidad basadas en el riesgo de contaminación (OMS, 2017).

La presencia de patógenos en los alimentos es una razón frecuente para el rechazo de productos, además de que genera situaciones de enfermedad, pérdidas económicas y problemas sociales (SENASICA, 2011).

Se estima que cada año enferman 600 millones de personas en el mundo, 1 de cada 10 habitantes, por ingerir alimentos contaminados y que 420,000 mueren por esta misma causa. Estas dificultades suponen una mayor responsabilidad para los productores y distribuidores de alimentos en lo que atañe a la inocuidad de los alimentos. Los incidentes locales pueden transformarse rápidamente en emergencias internacionales debido a la rapidez y el alcance de la distribución de los productos. En los últimos diez años se han registrado brotes de enfermedades graves transmitidas por los alimentos en todos los continentes, a menudo amplificadas por la globalización del comercio (OMS, 2017).

2.6 Microorganismos indicadores que afectan la Inocuidad Alimentaria

Actualmente, se estima que los microorganismos indicadores de calidad microbiológica o vida útil de los alimentos la indican no solo microorganismos si no productos de su metabolismo como toxinas (Fernández, 2000). Se califican de indicadores aquellos que sugieren o se asocian con un antecedente que compromete su calidad sanitaria (Fernández, 2000; Zucca *et al.*, 1998). Algunos de los organismos indicadores que son más comúnmente usados para asegurar la inocuidad alimentaria incluyen bacterias mesófilas

aerobias, coliformes totales y fecales, al igual que *E. coli*, hongos y levaduras, entre otros (León *et al.*, 2009).

La obtención de alimentos microbiológicamente seguros e inoctrinos requiere de técnicas analíticas capaces de detectar microorganismos patógenos aun en bajos niveles. Sin embargo, los alimentos seguros sólo pueden ser producidos mediante el empleo de prácticas higiénicas adecuadas, lo que puede evaluarse mediante el monitoreo de microorganismos indicadores (Smoot y Pierson, 1997).

Debido a que no es factible realizar pruebas de detección para todos los microorganismos patógenos, la seguridad microbiológica de frutas y hortalizas sólo puede asegurarse por la ausencia de indicadores (Hirovani *et al.*, 2001).

En productos hortofrutícolas la detección de patógenos se dificulta por muchas razones, entre ellas el prolongado tiempo de detección, la metodología complicada y el elevado costo. La presencia de algunos indicadores microbiológicos en los alimentos a menudo resulta de la contaminación fecal directa o indirecta y por consiguiente sirve como un “marcador” de que ha ocurrido contaminación, así como la posible presencia de microorganismos patógenos (León *et al.*, 2009).

2.7 Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas que se originan por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos como virus, parásitos, mohos y/o bacterias, así como sus toxinas en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Estas enfermedades, usualmente, derivan de la ingestión del patógeno, seguida su proliferación e incluso en ocasiones invasión de los tejidos, liberación de toxinas, o ambos (Prescott *et al.*, 2004).

En un informe de “Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria”, publicado en 2015 por la OMS fue el primero en ofrecer estimaciones completas sobre la carga de morbilidad causada por 31 agentes contaminantes (bacterias, virus, parásitos, toxinas y productos químicos) a nivel mundial y regional (OMS, 2015). Un individuo que enferme como consecuencia del consumo de un alimento contaminado con un microorganismo patógeno depende de tres elementos implicados y su interrelación entre el individuo, patógeno y alimento (Fernández, 2000). Los síntomas más comunes incluyen diarrea y vómito, aunque también se pueden manifestar con dolor abdominal, cefalea y fiebre, entre otros. Aunque muchas infecciones son autolimitadas, pueden presentar un curso más grave que incluye deshidratación severa, perforación gastrointestinal y septicemia que se puede presentar en algunos pacientes. También se han descrito otras complicaciones extraintestinales además de la septicemia, tales como endocarditis, neumonía, meningitis y abscesos. El síndrome urémico hemolítico (HUS por sus siglas en inglés), que es la causa más común de falla renal en lactantes, ha sido particularmente asociado con la infección por *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Helms *et al.*, 2006).

Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA en México y el mundo, se encuentran *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, así como algunos serotipos de la enterobacteria *Escherichia coli*, principalmente el O157:H7 (Blackburn y McClure, 2002).

Se estima que las ETA afectan aproximadamente a 48 millones de personas anualmente en los Estados Unidos, de los cuales alrededor de 9.4 millones de enfermedades son producidas por patógenos conocidos (Scallan *et al.*, 2011). El CDC (Centers for Disease Control and Prevention) define un brote de ETA como la presencia de dos o más personas

enfermas de manera similar provocado por la ingestión de un alimento en común (CDC, 2013). Una estimación por el CDC sobre los brotes que ocurren tan solo en los Estados Unidos concluyó que cerca de 48 millones de personas son afectadas, produciéndose 128,000 hospitalizaciones y 3,000 muertes (Scallan *et al.*, 2011). En México en los últimos años se ha señalado la frecuencia de brotes por enfermedades transmitida por la ingesta de alimentos y, en su mayoría se han atribuido a la presencia de contaminantes de tipo biológico (Fernández, 2000). Solo para el año 2016, infecciones intestinales fueron la segunda causa de morbilidad con 4,476,041 casos. Se detectaron 6,702 casos por intoxicación alimentaria bacteriana, por Salmonelosis 419,231 casos; así como 7,385 casos por infecciones intestinales debidas a protozoarios, entre otras (CENAVECE, 2016). Se calcula que anualmente mueren 16,000 personas por ETA y los efectos colaterales son cierre temporal de fronteras, destrucción de cultivos, suspensión de exportaciones, perdidas valoradas en millones de dólares anuales, clausura de empresas, mala imagen de productos nacionales en el exterior, ausentismo laboral y escolar, y gastos en atención médica entre otros (Cuellar, 2001).

La amenaza de la transmisión de los patógenos contaminantes de alimentos a los consumidores se ha incrementado debido a la industrialización y la globalización de la cadena de suministro de alimentos y el cambio de hábitos alimenticios de la población. Con el fin de proteger a los consumidores de la contaminación en el consumo de los alimentos, es importante optimizar las técnicas de detección de microorganismos de índole sanitaria (Wu, 2009).

2.8 Enfermedades Transmitidas por Alimentos relacionadas con el consumo de frutas y hortalizas

Las frutas y vegetales son componentes importantes de una dieta saludable y balanceada, sin embargo, en muchas ocasiones son consumidos crudos y han sido reconocidos como importantes vehículos para la transmisión de patógenos para los humanos. Reportándose brotes de enfermedades gastrointestinales causados por bacterias, virus y parásitos. A pesar de esta asociación, existe un limitado conocimiento sobre en qué parte de la cadena de producción ocurre la contaminación o sobre el mecanismo por el cual los patógenos colonizan y sobreviven en estos productos (Cedric *et al.*, 2010).

Se han documentado brotes relacionados al consumo de productos frescos como espinaca y lechuga contaminados con *E. coli* O157:H7, o bien, *Salmonella* Typhimurium y *S. Newport* presentes en tomate y lechuga, y *S. Thompson* en rábano (Heaton y Jones, 2008). Esto aunado a que muchos microorganismos han desarrollado mecanismos para unirse, sobrevivir, o crecer en diferentes vegetales (Wan *et al.*, 2015). En la superficie de los productos los microorganismos interactúan en agregados, posiblemente compitiendo por los limitados nutrientes disponibles de las células epidérmicas donde las ceras cuticulares son menos densas, el agua se acumula, y los nutrientes están más disponibles que en otros lugares. Se ha determinado por ejemplo que la humedad de la superficie del chile jalapeño puede proporcionar un ambiente protector para cepas de *E. coli* y *Salmonella*. También se ha visto que los microorganismos se pueden internalizar en los vegetales a través de canales de agua y que, los microorganismos internalizados, generalmente se encuentran protegidos contra el estrés ambiental (Castro *et al.*, 2011).

Estudios previos identificaron que con el tiempo suficiente y bajo las condiciones adecuadas, los microorganismos pueden estar firmemente adheridos y proliferar en la superficie de los vegetales (Pao *et al.*, 2012).

2.9 Fuentes y mecanismos de contaminación por patógenos a productos hortofrutícolas

Los productos frescos se promueven como parte de una dieta saludable, y su consumo se ha incrementado en los últimos años. La International Fresh-cut Produce Association define a los productos frescos cortados como las frutas o verduras que han sido precortadas y/o peladas y/o cortadas en un producto 100% usable que es embolsado o preenvasado para ofrecer a los consumidores conveniencia, mantenimiento y frescura (Althaus *et al.*, 2012). Sin embargo, la creciente demanda de frutos frescos puede constituir un riesgo para la salud de los consumidores, teniendo en cuenta la gran variedad de microorganismos que estos suelen albergar (Luna *et al.*, 2015). Dentro de los contaminantes biológicos se mencionan a bacterias, virus, parásitos y hongos productores de toxinas, microorganismos capaces de colonizar y sobrevivir en o sobre frutas y verduras (Berger *et al.*, 2010). Cuando estos microorganismos causan enfermedades se consideran patógenos (Fernández, 2000); los de mayor incidencia en productos hortofrutícolas son virus (hepatitis A), y norovirus; parásitos (*Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*); y bacterias (*Clostridium* spp., *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp. y *Yersinia enterocolitica*), principalmente (Berger *et al.*, 2010). De estos microorganismos *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 son los que se han señalado con mayor frecuencia como agentes causales de enfermedades gastrointestinales (Fernández, 2000).

En la cadena de producción de alimentos existen riesgos de infección por patógenos, por lo que se necesita un control microbiológico estricto para impedir que estos lleguen al consumidor, al respecto a continuación se mencionan las principales fuentes en las diferentes etapas precosecha, cosecha y poscosecha.

2.9.1 Precosecha

La etapa de precosecha (Figura 6) se considera la fase más temprana de la cadena productiva e incluye siembra, cultivo, irrigación y tratamientos asociados con la producción de la planta madura (León *et al.*, 2009).



Figura 6. Cultivo de tomate en invernadero. Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

La contaminación ocurre en la superficie del vegetal en la mayoría de los productos, sin embargo, existe evidencia de que los patógenos pueden ingresar por acción capilar en los espacios o hendiduras y/o en tejidos vegetales dañados durante la producción (Petterson *et al.*, 2001).

La FDA (Food and Drug Administration) y USDA (United States Department of Agriculture) identifican numerosos factores de riesgo y áreas de control de contaminación microbiológica que deben implementarse en productos hortofrutícolas en etapa de precosecha. Los documentos incluyen puntos como la calidad microbiológica del agua, uso de estiércol, manejo de animales y plagas; trazabilidad, limpieza, sanitización y salud e higiene del trabajador (León *et al.*, 2009). Las heces de animales domésticos, animales silvestres e insectos son una fuente potencial de contaminación animal. Beuchat y Ryu (1997) mencionan que algunas especies de

pájaros pueden diseminar ciertos patógenos: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *V. cholerae*, *Listeria* y *E. coli* O157:H7.

Se ha documentado el agua subterránea es menos probable de ser contaminada que las aguas superficiales, pues la calidad del agua superficial se afecta por los patrones de uso de la tierra en la cuenca. Estos patrones se pueden afectar por la presencia de heces de humanos y animales en el agua, tal como en el punto de origen (aguas residuales) y fuera del punto de origen, así como por la topografía y las fluctuaciones en las precipitaciones (León *et al.*, 2009).

El tipo de irrigación utilizada también puede influir en la contaminación de frutas y hortalizas, las prácticas de irrigación que maximizan la exposición de la porción comestible del producto pueden incrementar la probabilidad de contaminación.

Las técnicas de goteo o subirrigación pueden minimizar la humectación de la porción comestible y, por lo tanto, disminuir la probabilidad de contaminación del producto. Desafortunadamente, se hace amplio uso de aguas residuales no tratadas para irrigación, especialmente en países en desarrollo, y el uso de estas aguas también puede incrementar el riesgo de contaminación de frutas y hortalizas (León *et al.*, 2009).

Además, las fuentes de contaminación indirecta podrían incluir las interacciones tróficas entre plantas y recolectores de plantas, como aves, mamíferos e insectos, ha adquirido interés como una fuente potencial de contaminación de frutas y hortalizas (Doyle y Erickson, 2007).

Clayton (2006) observó muchas granjas que no tienen barreras que eviten la entrada de animales domésticos o silvestres a los cultivos y la mayoría de estas reportaron animales cerca de sus fuentes de agua. Los animales son un vehículo de contaminación y pueden

acelerar la degradación de los productos agrícolas, reduciendo en gran medida la calidad y la vida útil de los vegetales cuyo consumo es en fresco (Bihn *et al.*, 1999).

La contaminación de vegetales con microorganismos presentes en el suelo se puede llevar a cabo cuando se presenta lluvia intensa o a través del agua de riego, al salpicar el agua y llegar así al producto, ya que se sabe que muchos vegetales crecen en el suelo o muy cerca del mismo (Heaton y Jones, 2008).

Los contaminantes también pueden introducirse en el suelo si la tierra se utilizó previamente para producción animal o vertederos industriales, o si se aplicaron biosólidos, lodos, estiércol como fertilizante o para disposición de residuos. El estiércol es particularmente riesgoso, debido a que las heces de animales pueden contener patógenos que llegan a los vegetales cultivados en el campo. La cercanía del fertilizante al vegetal, contención inadecuada del abono y una composta incorrecta pueden incrementar el riesgo de contaminación del producto y además eliminar los beneficios del abono en términos de potenciación del crecimiento (Bihn y Gravani, 2005).

Existen variables fundamentales que contribuyen la reducción de patógenos como el tipo de residuo aplicado y tipo de cultivo (Islam *et al.*, 2004b)

Kutter *et al.* (2006) demostraron la penetración de las paredes celulares de la epidermis de raíces de cebada por *S. enterica*. El sitio de entrada más común se presume que es la penetración en las fisuras en la cubierta de las semillas (Wachtel *et al.* 2002) o la invasión en las uniones laterales de las raíces de las plántulas (Cooley *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2003b; Warriner *et al.*, 2003b). Se cree que la exudación de nutrientes en estos sitios de entrada actúa como desencadenante de la movilización de patógenos hacia esos lugares de la planta (Cooley *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2003b; Jablason *et al.*, 2005), además, las características de adhesión y la capacidad de colonización del patógeno también

representan un factor de importancia en su proliferación hacia dichos sitios (Wachtel *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003a).

Otra condición que afecta la internalización de patógenos en sistemas modelo ha sido la presencia o ausencia de suelo y el acompañamiento de flora microbiana endógena que podría actuar como competidora de los patógenos alimentarios (Doyle y Erickson, 2007). Por último, la supervivencia del patógeno y la movilización de éste hacia las porciones comestibles de la planta determinan el destino e impacto de los patógenos internalizados. Algunos estudios reportan el movimiento sistémico de patógenos a través del sistema vascular de la planta (Guo *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2002; Solomon y Matthews 2005; Bernstein *et al.*, 2007a, b). Alternativamente, Cooley *et al.* (2003) no observó movimiento sistémico en berro, pero atribuyó la contaminación de la porción comestible al movimiento de patógeno en la superficie de la planta.

2.9.2 Cosecha

En la etapa de cosecha se colectan las frutas y hortalizas por métodos manuales o mecánicos. En esta fase, las fuentes de contaminación difieren un tanto de aquellas que afectan durante la precosecha. Además, los contaminantes que actúan durante y después de la cosecha, dependen de que los vegetales sean empacados en campo (para distribución inmediata) o si se someten a lavado y subsecuente embalaje en una planta procesadora (empacadora) (Greig *et al.*, 2007).

La contaminación microbiológica de frutas y hortalizas puede ocurrir a través del contacto directo con equipo contaminado (USDA, 2001) o por la manipulación de los vegetales por parte de los trabajadores durante la cosecha (Hernández *et al.*, 1997).

Un estudio acerca de las prácticas agrícolas y de embalaje en varios estados de E.U.A., sugirió que el 94 % de todos los acres de frutas y 87 % de todos los acres de hortalizas analizados se cosecharon de forma manual (USDA, 2001).

Orozco *et al.* (2008) identificaron las fuentes de contaminación de tomate en condiciones de invernadero y se encontró presencia de *Salmonella* y *E. coli*, en muestras de tomate, charcos de agua, suelo, zapatos y heces de animales domésticos y silvestres. La presencia y persistencia de *Salmonella* en los charcos y el suelo indicaron que esta materia podría ser reservorio para el patógeno, favoreciendo su supervivencia e incluso su multiplicación. Algunos problemas importantes de higiene en los trabajadores pueden incluir manos contaminadas, falta de higiene, ropa y/o cabello sucio, heridas abiertas y/o infecciones en las manos, enfermedad gastrointestinal (como gastroenteritis o hepatitis) o ser portador asintomático de patógenos entéricos, acceso limitado o nulo a letrinas y defecación en cultivos (Greig *et al.*, 2007). Esto coincide con lo reportado por Ocaña *et al.* (2015) señalan que prácticas respecto a la higiene del trabajador, también pueden influir en la contaminación del producto. Estas incluyen programas de capacitación de los trabajadores, que abarcan aspectos de higiene personal, como lavado correcto de manos antes de entrar en contacto con los cultivos, uso de guantes, cofia, cubrebocas y adecuadas instalaciones sanitarias. Estas prácticas forman parte del control de calidad de la huerta e incluyen las BPA, las BPM y el análisis de riesgos de puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés) (Greig *et al.*, 2007; Ocaña *et al.*, 2015).

2.9.3 Poscosecha

La poscosecha involucra lo que le sucede al alimento, después de su cosecha, a través de su transportación, distribución y/o en establecimientos de venta (Figura 7). Las frutas y hortalizas crudas reciben un tratamiento más económico; algunas son empacadas y distribuidas inmediatamente después de cosecharse sin ningún tratamiento posterior, mientras que otras se lavan y/o desinfectan y empacan antes de su distribución (León *et al.*, 2009).

Las fuentes de contaminación en esta etapa incluyen heces de animales, insectos, otros vegetales, vehículos o contenedores donde se coloca el producto para su traslado entre las



Figura 7. Almacenamiento de tomate después de cosecha.
Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

diferentes operaciones del procesamiento y distribución, agua de lavado, equipo o utensilios de corte, embalaje y clasificación, bandas transportadoras y otras superficies de contacto y las manos de los manipuladores del producto (Izumi *et al.*, 2008).

3.0 Microorganismos patógenos implicados en brotes importantes para México

En marzo de 1997 un brote de hepatitis A, afectó a más de 200 estudiantes y maestros en Michigan, Estados Unidos y fue atribuido al consumo de fresas producidas en Baja California, un subsecuente brote en el 2003 en Pennsylvania fue atribuido el consumo de cebollín fresco proveniente de la misma zona, y afecto fuertemente a los productores del Valle de Mexicali, cerrándose temporalmente el mercado estadounidense (Calvin, 2003).

En el periodo 2001-2002 fueron detectados brotes de *Salmonella* spp. y dos muertes por el consumo de melones importados de México. El reporte emitido concluyó que la contaminación ocurrió debido a condiciones laborales insalubres en las huertas de producción, lo que llevó a la suspensión de importaciones de melón mexicano (Castillo *et al.*, 2004).

Durante el 2008 y 2009, en Estados Unidos se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en tomate, chile, hierbas y cebollines. El valor de exportaciones de tomate fresco y refrigerado disminuyeron 40.7%, esto repercutió en grandes pérdidas en la cadena productiva (Mejía y López, 2008). En el 2012 se reportó un brote de *Salmonella* Braenderup, con 127 personas infectadas y 33 casos graves que necesitaron hospitalización, el brote se le atribuyó a mango procedente de Sinaloa (CDC, 2013).

El último de los casos reportados para México fue en el 2017 por papaya maradol que se exportó a 23 estados de Estados Unidos, con un total de 220 personas infectadas de las cuales 144 casos fueron por cepas de *Salmonella* Thompson con 144 casos, *Salmonella* Kiambu 54, *Salmonella* Agona 12, *Salmonella* Gaminara 7 y *Salmonella* Senftenberg con 3 brotes. Esto repercutió en una alerta sanitaria y el retiro del producto del mercado (FDA-CDC, 2017).

3.1 Patógenos específicos

3.1.1 *Escherichia coli*

Es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de ser responsables de producir vitaminas B y K. La mayoría de *E. coli* son inofensivas y en

realidad son una parte importante de un tracto intestinal humano saludable. Sin embargo, algunos son patógenos, lo que significa que pueden causar enfermedades, ya sea diarrea o enfermedad fuera del tracto intestinal. Los tipos de *E. coli* que pueden causar enfermedades se pueden transmitir a través del agua o alimentos contaminados, o por contacto con animales o personas (Iguchi *et al.*, 2009; Gorbach *et al.*, 2004).

El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, cuando se utiliza la tinción de Gram se tiñen de rojo (Gram negativas). Algunas especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporuladas, fermentan la glucosa y la lactosa son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos. El género *Escherichia* incluye siete especies (*E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli*). Estudios epidemiológicos moleculares han clasificado a las diferentes cepas de *E. coli* en filogrupos: A, B1, B2, D y E. Los patotipos involucrados en infecciones extraintestinales se han denominado ExPEC3 (López, 2015).

Las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento (Hernández *et al.*, 2011).

La importancia de determinar la presencia de *E. coli* en un alimento es que el patógeno es un indicador de exposición a heces fecales (Fernández, 2000). Las condiciones óptimas para su crecimiento son: temperatura mínima de 2.5 °C y máxima de 45 °C; puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y congelación (Hernández *et al.*, 2011).

E. coli O157:H7 es la cepa STEC más frecuentemente aislada en Norteamérica, también es el serotipo más frecuentemente asociado a diarrea hemorrágica y al síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés). La bacteria normalmente vive en el tracto intestinal de animales, particularmente en el ganado (Ferens y Hovde, 2011). Esta bacteria fue reportada por primera vez como un patógeno gastrointestinal en 1982 (Riley *et al.*, 1983). Entre los síntomas de la enfermedad causada por *E. coli* productora de toxina Shiga destacan los calambres abdominales y diarrea, que puede progresar en algunos casos a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica). También puede haber fiebre y vómitos. El periodo de incubación varía entre tres y ocho días, con una mediana de tres a cuatro días. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de diez días, pero en un pequeño porcentaje de los casos (especialmente niños pequeños y ancianos) la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, como el síndrome hemolítico urémico (SHU). El SHU se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (deficiencia de plaquetas) (OMS, 2018).

Se estima que hasta un 10% de los pacientes con infección por *E. coli* productora de toxina Shiga pueden desarrollar SHU, con una tasa de letalidad de 3%-5%. Globalmente, éste es la causa más común de insuficiencia renal aguda en los niños de corta edad. Pueden aparecer también complicaciones neurológicas (como convulsiones, accidente cerebrovascular y coma) en el 25% de los pacientes con SHU, así como secuelas renales crónicas, generalmente leves, en aproximadamente un 50% de los supervivientes (Wang *et al.*, 2013; OMS, 2018).

3.1.2 *Salmonella* (*Salmonella* Enteritidis)

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y se caracteriza por ser bacilos móviles Gram negativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, además de ser ubicuos en humanos, ganado, reptiles y aves. Se considera que el género *Salmonella* consta de dos especies, *S. entérica* y *S. bongori*, la primera está dividida a su vez en seis subespecies: *S. entérica* subespecie *enterica*, *S. enterica* subespecie *salamae*, *S. entérica* subespecie *arizonae*, *S. entérica* subespecie *diarizonae*, *S. enterica* subespecie *houtanae* y *S. enterica* subespecie *indica* (Popoff y Le Minor, 1992).

Son considerados como habitantes de la microbiota normal, sin embargo, casi todos los miembros del género son potencialmente patógenos, y en ocasiones bajo condiciones de higiene inapropiadas pueden presentarse contaminando alimentos y causar salmonelosis que actualmente es el padecimiento asociado al consumo de alimentos mayormente reportado en Estados Unidos (FDA, 2017). En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*, con frecuencia el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de estas para la salud de los seres humanos. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella* (Calva *et al.*, 2006).

La salmonelosis se desencadena posterior a un periodo de incubación de 6 a 48 h, en las cuales el microorganismo se multiplica y coloniza el tracto digestivo (Tortora, 1995; Pommerville, 2004), bajo cinco diferentes síndromes clínicos que se presentan de forma exclusiva o superpuesta, y que corresponden a los siguientes: portador asintomático, gastroenteritis aguda, bacteriemia, infecciones focales (meningitis, osteomielitis o abscesos) y fiebre tifoidea (OPS, 2017).

Gente sana infectada con *Salmonella* spp. a menudo experimentan fiebre, diarrea (que puede ser sanguinolenta), náuseas, vómitos y dolor abdominal. En raras circunstancias, la infección puede provocar que el organismo entre en el torrente sanguíneo y produzca enfermedades más graves, como infecciones arteriales (es decir, aneurismas infectados), endocarditis y artritis. Los grupos más vulnerables a quienes puede causar infecciones graves y en ocasiones fatales son niños pequeños, personas frágiles o de edad avanzada y personas con sistemas inmunitarios debilitados. (Rodríguez *et al.*, 1998, 2006c; Benenson *et al.*, 2001).

3.2 Mecanismos de penetración y sobrevivencia de enteropatógenos en plantas

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

Uno de los mecanismos que se ha estudiado es la comunicación de las bacterias por medio de señales químicas para detectar la densidad celular y coordinar la expresión de genes (Hughes y Sperandio, 2008). Este proceso es conocido como detección del quórum

sensing (QS). Algunos microorganismos como *E. coli* O157:H7 utiliza las señales del QS para comunicarse con las plantas, y para regular la expresión de genes de virulencia y genes flagelares (Carey *et al.*, 2009), que le permitirían reconocimiento y movilidad en plantas.

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

Saldaña *et al.* (2011) reportan que *E. coli* O157:H7 utiliza el sistema de secreción tipo III, específicamente T3SS, para abrir las células guarda de los estomas de hojas de espinaca, esta acción permite la internalización de la bacteria en el tejido vegetal.

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

La introducción de este patógeno humano en las primeras etapas de desarrollo de la planta ha sido documentado por Jablason *et al.* (2005). En este trabajo *E. coli* O157:H7 logró

internarse en las plántulas. Los autores reportaron que la bacteria coloniza preferentemente las uniones de la raíz. Puesto que las uniones de raíz son sitios que liberan exudados, se convierten en posibles puertas para que las bacterias inicien el proceso de internalización. Lugtenberg *et al.* (2001) sugiere que, en las zonas de unión en la raíz, las bacterias pueden tener más acceso a los nutrientes que otros sitios, y por lo tanto cuando las bacterias se mantienen por un largo periodo sobre las plantas, las posibilidades de ingresar a la plántula en desarrollo incrementan. Muchos estudios han demostrado que patógenos de humanos (*E. coli* y *Salmonella* spp.) son capaces de entrar por las aberturas naturales en la epidermis de la planta, tales como las cavidades sub-estomatales de las hojas (Brandl y Amudson , 2008; Erickson, 2012; Kroupitski *et al.*, 2009). Una vez que las bacterias se encuentran dentro de la planta, y las células de guarda se cierran, las bacterias quedan protegidas de la mayoría de los sanitizantes superficiales (Gomes *et al.*, 2009). Por lo tanto, mientras un patógeno posee la capacidad de entrar en los tejidos vegetales, los riesgos a la salud humana están latentes (Deering *et al.*, 2012; Warriner *et al.*, 2003a, b) puesto que el patógeno está protegido del proceso de lavado y de muchos desinfectantes industriales (Burnett y Beuchat, 2000).

3. 3 Métodos de identificación de enteropatógenos

La necesidad de separar las cepas patógenas de las no patógenas, así como la diferenciación entre los diferentes grupos de especies ha hecho que se desarrollen sistemas de clasificación intraespecíficos. Sin embargo, no existe un método ideal y usualmente se deberá disponer de los recursos necesarios para aplicar varios métodos para poder identificar una cepa en el enterogrupo que le corresponda (García y Mendoza, 2014), tales como:

3.3.1 Marcadores fenotípicos

Son biotipado, serotipado, antibiograma y ensayos de adherencia en cultivos celulares, los cuales detectan características expresadas por los microorganismos (Reynoso *et al.*, 2015).

3.3.2 Marcadores genotípicos

En estos métodos encontramos a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en campo pulsado (ECP), análisis plasmídicos, análisis de enzimas de restricción (REA), restricción de fragmentos de amplio poliformismo (RFLP), entre otros, los cuales se basan directamente en características del ADN cromosomal y extracromosomal (Reynoso *et al.*, 2015).

En la mayoría de los casos la identificación no se realiza en base a un solo método, sino a la combinación de más de uno. Ejemplo: identificación de bacterias en base a criterios morfológicos, tinción diferencial, pruebas bioquímicas, serológicas y pruebas moleculares (García y Mendoza, 2014; Reynoso *et al.*, 2015).

3.3.3 Métodos basados en criterios morfológicos

Los rasgos morfológicos (estructurales) han ayudado a los taxónomos por muchos años a clasificar organismos. La morfología en general es fácil de estudiar y analizar particularmente, las características estructurales dependen de la expresión de muchos genes que son usualmente estables y normalmente (al menos en eucariotas) no presentan gran variación con los cambios ambientales. Algunas de las características morfológicas empleadas en la identificación de microorganismos son: tamaño y forma celular,

morfología de colonias, características ultraestructurales, entre otras (Reynoso *et al.*, 2015).

3.3.4 Métodos basados en tinción diferencial

Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando una lámina que fue sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana. La mayor parte de las bacterias teñidas con Gram, las podemos clasificar como Gram positivas o Gram negativas (Reynoso *et al.*, 2015).

3.3.5 Métodos basados en pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas han sido ampliamente utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos y la producción de compuestos coloreados, entre otros. Aún bacterias fuertemente relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes en base a pruebas bioquímicas. Por ejemplo, las bacterias entéricas Gram negativas forman un grupo muy grande y heterogéneo cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales. Esta familia, Enterobacteriaceae, incluye a varios patógenos que causan síndromes diarreicos. Un gran número de ensayos han sido desarrollados con el objeto de identificar rápidamente al patógeno, para que posteriormente el profesional médico, en base al informe, indique el tratamiento adecuado o para que los epidemiólogos puedan localizar la fuente de la infección (García y Mendoza, 2014; Reynoso *et al.*, 2015).

3.3.6 Serotipificación

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y vías de transmisión (Terragno *et al.*, 2003).

De los sistemas más frecuentemente utilizados en la clasificación intraespecífica es el serotipado de enterobacterias, está basado en el método descrito por Kauffmann (Kauffman, 1956). 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 (Gyles, 2007; Kaper, 2004; Scheutz y Strockbine, 2005).

En la actualidad para *E. coli* 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).

Mientras que para las células de *Salmonella* las cepas se clasifican en serotipos en la base de la amplia diversidad de lipopolisacárido (LPS) de antígenos (O) y antígenos flagelares proteínas (H), de conformidad con el esquema de Kauffmann-White, y se han descrito más de 2500 serotipos (Popoff y Le Minor, 2005).

3.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El avance en la Biología Molecular permitió el desarrollo de diversos métodos alternativos para la detección de bacterias patógenas a partir de diferentes matrices alimentarias, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser muy específicos. Tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que implica tecnologías moleculares basadas en la amplificación *in vitro* del ADN (Malorny, 2004).

La técnica de PCR se basa en el principio de complementariedad de bases del ADN y en la participación de la enzima polimerasa que permite la extensión del fragmento a amplificar, agregando nucleótidos en secuencia complementaria al ADN molde por medio de un proceso cíclico que comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión (Palomino y González, 2014).

3.4 Normatividad para la determinación de calidad microbiológica en México.

La globalización de la economía ha influido en modelos de alimentación, cada día los consumidores exigen alimentos más sanos e inocuos, por lo que la inocuidad alimentaria constituye un factor clave en el comercio internacional de los alimentos. Muestra clara es la inspección de alimentos en las fronteras y las notificaciones de autoridades sanitarias a países exportadores, debido a la presencia de contaminantes, principalmente microorganismos patógenos (Sánchez, 2014).

Es por ello por lo que el gobierno mexicano tiene como prioridad el establecimiento de políticas que promuevan y regulen la instrumentación de sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) en las unidades de producción y procesamiento

primario de origen agrícola. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) es el encargado de los aspectos sanitarios y de inocuidad en la producción agroalimentaria (SAGARPA, 2016).

El objetivo del SENASICA se desprende directamente de la Meta Nacional 4 del Plan Nacional de Desarrollo (2013-2018) que tiene como objetivo construir un sector agropecuario y pesquero que garantice la seguridad alimentaria del país, a través de los SRRC en la producción primaria de vegetales y así seguir las medidas y procedimientos establecidos por la secretaria en base a lo dispuesto por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) (Sánchez, 2014). Se presenta un listado de las más utilizadas:

- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.
- NOM-109-SSA1-1994 Bienes y servicios. Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- NOM-120-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

- NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.
- NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

III. Justificación

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial y México es uno de los principales productores, se puede ingerir industrializado y en fresco, consumo mayormente recomendado por los aportes nutrimentales y su relación con prevención de diversas enfermedades. Sin embargo, uno de los problemas por esta forma de consumo ha sido el incremento de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) causadas principalmente por patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella*. Productos exportados de México como melón, mango, papaya, chile, pepinos y tomates han sido vinculados a brotes en Estados Unidos principalmente. Aunque existe estudios que documentan que provoca la contaminación del producto durante su cadena de producción que incluye: pre cosecha, cosecha y los procesos de distribución y empaque. Se sabe poco como pueden encontrar como hospederos alternos a plantas y frutos de cultivos. En este contexto el presente trabajo se planteó con el objetivo detectar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* en cinco localidades productoras de tomate en invernadero del Estado de México, así como evaluar la capacidad de *Escherichia coli* y *Salmonella* serovar Enteritidis de penetrar y permanecer en plantas y frutos de tomate.

IV. Hipótesis

Bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella* serovar *Enteritidis* tienen la capacidad de penetrar, permanecer y moverse en plantas y frutos de tomate.

V. Objetivos

Objetivo General

- Evaluar la capacidad de *Escherichia coli* y *Salmonella* serovar *Enteritidis* de penetrar, permanecer y moverse en plantas y frutos de tomate.

Objetivos específicos

- Detectar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* en cinco localidades productoras de tomate en invernadero del Estado de México.
- Determinar la capacidad de *Escherichia coli* y *Salmonella* para moverse y persistir al interior de la planta y llegar al fruto.
- Identificar en qué etapa del cultivo existe mayor posibilidad de contaminación.
- Establecer la relación existente planta – patógeno.
- Confirmar por medio de técnicas bioquímicas y moleculares la presencia de los patógenos inoculados.

VI. Materiales y métodos

La presente investigación comprendió dos etapas, que a continuación se describen.

6.1 Etapa I: Calidad microbiológica de tomate producido bajo condiciones de invernadero en cinco municipios del Estado de México.

Durante el ciclo Agrícola 2013 fueron muestreados cinco municipios del Estado de México (Figura 8). Se eligieron localidades con mayor superficie de siembra, el muestreo se realizó en los municipios de Coatepec Harinas, Tonicato, Texcaltitlán, Toluca y Huixquilucan (Cuadro 1).

Municipio	Altitud (m.s.n.m.)	Latitud (N)	Longitud (O)
Coatepec Harinas	2260	18° 48' 08"	99° 42' 56"
Huixquilucan	3500	19° 18' 07"	99° 14' 10"
Texcaltitlán	2410	18° 51' 04"	99° 51' 26"
Toluca	2600	18° 59' 2"	99° 31' 43"
Tonicato	1650	18° 48' 00"	99° 40' 00"

Cuadro 1. Ubicación zona de estudio

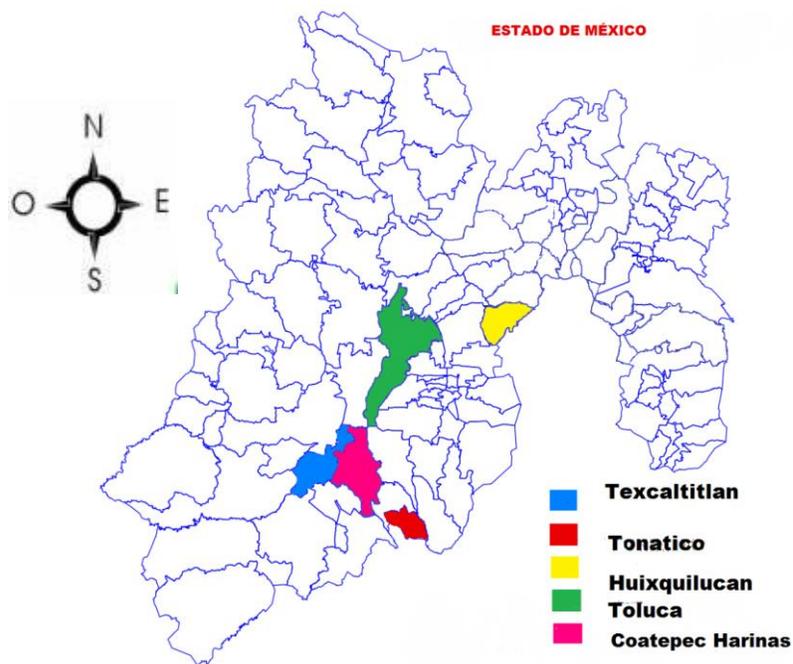


Figura 8. Municipios del Estado de México muestreados.

6.1.1 Muestreo

Se seleccionaron dos invernaderos por cada municipio éstos tuvieron en promedio una dimensión de 500 m² (Figura 9). La variedad empleada fue Cid de Harris Moran, tomate tipo saladette de larga vida de anaquel.



**Figura 9. Cultivo de tomate. Tonicato, Edo. México.
Foto: Ocaña de Jesús, 2013.**

Como primera fase se realizó un checklist para observar las prácticas agrícolas que presentaban como origen de la plántula; realización del tutoreo, podas, fertilización y cosecha; origen del agua de riego; el almacenamiento del producto cosechado, así como la practicas llevadas a cabo por los trabajadores y la presencia de animales al interior de los invernaderos.

Posteriormente se colectaron de manera aleatoria 10 frutos de cada invernadero, en forma de zig-zag cubriendo toda la zona. El total de las muestras colectadas fue de 100 frutos de tomate de tamaño homogéneo, que presentaban una coloración rojiza (Figura 10).



Figura 10. Frutos de tomate muestreados.
Foto: Ocaña de Jesús, 2013.

Todo el material fue recolectado y transportado de acuerdo con lo indicado por 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”. De igual forma se muestreo el agua empleada para el riego y el suelo en el que se desarrolló el cultivo (Figura 11).

Se tomaron 100 mL de agua de cada invernadero al inicio del muestreo siguiendo las características indicadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002.

Para el suelo se recolectaron muestras compuestas de 5 puntos del invernadero, tomando las 4 esquinas y el centro a una profundidad de 20 cm. El suelo no se desinfectó y no recibió ningún tratamiento contra bacterias. De un total de 50 submuestras se formaron



Figura 11. Agua utilizada para riego de cultivo de tomate. Foto: Ocaña de Jesús, 2013.

10 compuestas. Los análisis en su totalidad fueron procesados en el Laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

6.1.2 Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras se utilizó 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”.

El fruto completo fue homogeneizado en una licuadora marca (Osterizer). Un mL de este se diluyó en 9 mL de agua peptonada salina esteril (0,1% peptona + 0,85% NaCl). De la muestra compuesta de suelo se tomó 1g y diluyó en 9 mL de agua destilada estéril. En ambos casos, las muestras fueron analizadas con las diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} . Para el caso del agua, no se realizaron diluciones y se sembró de forma directa en los diferentes medios de cultivo para cada microorganismo.

6.1.3 Mesófilos Aerobios

Una vez preparadas las diluciones de las muestras la determinación de bacterias mesófilas aerobias se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, se empleó la técnica de vertido en placa. Para ello se tomó una alícuota de 1000 µl de cada dilución y se colocó en el centro de una placa Petri estéril, posteriormente se agregaron de 25 a 30 mL de agar para cuenta estándar (BIOXON). Fundido y mantenido a 45 °C, se mezcló mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás a adelante, sobre una



Figura 12. Mesófilos Aerobios en agar cuenta estándar.
Foto: Ocaña de Jesús, 2013.

superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Se incubaron las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron todas las colonias principalmente las placas con 25-250 colonias. Cada muestra se plaqueó por duplicado; además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo (Figura 12).

6.1.4 Coliformes Totales

Para la determinación de coliformes totales una vez realizadas las diluciones se siguió la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, se emplearon las técnicas de siembra por vertido en placa y la de doble capa de agar. Se transfirieron alícuotas de las diluciones de la muestra a placas de Petri estériles y posteriormente se agregaron de 15 a 20 mL de agar Bilis Rojo Violeta (BRV-marca BIOXON), fundido y mantenido a $45 \pm 1,0$ °C se

mezcló mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Posteriormente se añadieron cuatro mL del medio RVBA a $45 \pm 1,0$ °C en la superficie del medio inoculado. Se incubaron las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. Después del periodo especificado para la incubación se seleccionaron las placas que contenían entre 15 y 150 colonias típicas de color rojo oscuro, rodeadas de un halo

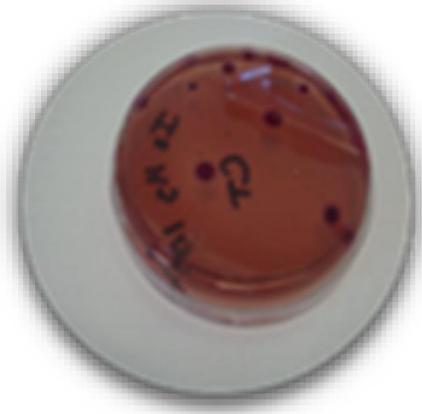


Figura 13. Crecimiento de Coliformes Totales en agar BRV. Foto: Ocaña de Jesús, 2013.

de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm. Cada muestra se plaqueó por duplicado, además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo (Figura 13).

6.1.5 Coliformes fecales

Para la determinación de Coliformes Fecales se realizó de acuerdo con la norma NF V08-060 (1996) de la Organización Nacional Francesa para la Estandarización (AFNOR). La cual marca la misma metodología seguida para los Coliformes Totales solo que a una temperatura de incubación de 45 ± 2 °C durante 24 h. A partir de las placas de Coliformes Fecales, se tomaron colonias representativas de las mismas, por picadura en el agar y se transfirió cada una a medios diferenciales y específicos (Figura 14), de igual forma se les realizó la prueba diferencial de Gram.

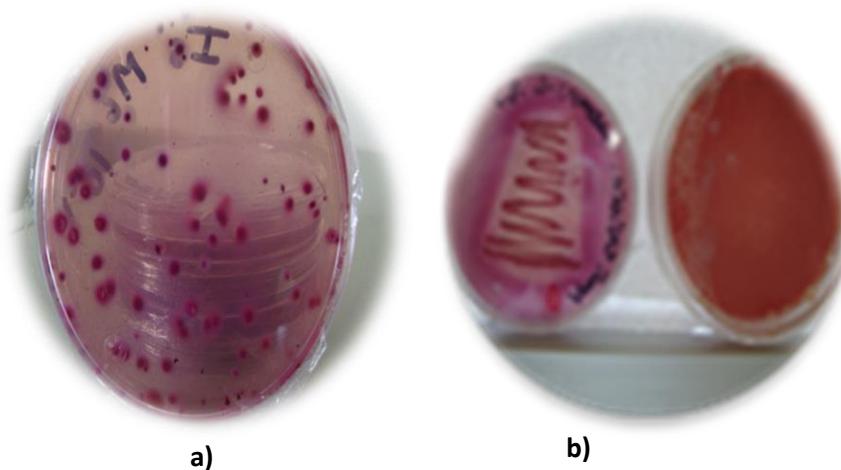


Figura 14. a) Crecimiento de Coliformes Fecales en agar BRV, b) Picadura en agar MacConkey. Foto: Ocaña de Jesús, 2013.

6.1.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Para detectar diferencias entre localidades se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza ($p \leq 0,05$) para localidades. Al haber diferencias significativas se compararon los promedios mediante la prueba de DMS ($p \leq 0,05$). A tal efecto se utilizó el programa Stat Graphics plus 5.0, 1999-2000. Los datos de los microorganismos analizados (Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Fecales) se reportaron en UFC/mL, y se compararon con los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Esta NOM indica que para Mesófilos Aerobios el LMP debe ser ≤ 150000 UFC/mL. La misma no contempla Coliformes Totales. Sin embargo, en este estudio se consideró como indicador de calidad. Para Coliformes Fecales, la muestra no debe exceder de 100 UFC/mL.

6.2 Etapa II: Penetración y permanencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* en plantas y frutos de tomate.

Para evaluar la penetración, permanencia y movilidad de las bacterias en plantas en condiciones de invernadero se tuvo el siguiente esquema de trabajo (Figura 15).

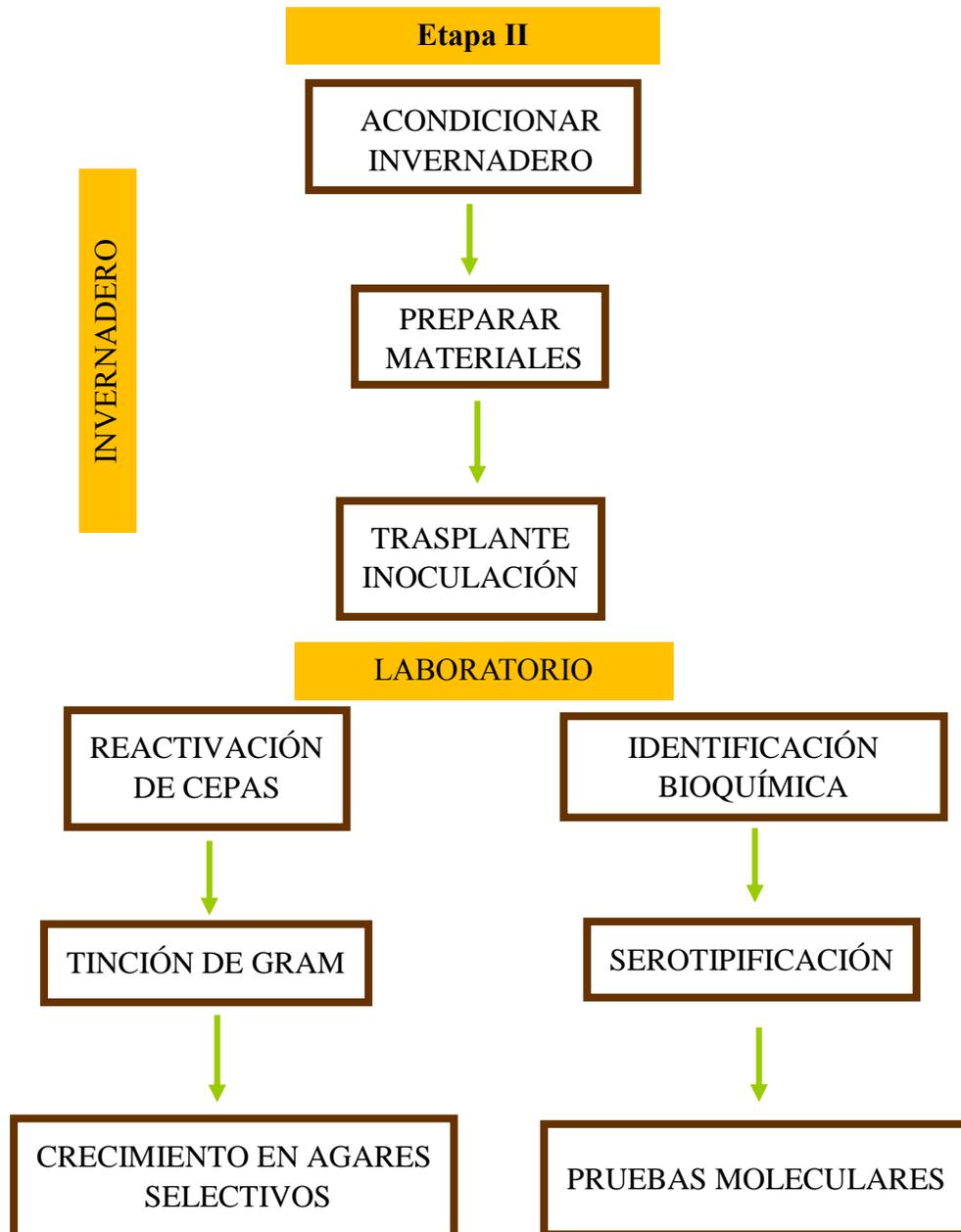


Figura 15. Diagrama de trabajo en invernadero y laboratorio.

El estudio se realizó en el ciclo agrícola mayo a septiembre 2015, en condiciones de invernadero en la Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad autónoma del Estado de México, en el Municipio de Toluca de Lerdo, cuyas coordenadas geográficas corresponden a 19°17'32" norte, 99°39'14" oeste, con una altitud entre de 2600 y 2625 m.s.n.m.

Los análisis fueron procesados en el Laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y Laboratorio de Serotipificación, Unidad de Investigación, Facultad de Medicina (UNAM).

6.2.1 Material vegetal y cepas bacterianas

Se utilizaron plántulas variedad “Cid” tomate tipo saladette, que se obtuvieron en bandejas de germinación, estas fueron trasplantadas en macetas de 35 x 35 cm. Para la siembra se utilizó una mezcla de sustrato (40% suelo de campo, 40% lombricomposta y 20% tepojal), (Figura 16) esterilizada previamente por medio de un método químico (SAGARPA, 2010). El riego se realizó diariamente con agua de pozo; las plantas se conservaron en condiciones de invernadero durante todo el ciclo de producción. Antes de comenzar los ensayos, se realizaron análisis microbiológicos de las plántulas, la mezcla de sustrato y el agua de riego (con evaluación periódica durante el desarrollo del cultivo) para descartar la presencia de organismos coliformes termotolerantes y de *E. coli*.

De las cepas utilizadas, dos de ellas fueron de serogrupos desconocidos y se obtuvieron de cultivos de tomate de la región de Texcaltitlán (Ocaña *et al.*, 2015) y de espinaca de la

zona de Calimaya (EcH); la tercera fue una cepa del serogrupo O157:H7 (STEC) y la cuarta *Salmonella* serovar Enteritidis donada por el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Las cepas fueron almacenadas en una solución agua-glicerol (50:50) a -20 °C.

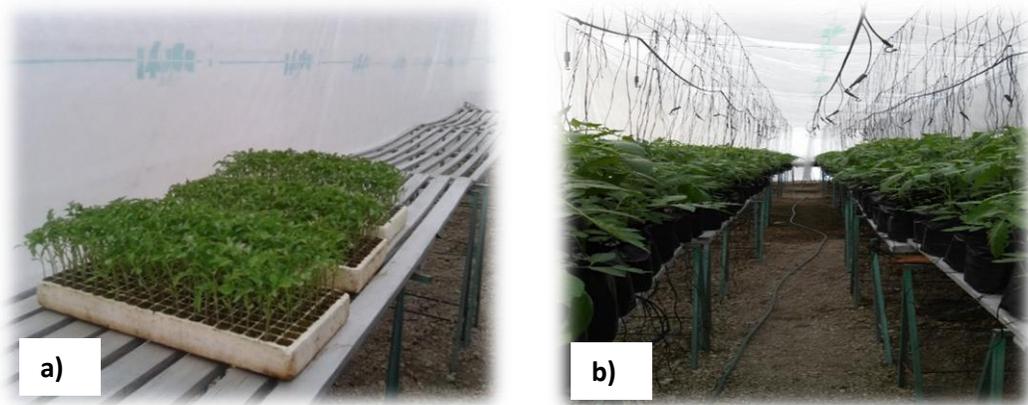


Figura 16. a) Plántula de tomate variedad Cid, b) Desarrollo de cultivo en invernadero. Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

6.2.2 Caracterización fenotípica



Figura 17. Reactivación de cepas bacterianas.

Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

Antes del establecimiento del experimento en invernadero, las bacterias se reactivaron en caldo soya tripticaseína (CST), se hicieron crecer en medios selectivos agar MacConkey (DIBICO), eosina azul de metileno (DIBICO) y agar cromogénico *E. coli* O157:H7 (DIBICO) (Figura 17).

Para la confirmación de la identidad de las cepas bacterianas, se realizó una serotipificación y PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Para la serotipificación se siguió el método propuesto por Orskov *et al.* (1977) y

recientemente actualizado por Scheutz *et al.* (2004). Se usaron 181 antisueros somáticos y 56 antiflagelares, que corresponden al esquema antigénico de *E. coli* (Kauffmann *et al.*, 1956; Winn, 2008).

Para la determinación del grupo filogenético se realizó la PCR descrita por Clermont *et al.* (2000), en función de la combinación de tres marcadores de ADN (*chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE.4C2), que clasifica a los aislados de *E. coli* dentro de uno de los cuatro grupos filogenéticos establecidos: A, B1, B2 y D.

Para determinar la presencia de genes relacionados con cepas diarreogénicas [*Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC): *lt* y *st*; *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC): *stx1* y *stx2*; *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC): *bfpA* y *eaeA*], se realizó la PCR multiplex descrita por López *et al.*, 2003).

6.2.3 Inoculación

Para la inoculación en el sustrato, se emplearon 100 macetas por tratamiento con un volumen de 300 mL de suspensión bacteriana para cada cepa, con un promedio de $2,5 \times 10^3$ UFC/ml en agua peptonada bufferada (BPA) 0,1%. La solución se infiltró en el sustrato sin salpicar la planta (Figura 18). Este tratamiento (INC1)



Figura 18. Inoculación de cultivo de tomate aplicada al sustrato.
Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

se realizó a los 7 días después del trasplante, con el objetivo de observar si las cepas podían entrar y transportarse a las diferentes partes de la planta. A partir de esta inoculación se

monitoreó durante los 120 días que duró el cultivo, incluyendo la etapa vegetativa, la floración, el fructificación y la madurez fisiológica.

En otro grupo de plantas, se realizó la inoculación por medio de una punción en la etapa vegetativa en el tallo, en el peciolo en floración y en el pedúnculo en la fructificación (Figura 19). Eso se hizo con la finalidad de determinar la capacidad de las tres cepas de *E. coli* y *Salmonella* de perdurar en los tejidos internos del tomate, tras su ingreso a través de algún tipo de herida. Para realizar las punciones, los cultivos se hicieron crecer en agar MacConkey (DIBICO) y con palillos previamente esterilizados se tomó aproximadamente $1,8 \times 10^3$ UFC de masa bacteriana (dicho valor se obtuvo mediante recuento en placa).



Figura 19. Inoculación por punción en plantas de tomate.
Foto: Ocaña de Jesús, 2015.

6.2.4 Toma de muestra

Se colectaron muestras de raíz (R), tallo (T) flor (Fl) y fruto (Fr) a los 30, 55, 90 y 120 días después del trasplante (ddt). Todo el material fue colectado y transportado de acuerdo con lo indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994.

Para la preparación de las muestras, se utilizó el método microbiológico indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. A 10 g de tejido se le adicionaron 90 mL de BPA 0,1% y se homogeneizó en una licuadora marca Osterizer. De la suspensión obtenida se tomó 1 mL para hacer siembra directa por duplicado en placas con agar BRV (BIOXON), las cuales se incubaron a una temperatura de 45 ± 2 °C. Después de 24 h de incubación, se realizó el recuento de colonias lactosa positivas para *E. coli*, las cuales se estriaron en agar MacConkey (BIOXON), agar cromogénico O157:H7 (DIBICO) y agar de eosina y azul de metileno (BIOXON). Estas placas se incubaron a 35 °C por 24 ± 2 h. La detección de *Salmonella* en plantas y frutos de tomate se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Las etapas fueron: preenriquecimiento en APA 0.1% para restaurar las células de *Salmonella* a una condición fisiológica estable; enriquecimiento en caldo soya tripticaseina (CST) con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra; selección en medios sólidos-selectivos agar *Salmonella Shigella* (BD BIOXON) y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (DIBICO) que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias.

Para confirmar la presencia de *E. coli* y *Salmonella* Enteritidis se tomó como referencia el crecimiento característico para cada medio selectivo y diferencial empleado (Figura 20), así como los resultados de las pruebas IMViC (producción de indol, movilidad, prueba de rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato de Simmons), complementadas con producción de ureasa y de ácido sulfhídrico, y con descarboxilación de ornitina (Winn *et al.*, 2008). Dichos análisis se realizaron en las cepas antes de la inoculación y a las colonias recuperadas durante el experimento. En las plantas testigo sin inocular se monitoreo la ausencia de los patógenos en estudio.

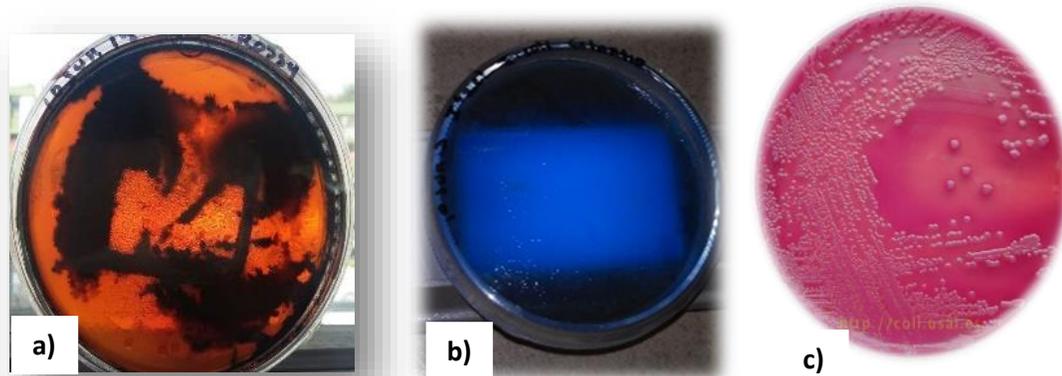


Figura 20. a) Crecimiento de *Salmonella* Enteritidis en agar Salmonella Shigela, b) *E. coli* O157:H7 en agar cromogenico y c) *E. coli* recuperada en tomate en agar MacConkey. Fotos: Ocaña de Jesús, 2015.

6.2.5 Diseño experimental

Se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad “Cid”) en condiciones de invernadero, en el que se establecieron cuatro tratamientos, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (EcH O105ab), T4 (*Salmonella* Enteritidis), con 100 plantas por tratamiento. Se emplearon cuatro diferentes formas de inoculación: al sustrato, al tallo, al pecíolo y al pedúnculo. El muestreo implicó la colecta de 20 plantas en cada etapa fenológica para cuantificar en placa las UFC/g, y así para saber si las bacterias lograban moverse hacia órganos no inoculados: la raíz, el tallo, la flor y el fruto.

Los resultados fueron evaluados por un ANDEVA bifactorial ($p < 0,05$) para recuento en raíz, tallo, flor y fruto por cepa, forma de inoculación e interacción entre estas variables. Frente al hallazgo de diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey al 5% para identificar la cepa, la vía de inoculación y la interacción que llevaron a los mayores

recuentos. Para ello se empleó el programa estadístico Statical Analysis Software, SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

VII. Resultados

Derivado de los resultados obtenidos a partir de la presente investigación se realizaron tres artículos científicos como a continuación se indica:

1. En el primero se consideraron los resultados obtenidos durante el ciclo agrícola 2013 para determinar la calidad microbiológica de tomate producido bajo condiciones de invernadero, titulado "**Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México**", este artículo se encuentra ya publicado en la revista (**Phyton**) **International Journal of Experimental Botany**, Vol. **84**. **Número 1 (2015)**.
2. Derivado de los resultados de la segunda etapa se cuenta con un artículo aceptado titulado "**Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**" en la revista **Argentina de Microbiología**.
3. Un tercer artículo titulado "**Movilidad y sobrevivencia de *Salmonella* serovar Enteritidis en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.)**" se envió a la revista **Salud Pública de México** del Instituto Nacional de Salud Pública, el cual se encuentra en proceso de revisión.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada una de las etapas en el orden descrito.

ARTÍCULO I. Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México.

Del análisis de la información obtenida en este apartado se realizó un artículo científico que se encuentra ya publicado en la Revista Argentina **(Phyton) International Journal of Experimental Botany**, Vol. 84 Número 1 (2015). Dicha revista se encuentra indexada en Thomson Scientific; Science Citation Index Expanded (SCIE); Journal Citation Report / Science Edition (JCR); Biological Abstracts; BIOSIS Previews; Field Crop Abstracts; Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas; CAB Abstracts; CAB Full Text; Periódica; EMBiology; Latindex; Scopus; TEEAL, The Essential Electronic Agricultural Library; SciELO (Scientific Electronic Library Online); Portal de Revistas en Biodiversidad, con ISSN: 0031-9457.

Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México

Microbiological quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) produced under greenhouse conditions in five Municipalities of the State of Mexico

Ocaña-de Jesús RL, AT Gutiérrez-Ibáñez, JR Sánchez-Pale, MD Mariezcurrena-Berasain, G Velázquez-Garduño, A Laguna Cerda, I Rojas Puebla

Resumen. El objetivo de la presente investigación fue determinar la calidad microbiológica de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producidos bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México. Los estudios se condujeron durante el ciclo de producción 2013, para conocer los posibles riesgos y aplicar estrategias de prevención previo a su consumo. Se realizó un análisis microbiológico de muestras de agua de riego, suelo y de 100 frutos de tomate de la variedad Cid para determinar Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Se utilizó la metodología según las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-109-SSA1-1994, NOM-110-SSA1-1994, NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, NOM-093-SSA1-1994 y la Normatividad de la Organización Nacional Francesa para la Estandarización (AFNOR) NF V08-60, así como la NOM-093-SSA1-1994, que establecen los límites permisibles para los microorganismos en estudio. Los resultados obtenidos en agua para Coliformes Totales y Fecales se hallaron dentro de los parámetros permitidos por la norma NOM-127-SSA1-1999. El análisis realizado en suelo demostró la ausencia de estos microorganismos y no existieron parámetros de comparación para estas categorías. Para los frutos, el nivel de microorganismos de Mesófilos Aerobios se encontró dentro de los límites máximos permitidos por la norma NOM-093-SSA1-1994; el mayor promedio para estos microorganismos (10083,80 UFC/mL) se halló en el municipio de Texcatitlán. Para Coliformes Totales, Huixquilucan mostró 2266,84 UFC/mL. Para Coliformes Fecales, los municipios de Coatepec Harinas y Texcatitlán sobrepasaron el límite permitido por la misma norma con 134,85 UFC/mL y 210,142 UFC/mL, respectivamente. Se encontraron valores de microorganismos Mesófilos Aerobios que fueron de 630 a 5131 UFC/mL, habiendo diferencia entre Localidades ($p \leq 0,05$); para Coliformes Totales y Fecales la diferencia no fue significativa ($p > 0,05$).

Palabras clave: Hortaliza; Patógenos; Mesófilos Aerobios; Coliformes Totales y Fecales.

Abstract. The aim of the current research was to determine tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microbiological quality produced under greenhouse conditions in 5 municipalities of the State of Mexico. Studies were conducted during the 2013 production cycle to know the risks and apply prevention strategies prior to its consumption. A microbiological analysis of samples of irrigation water, soil and 100 tomato fruits variety cid was performed to determine Aerobic Mesophiles, Total Coliforms and Fecal Coliforms. The methodology used were those according to the Official Mexican Standards NOM-109-SSA1-1994, NOM-110-SSA1-1994, NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, and the Regulations of the National French Organization for Standardization (AFNOR) NF V08-60, and NOM-093-SSA1-1994, which establish the allowable limits for the study microorganisms. The results showed a zero level of pollution in water and soil samples. For fruits, levels of Aerobic Mesophilic were within the maximum limits permitted by the standards. The municipality of Texcatitlan showed the highest average for these microorganisms (10083.80 CFU/mL). Huixquilucan showed 2266.84 CFU/mL for Total Coliforms. For Fecal Coliforms, municipalities of Coatepec and Texcatitlan exceeded the allowed limit.

Keywords: Vegetable; Pathogen; Aerobic Mesophilic; Total and Fecal Coliforms.

México (FCA-UAEMex) Campus Universitario "El Cerrillo" Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km. 15 entroke al Cerrillo Toluca, Edo de México C.P. 50200, México. Tel +52 1(722) 2965518, 2965529, 2965531 Ext. 192.
Address Correspondence to: Ana Tarín Gutiérrez-Ibáñez, e-mail: atarini@uaemex.mx
Recibido / Received 10.III.2014. Aceptado / Accepted 2.V.2014.

ΦΥΤΟΝ ISSN 0031 9457 (2015) 84: 45-50

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción y consumo de hortalizas ha tomado una gran importancia debido a que forman parte de la dieta del ser humano por su fácil acceso y gran disponibilidad. Uno de los factores de aceptación de los productos hortícolas es su condición de inocuidad como índice de calidad, que puede abrir nuevos mercados. Por tal razón, en la producción y comercialización del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se deben considerar medidas preventivas de inocuidad. Esto se debe a que su ingesta en forma cruda puede verse afectada por la presencia de microorganismos patógenos tales como: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Montevideo (Escartín, 2000; Iturriaga et al., 2007). Dichas especies se han asociado con múltiples brotes de enfermedades gastrointestinales, siendo el principal agente causal *Salmonella* spp. En Estados Unidos se han reportado brotes de enfermedades causados por esta bacteria por consumo de germinados (Mahon et al., 1997), tomate (Cummings et al., 2001), rebanas de sandía (Blostein, 1993) y de melón *Cucumis melo* (Ries et al., 1990), y por consumo de lechuga fresca asociada con *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella* spp (Kapperud et al., 1995). Es importante resaltar que los patógenos de humanos pueden alojarse tanto en la parte externa como interna de las frutas y hortalizas, minimizando la eficiencia de procesos como el lavado y la desinfección (Bartz y Showalter, 1981; Guo et al., 2001; Ibarra-Sanchez et al., 2004; Luna et al., 2006).

En junio de 2008, la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) lanzó una alerta sanitaria a productores de tomate sinaloense por un posible brote de *Salmonella* (Pérez, 2008). La calidad microbiológica del fruto se puede ver afectada por diferentes fuentes de contaminación, encontrándose entre estas el agua de riego y los suelos de cultivo contaminados (Iturriaga et al., 2007), malas prácticas de cultivo y recolecciones inadecuadas (Orosco et al., 2008). A la fecha se desconoce la situación en la calidad microbiológica del tomate que se produce en el Estado de México.

El objetivo de esta investigación fue determinar la contaminación de origen microbiológico del tomate producido bajo invernáculo en cinco Municipios del Estado de México (Coatepec Harinas, Tonalico, Texcaltitlán, Toluca y Huixquilucan) mediante la identificación de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Esto permitiría identificar posibles riesgos, y aplicar estrategias de prevención, previo a su consumo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el ciclo Agrícola 2013 fue realizado el muestreo en los municipios de Coatepec Harinas, Tonalico, Texcaltitlán, Toluca y Huixquilucan (Tabla 1), debido a que éstas son las localidades que tienen mayor superficie de siembra en el Estado.

PHYTON ISSN 0031 9457 (2015) 84: 45-50

Tabla 1. Ubicación geográfica de los municipios muestreados.
Table 1. Geographical location of the sampled municipalities.

Municipio	Altitud (m.s.n.m.)	Latitud (N)	Longitud (O)
Coatepec Harinas	2260	18° 48' 08"	99° 42' 56"
Huixquilucan	3500	19° 18' 07"	99° 14' 10"
Texcaltitlán	2410	18° 51' 04"	99° 51' 26"
Toluca	2600	18° 59' 2"	99° 31' 43"
Tonalico	1650	18° 48' 00"	99° 40' 00"

Los invernáculos tuvieron en promedio una dimensión de 500 m². La variedad que se utilizó fue Cid de Harris Morán, tomate tipo saladette de larga vida de anaquel. Mismos que presentaron prácticas agrícolas similares de acuerdo a lo indicado por Bautista y Alvarado (2005). Se comenzó con el trasplante de la plántula, la cual en todos los casos se adquiere de manera externa, seguido del tutoreo (tarea llevada a cabo mediante hilo rafia) y la poda, que permite eliminar brotes o chupones para evitar pérdida de nutrientes. La fertilización fue hecha a base de fertilizantes nitrogenados aplicados por medio del riego (fertirrigación). La cosecha se realizó principalmente de manera manual, aunque en ocasiones se utilizaron pinzas. El almacenamiento se efectuó en cajas plásticas negras dentro de los invernáculos.

Los muestreos se efectuaron en dos invernáculos por cada municipio, quienes otorgaron las facilidades para la realización del experimento. De manera aleatoria se colectaron 10 frutos en cada uno, en forma de zig-zag, procurando cubrir toda la superficie del invernáculo. El total de las muestras colectadas fue de 100 frutos de tomate de tamaño homogéneo, que presentaban una coloración rojiza. Todo el material fue recolectado y transportado de acuerdo a lo indicado por 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". Al mismo tiempo, también se tomó una muestra de agua del pozo del cual se obtuvo el agua para realizar el riego siguiendo las características indicadas en la Norma NOM-230-SSA1-2002. Se tomaron 100 mL de cada invernáculo al inicio del muestreo. Se recolectaron muestras compuestas de suelo de 5 puntos del invernáculo, tomando las 4 esquinas y el centro a una profundidad de 20 cm. El suelo no se desinfectó y no recibió ningún tratamiento contra bacterias. De un total de 50 submuestras se formaron 10 compuestas. Los análisis en su totalidad fueron procesados en el Laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Para la preparación de las muestras se utilizó 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".

El fruto completo fue homogeneizado en una licuadora marca (Osterizer). Un mL de éste se diluyó en 9 mL de agua peptonada salina estéril (0,1% peptona + 0,85% NaCl). De la muestra compuesta de suelo, se tomó 1g y diluyó en 9 mL de agua destilada estéril. En ambos casos, las muestras fueron analizadas con las diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} . Para el caso del agua, no se realizaron diluciones y se sembró de forma directa en los diferentes medios de cultivo para cada microorganismo.

Conforme a la Norma NOM-092-SSA1-1994 para bacterias mesófilas aerobias, se utilizó agar para cuenta estándar (marca BIOXON). Se sembró por duplicado cada una de las muestras, incubándose por 48 h a 35 ± 2 °C. El recuento de UFC/mL se realizó siguiendo los lineamientos de esta misma norma.

El recuento de Coliformes Totales se realizó acorde a la norma NOM-113-SSA1-1994 y la de Coliformes Fecales de acuerdo a la norma NF V08-60 (1996) de la Organización Nacional Francesa para la Estandarización (AFNOR).

Para ambas determinaciones, se utilizó agar rojo violeta bilis lactosa (RVBA-marca BIOXON), sembrándose por duplicado cada una de las muestras e incubándose a temperaturas diferentes, para Coliformes Totales a 35 ± 2 °C y Coliformes Fecales a 45 ± 2 °C durante 24 h.

Diseño experimental. Para detectar diferencias entre localidades se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza ($p \leq 0,05$) para localidades. Al haber diferencias significativas se compararon los promedios mediante la prueba de DMS ($p \leq 0,05$). A tal efecto se utilizó el programa Stat Graphics plus 5.0, 1999-2000. Los datos de los microorganismos analizados (Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Fecales) se reportaron en UFC/mL, y se compararon con los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Esta norma indica que para Mesófilos aerobios el LMP debe ser ≤ 150000 UFC/mL. La misma no contempla Coliformes Totales. Sin embargo, en este estudio se consideró como indicador de calidad. Para Coliformes Fecales, la muestra no debe exceder de 100 UFC/mL.

Debido a la presencia de Coliformes Fecales, se realizaron pruebas selectivas y diferenciales para aislar *E. coli* en agar MacConkey, y al obtener una cepa pura se realizó la tinción de Gram (Escartín, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras de agua y suelo analizadas la determinación de Mesófilos Aerobios resultó incontable. No se detectaron Coliformes Totales ni Fecales (Tabla 2). Estos resultados coinciden con lo reportado por Ávila et al. (2008). Estos autores determinaron que la cantidad de microorganismos que pudieran representar riesgos a la salud fueron desde no detectables hasta de muy baja concentración al realizar un análisis del agua con la que eran tratadas frutas y hortalizas.

Tabla 2. Microorganismos Mesófilos Aeróbios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales presentes en agua y suelo.

Table 2. Aerobic Mesophilic Microorganisms, Total Coliforms and Fecal Coliforms in soil and water.

Municipio	Mesófilos Aerobios UFC/mL		Coliformes Totales UFC/mL		Coliformes Fecales UFC/mL	
	AGUA	SUELO	AGUA	SUELO	AGUA	SUELO
Coatepec Harinas	INC	INC	ND	ND	ND	ND
Tonatico	INC	INC	ND	ND	ND	ND
Texcaltitlán	INC	INC	ND	ND	ND	ND
Toluca	INC	INC	ND	ND	ND	ND

UFC: Unidades Formadoras de Colonias; INC: Incontable; ND: No Detectado.

UFC: Units forming microbial colonies; INC: Uncontable; ND: Not detected.

Los datos presentados en la Tabla 3 nos muestran los resultados obtenidos para cada microorganismo.

Tabla 3. Análisis entre Municipios.

Table 3. Analysis between different municipalities.

Variable	Localidad					Valor-p
	Coatepec Harinas	Tonatico	Texcaltitlán	Toluca	Huixquilucan	
Mesófilos Aerobios (UFC/mL)	3999,56 b	2603,01 ab	10083,8 c	630,97 a	5131,49 b	0,0000
Coliformes Totales (UFC/mL)	285,83 NS	1188,58 NS	1751,32 NS	1616,84 NS	2266,84 NS	0,0992
Coliformes Fecales (UFC/mL)	134,85 NS	52,083 NS	210,142 NS	18,366 NS	58,367 NS	0,5186

UFC: Unidades Formadoras de Colonias; NS: No significativo.

UFC: Units forming microbial colonies; NS: Not significant.

Dentro del grupo de Mesófilos Aerobios en fruto existieron diferencias significativas entre localidades. Texcatitlán mostró el valor más alto, aunque ninguna de las localidades sobrepasó el LMP ≤ 150000 UFC/mL (Fig. 1).

Para el caso de Coliformes Totales, no hubo diferencias significativas entre localidades. Sin embargo, Huixquilucan pareció tener mayor presencia de UFC/mL de estos microorganismos, mientras que la menor pareció corresponder a Coatepec Harinas (Fig. 2).

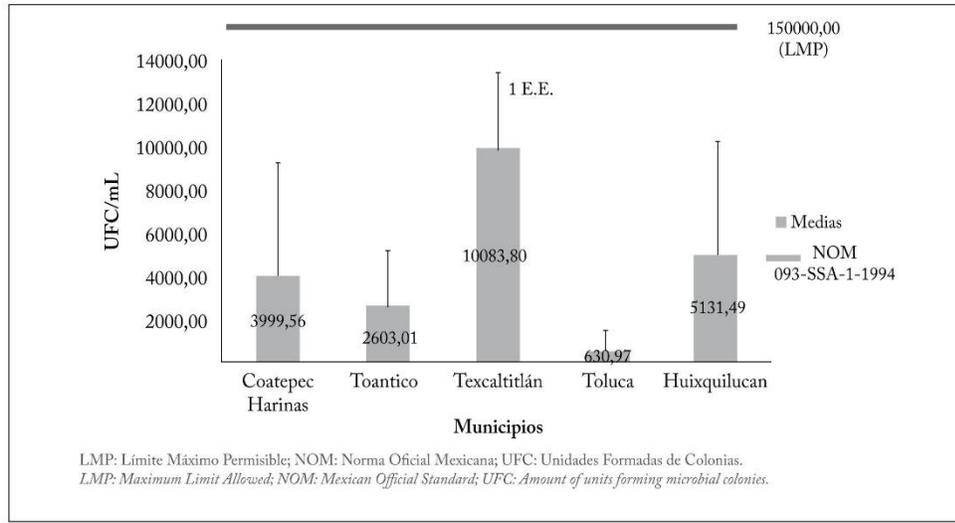


Fig. 1. Microorganismos Mesófilos Aerobios para cada municipio.
 Fig. 1. Aerobic Mesophilic Microorganisms for each municipality.

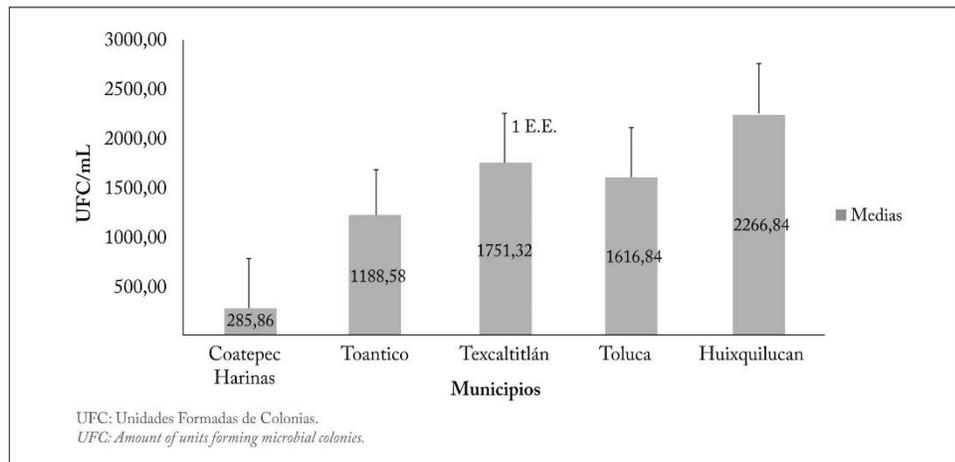


Fig. 2. Coliformes Totales por municipio.
 Fig. 2. Total Coliforms by municipality.

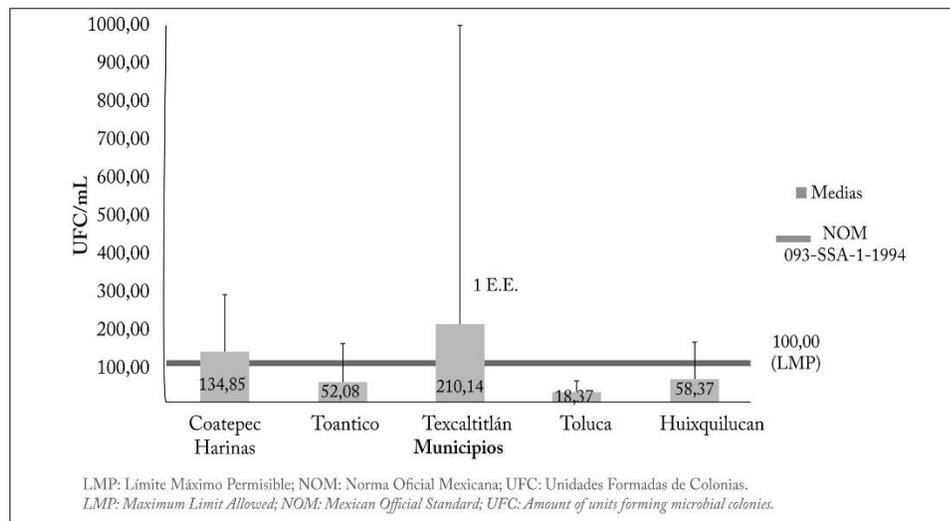


Fig. 3. Coliformes Fecales presentes en las zonas de estudio.

Fig. 3. Fecal coliforms present in the study areas.

En el análisis para Coliformes Fecales no hubo diferencias significativas, pero Texcaltitlán y Coatepec de Harinas parecieron sobrepasar la Normatividad.

Los resultados demostraron la existencia de serios problemas de contaminación y sobrevivencia microbiana dentro de los invernáculos estudiados, sugiriendo que la disminución de los problemas sanitarios relacionados con los frutos está en la educación de los manipuladores (tutorado, deshoje, corte y poda), y personal encargado del control sanitario de esta actividad. Esto es debido a que los trabajadores no utilizan las medidas de control al momento de corte y no usan guantes, así como ningún tipo de desinfectante, coincidiendo esto con lo mencionado por Ávila et al. (2008). En su estudio sobre la calidad microbiológica de hortalizas, entre ellas el tomate, sugirieron tomar acciones correctivas que minimicen los riesgos de contaminación microbiológica durante el proceso de producción, como por ejemplo la capacitación a productores y personal.

Mientras que los Mesófilos Aerobios estuvieron dentro de la Norma, la alta carga microbiana de Coliformes Fecales puede considerarse un riesgo para la Salud Pública. Estos resultados resaltan que el peligro de brotes de enfermedades se puede minimizar protegiendo los productos hortícolas del contacto con heces fecales provenientes de las mismas manos de los trabajadores (al no tener la higiene adecuada) y de los animales domésticos.

Los resultados indicaron la presencia de Coliformes Fecales, debido al crecimiento con producción de gas en el medio

MacConkey. Las células bacterianas pertenecían al grupo de las Gram negativas, por lo que se cree que esta bacteria podría ser *Escherichia coli*. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Luna et al. (2012) quienes reportaron a *Escherichia coli* como una de las bacterias encontradas con mayor frecuencia en esta misma hortaliza.

Al no encontrar contaminación microbiológica en agua y en suelo las posibles fuentes de contaminación pueden ser las malas prácticas de cultivo y recolecciones inadecuadas. Por ejemplo, la falta de uso de guantes y cubre bocas, desinfección y lavado de manos después de ir al baño durante el proceso de producción. Esto puede ocurrir principalmente durante el tutorado, poda y recolección del fruto, que pudieran diseminar los contaminantes fecales, o al contacto con las herramientas, afectando la calidad del producto, como lo mencionan Orosco et al. (2008).

Finalmente, se recomienda la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPM) aplicando la Norma NOM-EM-034-FITO-2000, así como los lineamientos establecidos por SAGARPA-SENASICA-2008. Entre ellos se contempla capacitar a los trabajadores, encargados de campo y empaquera para que reconozcan y eviten actividades que representan un riesgo de contaminación. Es necesario contar con instalaciones sanitarias accesibles, limpias, y con los medios adecuados para el lavado y secado higiénico de las manos (agua, jabón, desinfectante, papel y depósitos de basura), entre otras actividades, para ver disminuida dicha contaminación.

De igual forma es importante que la ingesta del producto en crudo sea realizada con previa desinfección con plata coloidal o hipoclorito de sodio, o bien ingerirlo bajo cocción.

CONCLUSIONES

Debido a la contaminación de los frutos de tomate por Coliformes Fecales en los municipios estudiados se sabe de la presencia de materia fecal, por lo que se recomienda tomar en cuenta las estrategias higiénico-sanitarias propuestas en el presente trabajo.

Es necesario detectar las posibles fuentes de contaminación ya que en el agua de riego y suelo no se detectó la presencia de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido por los productores de tomate de las zonas muestreadas, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a la estudiante de posgrado. El presente trabajo fue financiado a través del proyecto PROMEP FE057/2012 "Diagnóstico de la inocuidad en producción de jitomate en condiciones de invernadero en cinco zonas productoras del Estado de México".

REFERENCIAS

- Ávila, G., E. Sánchez, E. Muñoz, L. R. Martínez y E. Villalobos (2008). Diagnóstico de la calidad microbiológica en frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton, Revista Internacional de Botánica Experimental* 77: 129-136.
- Bartz, J. y R.K. Showalter (1981). Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. *Phytopathology* 71: 515-518.
- Bautista N. y J. Alvarado (2005). Producción de Jitomate en Invernadero. Colegio de Posgraduados. 233 p.
- Blostein, J. (1993). An outbreak of *Salmonella jerviana* associated with consumption of watermelon. *Journal of Environmental Health* 56: 29-31.
- Cummings, K., E. Barrett, J.C. Mohle-Boetani, J.T. Brooks, J. Farrar, T. Hunt, A. Fiore, K. Komatsu, S.B. Werner y L. Slutsker (2001). A multistate outbreak of *Salmonella enteritica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. *Emerging Infectious Diseases* 7: 1046-1048.
- Escartín, F.E. (2000). Microbiología e Inocuidad de los Alimentos Editorial Universidad Autónoma de Queretaro, México, pp. 520-527.
- Guo, X., J. Chen, R.E. Brackett y L.R. Beuchat (2001). Survival of salmonellae on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4760-4764.
- Ibarra, L.S., S. Alvarado, M.O. Rodríguez, N.E. Martínez y A. Castillo (2004). Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. *Journal of Food Protection* 67: 1353-1358.
- Iturriaga, M., M. Tamplin y F. Escartín (2007). Colonization of Tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative and storage temperature. *Journal of Food Protection* 70: 30-34.
- Kapperud, G., L.M. Rorvik, V. Hasseltvedt, E.A. Hoiby, B.G Iversen, K. Stavland, G. Johnson, J. Leitao, H. Herikstad, Y. Anderson, G. Langeland, B. Gondrosen y J. Lassen (1995). Outbreaks of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *Journal of Clinic Microbiology* 33: 609-614.
- Luna, G.M.L., J.J. Luna y M.G. Spencer (2006). El ABC para la seguridad Alimentaria en los Hogares. Editorial Educación y Cultura, México, pp: 74-77.
- Luna, M.L., A. Delgado, B.E. Herrera, A.G. Torres, F. Avelino, A. Navarro, F. Parada (2012). Diversity of enterobacteria associated with tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill) fruits and greenhouse soils. *Journal of Scientia Agropecuaria* 2: 161-169.
- Mahon, B.E., A. Ponka, W. Hall, K. Komatsu, L. Beuchat, S. Shifflett, A. Siitonen, G. Cage, M. Lambert, P. Hayes, N. Bean, P. Griffin y L. Slutsker (1997). *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seed. *Journal of Infections Diseases* 175: 876-882.
- Norma Oficial Mexicana (con carácter de Emergencia) (2000). NOM-EM-034-FITO-2000. Requisitos y Especificaciones para la aplicación y Certificación de Buenas Prácticas Agrícolas en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.
- Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.
- Norma Oficial Mexicana (1994). 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.
- Norma Oficial Mexicana (1994). 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.
- Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. 9 p.
- Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. 10 p.
- Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Norma Oficial Mexicana (2002). NOM-230-SSA1-2002, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.
- 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.
- Ries, A.A., S. Zasa, C. LangKop, R.V. Tauxe y P.A. Blake (1990). A multistate outbreak of *Salmonella chester* linked to imported cantaloupe. Thirtieth Interscience Conference of Antimicrobial Agents Chemotherapy. American Society of Microbiology. Washington, DC. 238 p.
- SAGARPA- SENESICA, Secretaría de Agricultura.

ARTÍCULO II. Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Del análisis de la información obtenida de este apartado se realizó un primer artículo científico APROBADO y se encuentra en prensa para su publicación por la Revista Argentina de Microbiología de la Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Dicha revista se encuentra indexada en MEDLINE; Scopus; Science Direct; Science Citation Index Expanded; Directory of Open Access Journals (DOAJ); EMBASE; MEDES; Journal Citation Report (JCR), con ISSN: 0325-7541

Carta

Date: 11/12/2017
To: "Ana Tarin Gutierrez" atarini@uaemex.mx
cc: aceptadosram@aam.org.ar
From: "Revista Argentina de Microbiología" eesserver@eesmail.elsevier.com
Reply To: "Revista Argentina de Microbiología" ram-aam@elsevier.com
Subject: RAM-D-17-00074R5: decisión de los editores / editorial decision - MEX

Apreciada Dr. Gutierrez:

Le comunicamos que su manuscrito "Persistencia, internalización y translocación de Escherichia coli O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (Solanum lycopersicum L.) Persistence, internalization and translocation of Escherichia coli O157:H7, O157:H16 and O105ab in plants and tomato fruits (Solanum lycopersicum L.)" (Ref. RAM-D-17-00074R5) ha sido aceptado para su publicación en Revista Argentina de Microbiología.

Recuerde que en su momento le remitiremos las pruebas de autor en formato pdf a esta misma dirección electrónica.

Reciba un cordial saludo,

Montserrat Valero
Journal Manager
Revista Argentina de Microbiología

Close



ORIGINAL

**Persistencia, internalización y translocación de
Escherichia coli O157:H7, O157:H16 y O105ab en
plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Rosa L. Ocaña de Jesús^a, Ana T. Gutiérrez Ibáñez^{a,*}, Jesús R. Sánchez Pale^a,
María D. Mariezcurrera Berasain^a, Carlos A. Eslava Campos^b y Antonio Laguna Cerda^a

^a Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

^b Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Unidad de Hemato Oncología e Investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez / División de Investigación, Facultad de Medicina (UNAM), Ciudad de México, México

Recibido el 2 de mayo de 2017; aceptado el 9 de diciembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Patógeno;
Bacteria;
Escherichia coli;
Calidad

Resumen La presencia de bacterias patógenas, como *Escherichia coli*, afecta la calidad e inocuidad de las hortalizas que se consumen en fresco y se relaciona con graves problemas de salud. El objetivo de este trabajo fue determinar si 3 cepas diferentes de *E. coli* tienen la capacidad de penetrar y permanecer en plantas y frutos de tomate. Se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad «Cid») en condiciones de invernadero y se evaluaron 3 tratamientos, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (EcH O105ab) y un testigo T4, con 100 plantas cada uno y 4 formas de inoculación: en el sustrato, en el tallo, en el peciolo y en el pedúnculo. Se realizaron muestreos en etapa vegetativa, floración, fructificación y madurez fisiológica para cuantificar en placa las UFC/g y saber si las bacterias lograban moverse y recuperarse en la raíz, el tallo, la flor y el fruto. Los grupos filogenéticos a los que correspondieron las bacterias recuperadas fueron confirmados mediante pruebas bioquímicas, serotipificación y PCR. A los 120 días la recuperación de bacterias en la planta fue del 23% (*E. coli* O157:H7), 28% (EcT O157:H16) y 55% (EcH O105ab) con la inoculación al sustrato, mientras que con la inoculación por punción la recuperación fue (en igual orden) del 5%, 3% y 4% a los 30 días; del 37%, 35% y 30% a los 90 días; y del 42%, 39% y 13% a los 65 días. Las cepas utilizadas mostraron la capacidad de entrar en la planta de tomate y de permanecer en ella y transportarse hasta llegar al fruto, sin producir síntomas que indiquen su presencia.

© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: atarini@uaemex.mx (A.T. Gutiérrez Ibáñez).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.001>

0325-7541/© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: Ocaña de Jesús RL, et al. Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Rev Argent Microbiol. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.001>

Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

^aRosa L. Ocaña de Jesús, ^{*a}Ana T. Gutiérrez Ibáñez, ^aJesús R. Sánchez Pale, ^aMaría D. Mariezcurrena Berasain, ^bCarlos A. Eslava Campos, ^aAntonio Laguna Cerda.

^aFacultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario Km. 15 Carr. Toluca-Ixtlahuaca. Código Postal: 50200. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.

^bLaboratorio de Patogenicidad Bacteriana. Unidad de Hemato Oncología e Investigación. Hospital Infantil de México “Federico Gómez” / División de Investigación, Facultad de Medicina (UNAM). Dr. Márquez 162, Col. De los Doctores, CP 06720, Ciudad de México, México

*atarini@uaemex.mx México (FCA-UAEMex) Campus Universitario “El Cerrillo” Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km. 15 entroke al Cerrillo Toluca, Edo de México C.P. 50200, México. Tel +52 1(722) 2965518, 2965529. 2965531 Ext. 192

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a la primera autora durante sus estudios de posgrado, al financiamiento del trabajo con clave PROMEP FEO57/12 y al Hospital infantil de México “Federico Gómez” Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo para los análisis realizados.

No existiendo conflicto de interés por parte de los autores.

Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Persistence, internalization and translocation of *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 and O105ab in plants and tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.)

RESUMEN

La presencia de bacterias patógenas, como *Escherichia coli*, afecta la calidad e inocuidad de las hortalizas que se consumen en fresco y se relaciona con graves problemas de salud. El objetivo de este trabajo fue determinar si tres cepas diferentes de *E. coli* tienen la capacidad de penetrar y permanecer en plantas y frutos de tomate.

Se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad “Cid”) en condiciones de invernadero y se evaluaron tres tratamientos, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (EcH O105ab) y un testigo T4, con 100 plantas cada uno y cuatro formas de inoculación: en el sustrato, en el tallo, en el pecíolo y en el pedúnculo. Se realizaron muestreos en etapa vegetativa, floración, fructificación y madurez fisiológica para cuantificar en placa las UFC/g y saber si las bacterias lograban moverse y recuperarse en raíz, tallo, flor y fruto. Los grupos filogenéticos a los que correspondieron las bacterias recuperadas fueron confirmados mediante pruebas bioquímicas, serotipificación y PCR.

A los 120 días, la recuperación de bacterias en la planta fue del 23% (*E. coli* O157:H7), 28% (EcT O157:H16) y 55% (EcH O105ab) con la inoculación al sustrato, mientras que con la inoculación por punción, la recuperación fue (en igual orden) del 5%, 3% y 4% a los 30 días; del 37%, 35% y 30% a los 90 días; y del 42%, 39% y 13% a los 65 días. Las

cepas utilizadas mostraron la capacidad de entrar a la planta de tomate y de permanecer en ella y transportarse hasta llegar al fruto, sin producir síntomas que indiquen su presencia.

Palabras clave: Patógeno, Bacteria, *Escherichia coli*, Calidad.

ABSTRACT

The presence of pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* affects the quality and safety of vegetables that are consumed fresh and is associated with serious health problems. The objective of this study was to determine if three different strains of *E. coli* can penetrate and remain in plants and tomato fruits.

A completely randomized experimental design was followed for which a tomato crop ("Cid" variety) was established under greenhouse conditions and three treatments were evaluated, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (EcH O105ab) and a T4 control, with 100 plants each and four forms of inoculation: in the substrate, stem, petiole and the peduncle. Samples were carried out in vegetative stage, flowering, fruiting and physiological maturity to quantify in petri dish CFU/g and know if the bacteria managed to move around and recover in root, stem, flower and fruit. The phylogenetic groups that corresponded to the bacteria recovered were confirmed by biochemical tests, serotyping and PCR.

At 120 days the recovery of bacteria in the plant was 23% (*E. coli* O157:H7), 28% (EcT O157:H16) and 55% (EcH O105ab) when inoculation to the substrate while the inoculation by puncture the recovery was (in the same order) of 5%, 3%, and 4% at 30 days; 37%, 35% and 30% at 90 days; and 42%, 39% and 13% at 65 days. The strains submit the ability

to enter the tomato plant and to stay in it and transported to the fruit, without producing that indicate their presence.

Key words: Pathogen, Bacterium, *Escherichia coli*, Quality

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial por su alto aporte nutrimental y versatilidad; es rico en vitaminas A y C y en flavonoides. Son muy reconocidas sus propiedades antioxidantes y contiene licopeno, responsable del color rojo característico del fruto. Algunos de estos compuestos se relacionan con la prevención de enfermedades como el cáncer, la inflamación del colon y el síndrome de degeneración macular, principal causa de ceguera en gente mayor de 65 años²³.

Por consumirse en fresco, el tomate ha pasado a ser una fuente importante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)¹³. Se han documentado brotes relacionados con el consumo de productos en fresco, como es el caso de la espinaca, la lechuga, el tomate, los germinados y los rábanos, contaminados con *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Newport*¹⁷. La contaminación se puede dar a lo largo de la cadena de producción; se reportan como principales fuentes el uso de agua de riego contaminada⁴⁷, los abonos a base de estiércol no tratado adecuadamente¹⁵, el empleo de semillas contaminadas y los diferentes vectores, como animales, insectos y seres humanos³⁴.

Uno de los principales microorganismos reportados causantes de ETA es *Escherichia coli*¹⁴, que forma parte de la microbiota intestinal de seres humanos, animales de sangre caliente y aves. Se distinguen dos grupos según el tipo de infección que provocan: uno

está constituido por cepas responsables de infecciones extraintestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis); el segundo grupo está compuesto por cepas patógenas intestinales, responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales. Dichas infecciones pueden manifestarse con distinto nivel de gravedad, desde una diarrea leve hasta una sintomatología similar a la del cólera, que puede desencadenar complicaciones como el síndrome urémico hemolítico^{12,16}. El consumo de tomate, al igual que el de otras hortalizas, ha presentado diferentes alertas por la presencia de *E. coli* O157:H7²². Esa cepa ha mostrado capacidad de mantenerse por tiempo prolongado fuera de su hábitat natural, adaptándose a condiciones adversas. Algunas investigaciones demuestran que estos microorganismos tienen la capacidad de internalizarse en el producto, protegiéndose de los sanitizantes¹⁷. Existe un limitado conocimiento sobre el mecanismo por el cual las bacterias patógenas de humanos colonizan y sobreviven en estos productos⁷. El conocimiento de las vías de contaminación y la asociación entre patógenos transmitidos por alimentos y tejidos vegetales es importante para intervenir y garantizar la seguridad de los productos que se consumen en fresco. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la capacidad de tres cepas diferentes de *Escherichia coli* para penetrar y permanecer en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el ciclo agrícola mayo a septiembre 2015, en condiciones de invernadero, en el Municipio de Toluca de Lerdo, cuyas coordenadas geográficas corresponden a 19°17'32" norte, 99°39'14" oeste, con una altitud entre de 2600 y 2625 m.s.n.m.^{20, 21}.

Los análisis fueron procesados en el Laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y Laboratorio de Serotipificación, Unidad de Investigación, Facultad de Medicina (UNAM).

Material vegetal y cepas bacterianas

Se utilizaron plántulas variedad "Cid" tomate tipo saladette, que se obtuvieron en bandejas de germinación, estas fueron trasplantadas en macetas de 35 x 35 cm. Para la siembra se utilizó una mezcla de sustrato (40% suelo de campo, 40% lombricomposta y 20% tepojal), esterilizada previamente por medio de un método químico³⁹. El riego se realizó diariamente con agua de pozo; las plantas se conservaron en condiciones de invernadero durante todo el ciclo de producción. Antes de comenzar los ensayos, se realizaron análisis microbiológicos de las plántulas, la mezcla de sustrato y el agua de riego (con evaluación periódica durante el desarrollo del cultivo) para descartar la presencia de organismos coliformes termotolerantes y de *E. coli*.

De las tres cepas utilizadas, dos de ellas fueron de serogrupos desconocidos y se obtuvieron de cultivos de tomate de la región de Texcaltitlán³³ y de espinaca de la zona de Calimaya (EcH); la tercera fue una cepa del serogrupo O157:H7 (STEC) donada por

el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Las cepas fueron almacenadas en una solución agua-glicerol (50:50) a -20 °C. La elección de la cepa del serotipo O157:H7 obedeció a que dicha cepa estuvo relacionada con diferentes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos mínimamente procesados y logra crecer en ambientes no propicios. Las otras dos cepas se eligieron por haberse recuperado con anterioridad de cultivo de tomate y hortalizas, dando así continuidad a un trabajo previo³³.

Caracterización fenogenotípica

Antes del establecimiento del experimento en invernadero, las bacterias se reactivaron en caldo soya tripticaseína (CST), se hicieron crecer en medios selectivos agar MacConkey (DIBICO), eosina azul de metileno (DIBICO) y agar cromogénico *E. coli* O157:H7 (DIBICO).

Para la confirmación de la identidad de las cepas bacterianas, se realizó una serotipificación y PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Para la serotipificación se siguió el método propuesto por Orskov et al.³⁶ y recientemente actualizado por Scheutz et al.⁴¹. Se usaron 181 antisueros somáticos y 56 antiflejares, que corresponden al esquema antigénico de *E. coli*^{24,47}. Para la determinación del grupo filogenético se realizó la PCR descrita por Clermont et al.¹¹, en función de la combinación de tres marcadores de ADN (*chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE.4C2), que clasifica a los aislados de *E. coli* dentro de uno de los cuatro grupos filogenéticos establecidos: A, B1, B2 y D.

Para determinar la presencia de genes relacionados con cepas diarreogénicas [*Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC): *lt* y *st*; *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC): *stx1* y *stx2*; *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC): *bfpA* y *eaeA*], se realizó la PCR multiplex descrita por López et al.²⁵.

Inoculación

Para la inoculación en el sustrato, se emplearon 100 macetas por tratamiento con un volumen de 300 ml de suspensión bacteriana para cada cepa, con un promedio de $2,5 \times 10^3$ UFC/ml en agua peptonada bufferada (BPA) 0,1%. La solución se infiltró en el sustrato sin salpicar la planta. Este tratamiento (INC1) se realizó a los 7 días después del trasplante, con el objetivo de observar si las tres cepas podían entrar y transportarse a las diferentes partes de la planta. A partir de esta inoculación se monitoreó durante los 120 días que duró el cultivo, incluyendo la etapa vegetativa, la floración, la fructificación y la madurez fisiológica.

En otros grupos de plantas, se realizó la inoculación por medio de una punción en la etapa vegetativa en el tallo (INC2); en la floración, en el peciolo (INC3); en la fructificación, en el pedúnculo (INC4). Eso se hizo con la finalidad de determinar la capacidad de las tres cepas de *E. coli* de perdurar en los tejidos internos del tomate, tras su ingreso a través de algún tipo de herida. Para realizar las punciones, los cultivos se hicieron crecer en agar MacConkey (DIBICO) y con palillos previamente esterilizados se tomó aproximadamente $1,8 \times 10^3$ UFC de masa bacteriana (dicho valor se obtuvo mediante recuento en placa).

Toma de muestra

Se colectaron muestras de raíz (R), tallo (T) flor (Fl) y fruto (Fr) a los 30, 55, 90 y 120 días después del trasplante (ddt). Todo el material fue colectado y transportado de acuerdo con lo indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994³¹.

Para la preparación de las muestras, se utilizó el método microbiológico indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994³². A 10 g de tejido se le adicionaron 90 ml de BPA 0,1% y se homogeneizó en una licuadora marca Osterizer. De la suspensión

obtenida se tomó 1 ml para hacer siembra directa por duplicado en placas con agar bilis rojo violeta (BIOXON), las cuales se incubaron a una temperatura de 45 ± 2 °C. Después de 24 h de incubación, se realizó el recuento de colonias lactosa positivas, las cuales se estriaron en agar MacConkey (BIOXON), agar cromogénico O157:H7 (DIBICO) y agar de eosina y azul de metileno (BIOXON). Estas placas se incubaron a 35 °C por 24 ± 2 h. Para confirmar la presencia de *E. coli*, se tomó como referencia el crecimiento característico para cada medio selectivo y diferencial empleado^{28,48}, así como los resultados de las pruebas IMViC (producción de indol, movilidad, prueba de rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato de Simmons), complementadas con producción de ureasa y de ácido sulfhídrico, y con descarboxilación de ornitina⁴⁸. Dichos análisis se realizaron en las cepas antes de la inoculación y a las colonias recuperadas durante el experimento.

Diseño experimental

Se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad “Cid”) en condiciones de invernadero, en el que se establecieron tres tratamientos, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (EcH O105ab), más el testigo T4, con 100 plantas por tratamiento. Se emplearon cuatro diferentes formas de inoculación: al sustrato, al tallo, al pecíolo y al pedúnculo. El muestreo implicó la colecta de 20 plantas en cada etapa fenológica para cuantificar en placa las UFC/g, y así para saber si las bacterias lograban moverse hacia la raíz, el tallo, la flor y el fruto.

Los resultados fueron evaluados por un ANDEVA bifactorial ($p < 0,05$) para recuento en raíz, tallo, flor y fruto por cepa, forma de inoculación e interacción entre estas variables.

Frente al hallazgo de diferencias significativas, se aplicó una prueba de Tukey al 5% para identificar la cepa, la vía de inoculación y la interacción que llevaron a los mayores recuentos. Para ello se empleó el programa estadístico SAS (SAS, 2002)³⁸

RESULTADOS

Caracterización bioquímica, serotipificación y PCR

Las pruebas bioquímicas confirmaron la recuperación de las cepas bacterianas inoculadas durante todas las etapas fenológicas (Anexo 1).

La serotipificación agrupó a las cepas bacterianas en O157:H7, O157:H16 (EcT) y O105ab (EcH), todas flagelares.

Las reacciones de PCR para identificar los grupos filogenéticos amplificaron bandas de 279, 211 y 152 pb, lo que clasificó a las cepas O157:H7 y EcT (O157:H16) en el grupo filogenético D, perteneciente a las cepas diarreogénicas, mientras que la cepa EcH (O105ab) se ubicó en el grupo A, de las no diarreogénicas. Con la PCR multiplex se observaron bandas de 150 pb (*stx 1*), 255 pb (*stx 2*) y 384 pb (*eaeA*), de acuerdo con lo esperado para las cepas O157:H7.

Estos análisis fenogenotípicos tuvieron la finalidad de confirmar que las bacterias recuperadas eran las mismas que las inoculadas.

No se encontraron microorganismos coliformes termotolerantes ni *E. coli* en las plántulas de tomate ni en el sustrato antes del experimento, tampoco en el agua de riego durante todo el desarrollo del cultivo.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para todas las variables analizadas: cepa, método de inoculación e interacción. Por eso se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias, de acuerdo con el criterio de Tukey.

De las cuatro formas de inoculación evaluadas, la que llevó a la mayor tasa de recuperación fue la realizada en el sustrato, donde los valores más elevados se registraron en R y T. Para las punciones, en cambio, las tasas de recuperación más altas se observaron cuando el inóculo se aplicó en el pecíolo y en el pedúnculo. (Tabla 1).

Las tres cepas de *E. coli* inoculadas se recuperaron durante todo el ciclo, con diferencias según el órgano de la planta inoculado (Tabla 2). Para el grupo testigo, en todos los casos no existió presencia de bacterias.

Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de la inoculación en el sustrato

La inoculación de *E. coli* O157:H7 en el sustrato permitió la recuperación de dicha cepa de R, T, Fl y Fr, y la respuesta fue similar en cada etapa fenológica (vegetativa, floración, fructificación y madurez fisiológica). Se observó una disminución de las UFC recuperadas con respecto a la cantidad inoculada en el sustrato. Las bacterias permanecieron detectables y cultivables sin necesitar enriquecimiento hasta el último muestreo. *E. coli* O157:H7 logró permanecer en los diferentes tejidos de la planta hasta 120 días, con una disminución de la densidad a lo largo del ciclo.

La cepa EcT se recuperó de R y T a los 30 ddt; sin embargo, a los 55 ddt se observó un notorio incremento y se recuperó de R, T y Fl, a ello siguió un decremento hacia los 90 ddt. En las determinaciones subsiguientes se recuperaron de Fl y Fr; a los 120 ddt existió recuperación de Fr, lo que demuestra que la bacteria inoculada al sustrato logró internalizar y permanecer en la planta y en el fruto.

La cepa EcH, aparentemente, se movilizó y mostró un incremento a los 55 ddt. Por otro lado, a los 90 ddt se registró un decremento de la población bacteriana.

Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de la inoculación por punción en el tallo

Con las tres cepas de *E. coli* inoculadas al tallo se observó en la parte aérea de la planta mayor población en la etapa vegetativa y menor en cosecha. De forma contraria, en la R hubo mayor carga bacteriana en cosecha. Cuando las cepas fueron inoculadas durante la etapa vegetativa, permanecieron en mayor cantidad en el tejido inoculado, y por las UFC recuperadas se puede observar que el movimiento fue basípeto y acrópeto, con una sobrevivencia de 90 días.

Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de la inoculación por punción en el pecíolo

Se detectó incremento en el número de *E. coli* O157:H7 en Fl y Fr, no así en T y R. Asimismo, existió mayor recuperación de EcT en flores. La población bacteriana se redujo en Fr y T, mientras que en R y Fl los valores fueron diversos.

Se notó una menor recuperación de EcH (*E. coli* O105ab) en Fl, R y T. De las tres cepas existió mayor recuperación de colonias en Fl, mientras que para Fr los valores fueron similares entre etapas fenológicas.

Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de inoculación por punción en pedúnculo

De la etapa de fructificación a cosecha, los recuentos de *E. coli* O157:H7 se incrementaron en Fl y Fr, mientras que en R y T disminuyeron. La mayor recuperación de UFC se obtuvo del T. La recuperación de EcT de una etapa a otra disminuyó en R, T y Fr. Únicamente en Fl existió poco incremento, mientras que la mayor recuperación se obtuvo del T. En relación con las plantas inoculadas con EcH, se notó una disminución en la recuperación de la bacteria en R, T y Fr; solo en Fl se mantuvo la cantidad de UFC recuperadas.

Respuesta de cepas por método de inoculación

En la etapa vegetativa del tomate, fue la inoculación al sustrato con la cepa O157:H7 la que llevó a la mayor recuperación de UFC, mientras que fue la inoculación por medio de punción en el tallo con las cepas de los serotipos O105ab y O157:H7 las que llevaron a los recuentos más altos en R y T, respectivamente (Tabla 3).

Para el muestreo realizado en la etapa de floración, la cepa que se recuperó en mayor número con la inoculación al sustrato y por punción en el tallo fue la O105ab y de la R, mientras que del T y la Fl, fue la cepa O157:H16. Con la inoculación por punción en el pecíolo, el serotipo con mayor recuperación en la R fue el O157:H7, y en el T y la Fl fue el O157:H16 (Tabla 3).

Hacia el muestreo realizado a los 90 días, con la inoculación al sustrato la mayor recuperación de UFC a partir de R y T se obtuvo con la cepa O105ab, en Fl con la cepa O157:H16 y en Fr con la cepa O157:H7. Por otra parte, tras la inoculación por punción al tallo, la cepa O105ab fue la que se recuperó en mayor número en la R, mientras que la O157:H16 arrojó los recuentos más altos en las demás partes de la planta. La cepa que se asoció con recuentos más altos en R, T y Fr en la inoculación al pecíolo fue la O157:H7, mientras que, en la Fl, el valor más alto fue para la cepa O105ab. Cuando la inoculación se hizo por punción en el pedúnculo, la cepa O157:H7 tuvo mayor recuperación en R, Fl y Fr; y en el T tuvo mayor recuperación la O105ab (Tabla 3).

Hacia los 120 días, los recuentos más altos en R y T correspondieron a la cepa O105ab, mientras que los más altos en Fl y Fr fueron los de la O157:H7. Tras la inoculación al tallo, en R el valor de UFC más marcado lo mostró la cepa O105ab, pero en T, Fl y Fr la O157:H16. Con la inoculación al pecíolo, la cepa que arrojó recuentos mayores fue la

O157:H7. Con la inoculación al pedúnculo, la cepa hallada en mayor número en R fue la O157:H16, en T fue la O105ab y en Fl y Fr fue la O157:H7 (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La recuperación de las tres cepas de *E. coli* indica la capacidad de estas para ingresar, permanecer y moverse a través de los órganos de la planta y sobrevivir a lo largo de las etapas fenológicas del cultivo. Como factible punto de entrada de esta bacteria en las plantas se identifica a la raíz, que es la principal vía de absorción de alimentos y agua²⁹. Existen reportes que señalan que, en las raíces las bacterias enteropatógenas pueden tener mayor acceso a los nutrientes que en otros sitios, puesto que las uniones de la raíz son sitios que liberan exudados y absorben nutrientes, lo que las convierte en puertas de entrada para que las bacterias inicien el proceso de internalización²⁶. Otros trabajos señalan que el ingreso de estas bacterias a la planta puede obedecer a la presencia de heridas¹⁸ o a procesos de endobiosis^{5,10,45}.

Los resultados del presente estudio muestran que *E. coli* logró sobrevivir en el sustrato y entrar a la planta. A través del interior de esta y en las diferentes etapas fenológicas pudo transportarse hasta llegar al fruto. Se ha informado que la transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ocurrir por suelo contaminado con estiércol (fertilizante) y a través del agua de irrigación en plantas de lechuga⁴⁴. Además, algunos autores resaltan que la carga microbiana presente en un vegetal depende de la probabilidad de que el producto esté en contacto con la fuente de contaminación durante el cultivo: suelo, fertilizantes orgánicos y agua de irrigación^{3,17}.

Uno de los factores que pueden afectar la persistencia en el suelo de bacterias enteropatógenas, como es el caso de *E. coli* O157:H7, es la presencia de carbono, es decir,

al existir baja concentración de este y presencia de microbiota natural, la bacteria puede presentar alta mortalidad⁴⁷.

Las bacterias presentaron similar comportamiento al ser inoculadas por punción en el vegetal o agregadas al sustrato: en ambos casos se movieron en el interior de la planta. La cepa de *E. coli* que se recuperó en más alto número fue la aislada de cultivo de tomate (EcT), que corresponde al serotipo O157:H16. Esto se relaciona con la adaptación al tomate que pudo haber desarrollado con anterioridad, al estar ya presente en este cultivo^{27,33}. Estos resultados muestran que *E. coli* tiene la capacidad de persistir en el tejido interno de las plantas de tomate, donde la mayor recuperación se obtuvo en la inoculación realizada en la etapa vegetativa y en la floración. Esto nos indica que en las primeras etapas fenológicas del cultivo existe mayor posibilidad de contaminación. Este resultado coincide con lo reportado en hojas de espinaca de 3 semanas, que fueron más susceptibles de ser colonizadas por *E. coli* O157:H7 en comparación con las hojas de 5 semanas³⁷. En contraste, también se han informado similares tamaños de población de bacterias patógenas en tejido joven de lechuga y en tejidos ya cortados⁴. Esto resalta que la supervivencia de la bacteria depende de la condición fisiológica en cada etapa fenológica, así como del órgano de la planta donde persiste.

Las tres cepas inoculadas de diferentes formas presentaron la capacidad de moverse en toda la planta de forma ascendente por el xilema y descendente por el floema, sin mostrar ningún tipo de respuesta o síntoma. Otros autores, sin embargo, demostraron que las enterobacterias pueden activar el sistema inmunitario activando la respuesta en el tejido de plantas de *Arabidopsis thaliana*, las que presentaron clorosis y marchitez⁴². Asimismo, algunos estudios señalan que estas bacterias pueden inducir respuesta de defensa de la

planta e incluso tienen la capacidad de suprimirla^{9,19}. Por otra parte, en este estudio las plantas de tomate no reconocieron a la bacteria patógena para humanos O157:H7 como peligrosa para ellas y no iniciaron ninguna respuesta de defensa².

Resultados similares fueron obtenidos en un estudio realizado sobre calidad y seguridad microbiológica de productos consumidos en fresco, donde encontraron que la segregación de enzimas por microorganismos endófitos como pectinasas, celulasas y proteasas favorecen la disponibilidad de nutrientes y propician el desarrollo de poblaciones microbianas⁴⁰. Esto nos habla de la adaptación al medio que ha desarrollado *E. coli* por un proceso conocido como *quorum sensing (QS)*, donde la exposición a condiciones de estrés permite a las bacterias sobrevivir bajo estas condiciones, e incluso mejorar su tolerancia⁶. Este comportamiento es destacado en una investigación en la que se observaron diferencias entre cepas de *E. coli* recuperadas de diversos cultivos y otras de origen intestinal (de mamíferos): las primeras utilizaron en mayor grado glucosa y azúcares derivados de la planta, por lo que se asume que podrían adaptarse a las condiciones que le pueden brindar los vegetales³⁰. Otros estudios señalan que diferentes especies de enterobacterias pueden encontrar el ambiente adecuado al estar en contacto con el fruto y así poder sobrevivir en este ambiente^{35, 43}.

Conocer el comportamiento de *E. coli* y los procesos involucrados en su internalización y supervivencia en plantas cuyas partes comestibles se consumen en fresco es de gran importancia, ya que los desinfectantes solo previenen la contaminación superficial y no tienen acceso a tejidos internos^{1,8,44}. Esto representa un riesgo latente para el consumidor, si desde etapas tempranas el cultivo se contamina.

A través del presente estudio se aporta información relevante vinculada con la adaptación, la persistencia y la sobrevivencia de un importante patógeno en plantas de tomate, y queda en evidencia lo importante que es prevenir la contaminación de los cultivos por bacterias enteropatógenas.

Conclusiones

Tres cepas de *E. coli* (O157:H7, O157:H16 y O105ab) presentaron la capacidad de penetrar en plantas y frutos de tomate y lograron permanecer durante el desarrollo del cultivo hasta 120 días. En todos los casos, se pudieron transportar a las diferentes partes de la planta hasta llegar al fruto sin mostrar ningún síntoma que pudiera advertir de su presencia. La persistencia dependió de la etapa fenológica en que se hizo la inoculación, así como del serotipo al que pertenecían las cepas. *E. coli* en contacto con plantas de tomate representa un peligro latente, ya que, al presentar la capacidad de internalizar y llegar al fruto, limita la acción de los métodos de desinfección utilizados normalmente.

REFERENCIAS

1. Barak J, Schroeder B. Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. *Annu Rev Phytopathology*. 2012, 50:241-266.
2. Berger C, Sodha S, Shaw R, Griffin P, Pink D, Hand P, Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* 2010; 12:2385-2397. (On-line) [doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x)
3. Brandt S, Pek Z, Barna E. Lycopene content and color of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J Sci Food Agric*. 2006; 86:568-572. (On-line)
4. Brandl M y Amudson R. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74:2298-2306. (On line)
5. Campbell NA, Reece JB. *Biología*, 7º Edición, Editorial Panamericana, Madrid, 2010, p. 523,524, 550, 551.
6. Carey CM, Kostrzynska, Thompson S. *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression on romaine lettuce using comparative real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2009; 77:235-242. (Online) <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.02.010>.
7. Cooley MB, Chao D and Mandrell RE. *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce; environmental investigations in the Salinas region of pre-harvest contamination. *Phytopathology*. 2007; 97: S138. (On-line)

8. Cooley MB, Miller WG and Mandrell RE. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:4915-4926. (Online)
<http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.8.4915-4926.2003>
9. Curtis H, Barnes S, Schnek A, Massarini A. *Curtis Biología*. 7º Edición. Madrid, 2011, p. 24, 25, 480, 481, 484.
10. Clermont O, Bonacorsi, S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(10), 4555–4558.
11. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México, 1994: 251.
12. Food and Agriculture Organization of the United Nations (© FAO). 2015, 12p. disponible en:
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2011.06.231.pdf
13. Food and Drug Administration (FDA), Foodborne Illnesses: What You Need to Know, 2015. (On-line) disponible en:
<https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagovpublic/@fdagovfoodsgen/documents/webcontent/ucm187529.pdf>.
14. Fletcher J, Leach JE, Eversole K, Tauxe R. Human pathogens on plants: Designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology.* 2013; 103:306-315. (On-line)

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-09-12-0236-IA>

15. García S, Heredia N. 2009. Foodborne pathogens and toxins: an overview. In: Microbiologically safe foods, Heredia N, Wesley I, García S. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, p. 15-52.
16. Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere. *J Appl Microbiol.* 2008; 104(3): 613-26. (On-line)
17. Holden N, Pritchard L, Toth I. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33:689-703. (On-line)
18. Iniguez AL, Dong Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplet EW. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plants defenses. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005; 18:169-178.
19. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2015, México. Disponible en: www.inegi.org.mx
20. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED), 2015, México. Disponible en: www.inafed.gob.mx/es/inafed/Municipales
21. Iturriaga M, Tamplin M, Escartín, F. Colonization of Tomatoes by Salmonella Montevideo is affected by relative and storage temperature. *J Food Prot.* 2007; 70: 30-34. (On-line)
22. Juroszek P, Lumpkin HM, Yang RY, Ledesma DR, Ma CH. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm:

- comparison of organic and conventional management systems. *J Agric Food Chem.* 2009;57: 1188-1194 (On-line)
23. Kauffmann F, Orskov F, Ewing W. Designations for the k antigens of *Escherichia coli* serotypes. *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy.* 1956; 6 (2): 63 - 64.
24. López C, Cerna JF, Villegas N, Thompson R., Velazquez FR, Torres J, Estrada T. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases.* 2003; 127-131. (Online)
<https://dx.doi.org/10.3201/eid0901.010507>.
25. Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol.* 2001; 39:461-490. (Online) <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.461>
26. Luna ML, Delgado A, Herrera BE, Torres AG, Avelino F, Navarro A, Parada F. Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y suelos de invernadero. *Sci. agropecu.* 2012 p. 161-169. ISSN 2306-6741. (Online) Disponible en:
<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/80>
27. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock, *Biología de los Microorganismos.* 8a. ed. Prentice Hall.2001, p. 986.
28. Machado DC, Maia CM, Carvalho ID, da Silva NF, Dantas MC, Andre PB. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. *Braz J Microbiol.* 2006; 37:538-544. (Online) <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822006000400025>

29. Méric G, Kemsley EK, Falush D, Siggers EJ, Lucchini, S. Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in *Escherichia coli*. Environ Microbiol. 2013; 15: 487–501.
30. 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.
31. Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.
32. Ocaña RL, Gutiérrez AT, Sánchez JR, Mariezcurrena MD, Velázquez G, Laguna A, Rojas I. Microbiological quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) produced under greenhouse conditions in five Municipalities of the State of Mexico. Phyton. 2015; 84:1. (On line)
33. Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. Food Microbiology. 2012; 32:1-19. (Online)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>
34. Orozco L, Rico R, Fernandez EE. Microbiological Profile of Greenhouses in a Farm Producing Hydroponic Tomatoes. J Food Prot. 2008; 1: 60–65. (On-line)
35. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriol Rev. 1977; 41:3, p. 667 – 710.
36. Pu S, Beaulieu JC, Prinyawiwatkul W, Ge B. Effects of plant maturity and growth media bacterial and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in growing spinach leaves. J Food Prot. 2009;72, p. 2313-2320. (On-line)

37. SAGARPA, SEDAGRO, SENESICA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Secretaria de Desarrollo Agropecuario, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2010. Disponible en: www.gob.mx
38. SAS. Institute Inc. (2002). SAS/STAT User's Guide, Software version 9.0. Cary, N.C., USA.
39. Sela S, Fallik F. Microbial Quality and Safety of Fresh Produce: Postharvest Handling. 2009. Editorial Elsevier. pp: 356-371. (On-line)
40. Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. 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. 2004; 112: 6, p.569-584.
41. Schikora A, Carreri A, Charpentier E, Hirt H. The dark side of the salad: *Salmonella Typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. 2008. PLoS One 3 e2279. (On-line) doi:10.1371/journal.pone.0002279.
42. Schwaiger Karin. Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. Int J Environ Res Public Health. 2011; 21:3. (On-line)
43. Solomon EB, Yaron S, Matthews KR. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. Appl Environ Microbiol. 2002; 68:397-400. (Online) Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.1.397-400.2002>

44. Schwartz W, Margulis L. Symbiosis in Cell Evolution. Life and its Environment on the Early Earth. 59 Tab. San Francisco. 1981; 22: 427. (On-line)
45. Laboratorio de serotipificación. Unidad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Formato de Instrucciones de la técnica de serotipificación: *Escherichia coli*. 2012, México.
46. Vidovic S, Block HC, Korber DR. Effect of soil composition, temperature, indigenous microflora and environmental conditions on the survival of *Escherichia coli* O157:H7. Can J Microbiol. 2007; 57:822-829.
47. Wright KM, Chapman S, McGeachy K, Humphris S, Campbell E, Toth IK, Holden NJ. The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification and internal localization in roots. Phytopathology. 2013; 103:333-340. (Online) Disponible en: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-08-12-0209-FI>
48. Winn, Washington C, Elmer W, Koneman. Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. Editorial Médica Panamericana, Print. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. 2008.

TABLAS

Tabla 1. Recuento de *Escherichia coli* en distintas etapas del cultivo de tomate

ETAPA VEGETATIVA (30 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)		
INC1	639,30a	197,51a		
INC2	15,95b	156,61b		
ETAPA FLORACIÓN (55 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)	FLOR (UFC/g)	
INC1	1183,48a	483,86 a	49,90b	
INC2	41,66b	56,13c	29,63c	
INC3	12,06c	81,01b	123,40a	
ETAPA FRUCTIFICACIÓN (90 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)	FLOR (UFC/g)	FRUTO (UFC/g)
INC1	888,51a	184,13a	42,91b	14,53b
INC2	30,31b	56,61b	22,58c	18,31a
INC3	24,31c	52,23c	87,35a	11,90c
INC4	13,36d	23,16d	3,55d	6,65d
ETAPA MADUREZ FISIOLÓGICA (120 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)	FLOR (UFC/g)	FRUTO (UFC/g)
INC1	700,01a	146,83a	35,66b	10,60b
INC2	31,63b	43,95c	18,416c	10,166b
INC3	9,567c	105,25b	60,15a	20,90a
INC4	9,28c	15,31d	4,81d	2,01c

Medias seguidas de las mismas letras señalan ausencia de diferencias significativas por test de Tukey ($p < 0,05$). INC1: inoculación al sustrato; INC2: inoculación por punción al tallo; INC3: inoculación por punción al pecíolo; INC4: inoculación por punción al pedúnculo.
ddt: días después del trasplante.

Tabla 2. Recuento de tres cepas de *Escherichia coli* en distintas etapas del cultivo de tomate. Datos por cepa.

ETAPA VEGETATIVA (30 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)		
C1	303,07a	152,98 a		
C2	103,95b	57,575b		
C3	84,41c	55,03c		
ETAPA FLORACIÓN (55 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)	FLOR (UFC/g)	
C1	270,35b	149,11b	32,06b	
C2	257,56c	197,37a	95,17a	
C3	400,00a	119,27c	24,96c	
ETAPA FRUCTIFICACIÓN (90 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)	FLOR (UFC/g)	FRUTO (UFC/g)
C1	213,85b	62,28c	38,60b	17,35a
C2	187,85c	75,01b	63,11a	15,12b
C3	315,68a	99,81a	15,58c	6,07c
ETAPA MADUREZ FISIOLÓGICA (120 ddt)				
	RAÍZ (UFC/g)	TALLO (UFC/g)	FLOR (UFC/g)	FRUTO (UFC/g)
C1	136,225b	61,6750c	40,3625a	19,7750a
C2	136,963b	84,6375b	39,3625a	8,5250b
C3	289,688a	87,20a	9,5625b	4,4625c

Medias seguidas de las mismas letras señalan ausencia de diferencias significativas por test de Tukey ($p < 0,05$). C1: *E. coli* O157:H7, C2: *E. coli* O157:H16, C3: *E. coli* O105ab, ddt: días después del trasplante.

Tabla 3. ANDEVA multifactorial ($\bar{X}\pm SD$) de los recuentos de *Escherichia coli* en diferentes estados fenológicos y distintas partes de la planta (cepa x método de inoculación).

ETAPA VEGETATIVA (30 ddt)					
INOCULACIÓN	CEPA	RAÍZ	TALLO		
		($X \pm SD$)	($X \pm SD$)		
I1	C1	1200,30±74,26	512,35±17,88		
I1	C2	400,40±30,41	50,30±5,91		
I1	C3	317,20±5,58	29,90±4,36		
I2	C1	12±1,97	99,60±6,62		
I2	C2	15,40±2,32	180±4,29		
I2	C3	20,45±2,21	190,25±2,63		
ETAPA FLORACIÓN (55 ddt)					
INOCULACIÓN	CEPA	RAÍZ (UFC)	TALLO	FLOR	
		($X \pm SD$)	($X \pm SD$)	($X \pm SD$)	
I1	C1	1050,35±34,66	450,45±24,09	30,40±5,11	
I1	C2	1000,2±12,28	600,25±14,28	100,45±6,77	
I1	C3	1499,90±21,49	400,9±6,80	18,85±1,98	
I2	C1	15,00±2,63	48±4,11	19,95±2,16	
I2	C2	19,9±5,05	90,25±3,89	49,95±2,99	
I2	C3	90,10±3,80	30,15±3,13	19±1,89	
I3	C1	16,05±2,28	98±4,38	77,90±3,58	
I3	C2	10,15±1,95	99±4,06	230,30±3,70	
I3	C3	10±2,51	46,05±2,66	62±2,97	
ETAPA FRUCTIFICACIÓN (90 ddt)					
INOCULACIÓN	CEPA	RAÍZ (UFC)	TALLO	FLOR	FRUTO
		($X \pm SD$)			
I1	C1	763,70±15,14	122,25±7,93	25,35±4,14	20,60±5,73
I1	C2	700,25± 9,59	150,05±9,63	88±4,95	15±2,55

I1	C3	1201,6±32,98	280,1±8,58	15,40±2,01	8±3,35
I2	C1	27,80±2,48	29,80±3,69	12±1,86	16,95±2,64
I2	C2	23±2,75	80±2,79	40,05±3,39	28,05±3,17
I2	C3	40,15±3,48	60,05±2,89	15,70±3,32	9,95±1,63
I3	C1	47,90±2,61	77,90±4,22	111,05±4,29	19,85±2,13
I3	C2	16,05±1,76	46,80±1,79	122±3,02	13,40±2,32
I3	C3	9±1,58	32±3,22	29±2,9	2,45±2,62
I4	C1	16±2,27	19±2,58	6±2,29	12±3,41
I4	C2	12,1±1,99	23,2±3,17	2,4±2,13	4,05±1,84
I4	C3	12±3,22	27,1±4,72	2,25±1,25	3,90±2,29

MADUREZ FISIOLÓGICA (120 ddt)

INOCULACIÓN	CEPA	RAÍZ (UFC) (X± SD)	TALLO (X± SD)	FLOR (X± SD)	FRUTO (X± SD)
I1	C1	500,05±56,50	50,45±5,37	21,95±4,26	14,95±2,58
I1	C2	500±43,92	120,05±6,93	75,05±7,04	11,85±2,39
I1	C3	1100±46,83	270±13,21	10±3,56	5,0±1,97
I2	C1	21,8±4,50	17,1±2,42	7,30±1,30	10±2,22
I2	C2	30,05±3,39	74,55±3,83	34,95±3,39	12±2,29
I2	C3	43,05±4,11	40,20±4,66	13±1,80	8,50±2,16
I3	C1	13±3,19	167,15±9,68	122±3,85	50,10±3,91
I3	C2	7,70±1,92	129,90±5,56	45,15±3,52	10,25±2,84
I3	C3	8±1,97	18,70±2,57	13,30±2,53	2,35±2,27
I4	C1	10,05±2,52	12±2,73	10,20±2,37	4,05±2,43
I4	C2	10,10±3,21	14,05±3,03	2,30±1,38	0
I4	C3	7,70±2,81	19,90±3,74	1,95±1,27	2±1,45

I1: inoculación al sustrato; I2, I3 e I4: punción al tallo, al pecíolo y al pedúnculo, respectivamente., ddt: días después del trasplante.

Anexo

1. Pruebas Bioquímicas utilizadas para la identificación de *Escherichia coli* reactividad

IMViC⁴⁸.

Bacteria	Reacción								
	I	M	O	VP	Rm	CS	U	H ₂ SO ₃	TSI
<i>E. coli</i> O157:H7	+	+	+	-	+	-	-	-	A/A
<i>E. coli</i> Tomate	+	+	+	-	+	-	-	-	A/A
<i>E coli</i> Hortaliza	+	+	+	-	+	-	-	-	A/A

^I Indol, ^MMovilidad, ^OOrnitina, ^{Rm}Rojo de metilo, ^{Cs}Citrato Simons, ^UUrea,

^{H₂SO₃}Producción de ácido sulfhídrico, ^{TSI}Triple azúcar hierro.

ARTÍCULO III. Movilidad y sobrevivencia de *Salmonella* serovar Enteritidis en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L).

Del estudio de la información obtenida de este apartado, se realizó un artículo científico que fue enviado a la Revista Salud Pública de México del Instituto Nacional de Salud Pública, México el cual se encuentra en revisión. Dicha revista se encuentra indexada en JCR; Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Bibliomex Salud; Biological Abstracts; Current Contents; Social and Behavioral Sciences; Dairy Science Abstracts; Directory of Open Access Journals (DOAJ); EMBASE; Excerpta Medica/Global Health; CAB Abstracts ; Index Medicus; Índice de Revistas de Educación Superior e Investigación Educativa (IRESIE); Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del Conacyt; Índice Médico Español; Latindex; MedicLatina; Periódica; RedALyC; Research Alert; SciELO Citation Index; Scientific Electronic Library Online (SciELO); Scopus; Social Sciences Citation Index y en los sistemas en línea Medline, Lilacs y Artemisa. Con ISSN: 1606-7916.

Factor de impacto
2016

1.753

SJR 2016

.828

Palabras clave

- Educación en salud
- Enfermedades transmisibles
- Epidemiología
- Infraestructura
- Sanitaria México
- Mortalidad México
- México IFA NA
- Nutrición Salud Pública
- Salud pública Seguridad
- social VIH Vacunas
- epidemiología
- mortalidad obesidad
- salud pública

Tamaño de fuente



RESUMEN REVISIÓN EDICIÓN

Envío

Autores in [Pérez Laura Diana de Jesús](#) [Ana Tatán Gutiérrez Carfés](#) [María Dolores Vallejosmena Erasán](#) [Jesús Ricardo Sánchez Paiz](#) [Antonia Laguna Cerdá](#) [Alma Fabiola Araujo Guzmán](#)

Título **Movilidad y sobrevivencia de *Salmonella* serovar Enteritidis en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicon* L.)**

Archivos original [8262326523412004_2018-01-23](#)

Archivos como [8262326523412004_2018-01-23](#) [8262326523412004_2018-01-23](#) [8262326523412004_2018-01-23](#) [8262326523412004_2018-01-23](#)

Emisión [Hoy Ana Tatán Gutiérrez Carfés](#)

Fecha de envío [enero 23 2018 - 11:56](#)

Sección [Artículo original](#)

Editor/a [Carlos Oropeza](#)
[Eduardo Lázcano Ponce](#)

Comentarios del autor/a [Apreciado Editor](#)

Tengo el placer de remitirle el manuscrito "Movilidad y sobrevivencia de *Salmonella* serovar Enteritidis en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicon* L.) Mobility and survival of *Salmonella* serovar Enteritidis in tomato plants (*Solanum Lycopersicon* L.)" para su posible publicación en tan prestigiosa revista que lleva a su digno cargo.

Estado

Estado	En revisión
Iniciado	2018-01-23
Modificado por última vez	2018-01-23

Metadatos del envío

ENVIOS METADATOS

Procesos para autores

Servicio de ayuda de la revista



Usuario/a ha iniciado sesión como

fara_tatin@

Mi perfil

Cerrar sesión

Autónoma Envíos

Activar (1)

Archivar (0)

Nuevo envío

Idioma

Escoja idioma

Movilidad y sobrevivencia de *Salmonella* serovar Enteritidis en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L).

Mobility and survival of *Salmonella* serovar Enteritidis in tomato plants (*Solanum Lycopersicum* L).

^{1,2}Rosa Laura Ocaña-de Jesús, Ing, ²Ana Tarín Gutiérrez-Ibáñez, D en C, ²María Dolores Mariezcurrena-Berasain, D en C, ²Jesús Ricardo Sánchez-Pale, D en C, ²Antonio Laguna-Cerda, D en C, ²Alma Fabiola Araujo-Guzmán, M en C.

¹Estudiante de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

²Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario Km. 15 Carr. Toluca-Ixtlahuaca. Código Postal: 50200. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.

Autor de correspondencia: Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibáñez.

Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México.

Correo electrónico: atarini@uaemex.mx

Teléfono: 01-722 2965518, 2965529, 1806098. Ext.192

Resumen

Objetivo. Se determinó la movilidad y sobrevivencia de *Salmonella* Enteritidis en plantas de tomate desarrolladas en condiciones de invernadero. Materiales y métodos. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar e inoculo la bacteria al sustrato al momento del trasplante y punciones al tallo, peciolo y pedúnculo en las etapas vegetativa, floración y fructificación. La sobrevivencia fue evaluada con monitoreos durante el ciclo de producción; la movilidad se evaluó en los órganos de la planta separados al punto de inoculación. Resultados. *S. Enteritidis*, sobrevivió los 120 días tanto en el punto inoculado como en los otros órganos del tomate, su recuperación indicó la capacidad de la bacteria para moverse en el interior de la planta. Conclusión. *Salmonella* presento la capacidad de moverse al interior de la planta de tomate, por lo que el consumo de sus frutos implica riesgos a la salud.

Palabras clave: *Salmonella*; salmonelosis; alimentos; inoculación.

Abstract

Objective. We determined mobility and survival of *Salmonella* Enteritidis in tomato plants in greenhouse conditions. Materials and methods. The pathogen was inoculated to the substrate at the time of the transplant and punctures to the stem, petiole and peduncle in the vegetative stages, flowering and fruiting. Survival was evaluated with monitors during the production cycle; mobility was evaluated in the organs of the plant separated at the point of inoculation. Results. *S. Enteritidis* survived the 120 days both the inoculated point and other organs of tomato his recovery indicated the ability of the bacterium to move the plant inside. Conclusions. *Salmonella* presented the ability to move to the interior of the tomato plant, so the consumption of its fruit Involves health risks.

Keywords: *Salmonella*; salmonellosis; food; inoculation.

Introducción

A nivel mundial se ha incrementado el consumo de frutas y hortalizas, acción motivada principalmente por la creciente preocupación de implementar una dieta más equilibrada, con menor proporción de carbohidratos, grasas y aceites con la búsqueda de mayor participación de la fibra dietética, vitaminas y minerales¹. Cada día se incrementa la tendencia a consumir productos frescos, sanos y lo más parecido a su forma original². Al mismo tiempo se ha notado el incremento de enfermedades transmitidas por alimentos y se han visto afectados productos como frutas y hortalizas cuyo consumo es directo, por la presencia de microorganismos patógenos de humanos, uno de los principales agentes causales es *Salmonella*³, que ha repercutido en enfermedades diarreicas, si bien la mayoría de los casos de salmonelosis son leves, es considerado el principal agente causal de brotes alimentarios. En ocasiones la enfermedad puede ser mortal, esto va a depender de los factores propios del huésped y del serotipo¹⁻⁴. La salmonelosis transmitida por alimentos es una de las principales preocupaciones de salud pública a nivel mundial⁵⁻⁶. En Estados Unidos está clasificado como uno de los patógenos alimentarios más gravoso³⁻⁵.

El vínculo entre la salmonelosis y los alimentos de origen animal es bien conocido y ha sido objeto de múltiples estudios. Aunque la incidencia de enfermedades relacionadas con el consumo de carnes ha disminuido en últimos años, la tasa de brotes de salmonelosis se ha mantenido por el incremento del riesgo de fuentes no tradicionales del patógeno. Éstas incluyen alimentos mínimamente procesados como frutas, hortalizas y condimentos^{3,7,8,9}. En los últimos años, diversos productos mexicanos han sido asociados a brotes epidemiológicos por el consumo de hortalizas frescas en el mercado estadounidense, lo que ha afectado la competitividad y posicionamiento¹⁰; tal es el caso de mango en el 2012;

cilantro en el 2015 y 2016; pepino en el 2015 y papaya en el 2011 y 2017 los cuales han sido alertas de brotes sanitarios¹¹⁻¹². Las principales vías de contaminación detectadas son las malas prácticas agrícolas como el uso de estiércol de animales con tratamientos inadecuados, el riego con agua de mala calidad microbiológica durante toda la cadena productiva, presencia de animales domésticos dentro de parcelas y el contacto con manipuladores primarios y secundarios^{13,14,15}. Existen investigaciones que reportan bacterias peligrosas para el hombre pueden encontrar los nutrientes necesarios en frutas y hortalizas¹⁶⁻¹⁷ y su acidez no afectar la sobrevivencia de enteropatógenos por lo que adquieren el potencial de sobrevivencia y contaminación microbiana¹⁸⁻¹⁹.

Salmonella es un género de bacilos Gram-negativos que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, se han identificado más de 2,500 serotipos diferentes en dos especies: *Salmonella Bongori* y *Samonella Entérica*, ésta es una bacteria resistente que puede sobrevivir durante varias semanas en ambientes secos y varios meses en agua²⁰. Los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida a seres humanos, en la mayor parte del mundo son *Salmonella enterica* serotipo Enteriditis y *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium*⁴.

Los grandes brotes por patógenos, como *Salmonella*, suelen atraer la atención de los medios informativos, entre el 60 y el 80% de los casos de salmonelosis no se registran como parte de un brote conocido y se clasifican como casos esporádicos, o ni siquiera se diagnostican. Se estima que cada año *Salmonella* spp. causa un millón de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos, con 19,000 hospitalizaciones y 380 muertes⁵. La mayoría de las personas infectadas con *Salmonella* desarrollan diarrea, fiebre y calambres abdominales de 12 a 72 horas después de la infección. La enfermedad

generalmente dura de 4 a 7 días. En algunas personas la diarrea puede ser tan grave que el paciente necesita ser hospitalizado o incluso puede ocasionar la muerte⁵. Se ha identificado que los grupos más vulnerables son los niños, adultos mayores y pacientes con enfermedad severa o inmunocomprometidos⁴.

En México para el 2016 se reportaron 4 476 041 casos de infecciones intestinales²¹⁻²², sin embargo, no se cuenta con estadísticas nacionales específicas de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico, sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero²³. El último de los casos reportados para México fue en papaya maradol que se exportó a 23 estados de Estados Unidos, con un total de 220 personas infectadas de las cuales 144 casos fueron por cepas de *Salmonella* Thompson con 144 casos, *Salmonella* Kiambu 54, *Salmonella* Agona 12, *Salmonella* Gaminara 7 y *Salmonella* Senftenberg con 3 brotes¹². Esto repercutió en una alerta sanitaria y el retiro del producto del mercado⁶⁻¹².

A pesar de la magnitud del problema, se conoce poco de los mecanismos que permiten a *Salmonella* persistir fuera de los reservorios animales y existen pocos estudios sobre la transmisión de éste patógeno a lo largo de toda la cadena alimenticia²⁴, por lo mismo la legislación en relación con la inocuidad alimentaria establece medidas de control o tolerancia basados en información epidemiológica obtenida de estudios transversales²³.

Por lo anteriormente descrito, el objetivo de la presente investigación fue determinar el movimiento, sobrevivencia y recuperación de *Salmonella* Enteritidis en plantas y frutos de tomate.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó durante el periodo primavera-verano 2015 en Toluca, Estado de México. En invernadero se cultivaron plántulas de tomate de crecimiento indeterminado tipo saladette variedad Cid® de la empresa harris moran, éstas fueron trasplantadas en bolsas de polietileno de 35X35 cm. Para la siembra se empleó una mezcla de sustrato con suelo de campo 40%, lombricomposta 40% y tepojal 20%, previamente esterilizado por medio de un método químico³⁸. Previó al trasplante se realizaron análisis microbiológicos a los materiales empleados: a la plántula, al sustrato y el agua de riego, a ésta última durante todo el periodo que duró el experimento, para descartar la presencia de organismos Coliformes Fecales (CF) y *Salmonella*.

Los análisis fueron procesados en el Laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México y en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El patógeno empleado para inocular fue *Salmonella* entérica serovar Enteritidis, donada por el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. La bacteria se reactivó en Caldo Soya Trypticaseina (DIBICO) se observó su crecimiento en Agar MacConkey (DIBICO), Agar Base Sangre (BD BIOXON), Agar *Salmonella Shigella* (BD BIOXON), Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (DIBICO) y se realizó la prueba de tinción de Gram. De las cajas con crecimiento bacteriano se preparó el inóculo con Agua Peptonada Amortiguada (APA) 0.1 %, con pH de 7.0.

Se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad “Cid”) en condiciones de invernadero, en el que se evaluaron las cuatro formas de inoculación T1 (inoculación al sustrato), T2 (punción al tallo), T3

(punción en el peciolo), T4(punción al pedúnculo) y el grupo testigo T5, con un total de 280 plantas.

Las plántulas y el sustrato fueron inoculadas durante las 2 primeras horas después de haber preparada la solución. La inoculación al sustrato se realizó 7 días después del transplante (ddt) con 300 mL de suspensión bacteriana la cual se infiltró sin salpicar la planta, para esta forma de inoculación se contó con un grupo de 100 plantas y el testigo. La inoculación por punción se realizó a 180 plantas con palillos previamente esterilizados de las placas Petri, se tomó y coloco masa bacteriana en las diferentes etapas fenológicas: en etapa vegetativa en el tallo, en floración en el peciolo y en etapa de fructificación en el pedúnculo. El muestreo se realizó a los 30, 55, 90 y 120 (ddt), con la colecta de 20 plantas en cada etapa fenológica para cuantificar en placa por duplicado las UFC/g éste se hizo de raíz, tallo, flor y fruto de acuerdo con la existencia de muestra por etapa fenológica del cultivo; para conocer si a partir del punto de inoculación la bacteria lograba moverse a los demás órganos no inoculados.

Todo el material fue colectado y transportado de acuerdo con lo indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994²⁵, para la preparación de las muestras se utilizó el método microbiológico indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994²⁶, se empleó un método destructivo, el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se realizó en placas con RVBA (BIOXON) e incubaron a una temperatura de $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$; transcurridas las 24h se procedió a realizar el conteo. La detección de *Salmonella* en plantas y frutos de tomate se realizó de acuerdo con la Norma Oficial NOM-114-SSA1-1994²⁷. Las etapas fueron: preenriquecimiento en APA 0.1% para restaurar las células de *Salmonella* a una condición fisiológica estable; enriquecimiento en caldo soya tripticaseina (CST) con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e

inhibir otros organismos presentes en la muestra; selección en medios sólidos-selectivos Agar *Salmonella Shigella* (BD BIOXON) y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (DIBICO) que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias; e identificación bioquímica en agar Urea (BD BIOXON), agar triple azúcar hierro (BD BIOXON), medio SIM para determinar Sulfuro, Indol y Movilidad; complementadas con Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato Simons, descarboxilación de Ornitina²⁷⁻²⁸, así como la ausencia del patógeno en el grupo testigo.

Los resultados fueron evaluados por un ANDEVA bifactorial ($p < 0,05$) para recuento en raíz, tallo, flor y fruto por etapas y forma de inoculación. Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante el empleo de la prueba de Tukey. Los análisis fueron realizados con el *software* estadístico Statical Analysis Software, SAS versión 9.0²⁹.

Resultados y Discusión

Se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre recuentos de *Salmonella* serovar Enteritidis para la forma de inoculación realizada y etapas de muestreo.

Durante los 120 días en el que se desarrolló el cultivo, el patógeno mostró la capacidad de moverse a partir del lugar de inoculación y su recuperación en los diferentes órganos de la planta: raíz, tallo, flor y fruto; con tendencia a reducir la población bacteriana hasta no detectable conforme transcurría el tiempo (Cuadro I). Sin embargo, esto no sugiere la ausencia de la misma, ya que se ha reportado que bacterias patógenas en ambientes hostiles pueden entrar en estado viable, pero a su vez no son cultivables lo que dificulta su aislamiento e identificación en medios selectivos³⁰. Lo encontrado tiene correspondencia con Lynch y colaboradores⁸, quienes resaltan que las plantas pueden ser hospederos alternos para patógenos entéricos proporcionando un ambiente después de la

excreción del tracto intestinal de animales⁸. Semenov et al.³¹ apoyan la hipótesis de que las plantas pueden servir como huéspedes alternos para patógenos entéricos humanos y *Salmonella* presentar la capacidad de colonizar plantas comestibles esto como estrategia de supervivencia⁸. Los autores demostraron que *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 colonizaron plántulas sembradas en suelo modificado con estiércol que contenía a éstos patógenos y los animales (vacas y ratones) que comieron estas plántulas arrojaron los patógenos en sus excrementos, además se encontró persistencia de estas bacterias en el suelo durante 2 semanas³¹. Schikora et al.³² demostraron que cepas de *Salmonella* inoculada y recuperada de *Arabidopsis thaliana* fueron igual de virulentas, estas causaron mortalidad en ratones³².

De la inoculación aplicada al sustrato a los 30, 55, 90 y 120 día (ddt) se tuvo recuperación en raíz, tallo, flor y fruto (Figura 1). Los diferentes muestreos revelaron que *Salmonella* Enteritidis fue capaz de persistir y presentar movilidad en la extensión de la planta hasta llegar al fruto hasta los 120 días, estos resultados coinciden con estudios de campo que resaltan la persistencia de *Salmonella* serotipo Typhimurium durante 231 días en suelos modificados con estiércol donde fueron recuperados patógenos en la superficie de las plantas de lechuga y perejil, en donde *Salmonella* sobrevivió hasta la etapa de cosecha³³⁻³⁴.

En cada muestreo existió mayor recuperación de UFC/ g en la raíz, con una recuperación de 55, 37 y 52 % sucesivamente. En el tallo de los 30 a los 55 ddt existió un incremento del 17% para después disminuir en los análisis sucesivos. Los muestreos de flor a los diferentes ddt mostraron una disminución de 9 y 4 %. Mientras que, el comportamiento en frutos mostró un incremento del 2% de los 90 a los 120 ddt. Estos recuentos demuestran la capacidad de supervivencia y la transferencia que puede ocurrir del sustrato a la planta.

Natving et al.³⁵ y Franz et al.³⁶ encontraron que diferentes texturas de suelos pueden favorecer la colonización de hortalizas como la lechuga esto debido a la formación de agregados, retención de agua y tensión de oxígeno; factores que posiblemente permitieron la sobrevivencia del microorganismo durante todo el cultivo. Rodríguez y colaboradores³⁷ reportan que en el suelo *Salmonella* puede competir por nutrientes y espacio³⁷, donde el riego periódico puede contribuir la disminución de la población bacteriana³⁵. La presencia del patógeno en el sustrato y la capacidad de la bacteria para transferirse a la planta, hasta recuperarse en fruto, hace resaltar el cuidado que se debe tener al utilizar desechos de animales aplicados en abonos, ya que no solo pueden aportar nutrientes y microorganismos benéficos si no, también ser vehículo de transmisión de patógenos³⁸. Otra vía de contaminación reportada es el agua, ya que en la mayoría de las ocasiones los canales de uso agrícola se encuentran al aire libre, por lo que la contaminación puede tener diversos orígenes como introducción de agua residual a los canales, descargas domésticas, excretas de ganado y animales silvestres como reptiles y aves³⁹. Además, que en México la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) menciona que poblaciones menores de 2500 habitantes no requieren servicios de tratamiento de agua residual y pueden ser descargados en flujos de agua los cuales son utilizadas para riego agrícola⁴⁰⁻⁴¹.

En este estudio la inoculación al sustrato se realizó al inicio del cultivo, en etapa vegetativa, sin posterior adición de carga microbiana o fertilización después de la inoculación de las plantas lo que se relaciona con Johannessen et al.⁴², quienes señalan no es necesario fertilizar en repetidas ocasiones para que el patógeno se presente, pues es capaz de utilizar la materia orgánica del cultivo como sustrato y medio de propagación³⁴. Se reporta que el constante contacto del patógeno con el cultivo ya sea por el uso de abonos o aguas de mala calidad, incrementaría la población bacteriana del patógeno debido a la

presencia de nutrientes disponibles⁴³ y a su vez existe la posibilidad de que este pueda llegar al fruto; comportamiento que presentó el patógeno en la presente investigación.

En la inoculación realizada por medio de punción en el tallo se obtuvo recuperación de colonias a los diferentes días de muestreo, así como en las diferentes partes de la planta indicando movimiento de la bacteria a lo largo de esta (Figura 2). La mayor recuperación se tuvo en tallo con 88.2 UFC/ g a los 30 ddt con una posterior disminución de 39, 19 y 8 % en los muestreos consecutivos. En tallo, flor y fruto se notó decremento en la recuperación de las colonias a los diferentes días de muestreos (Figura 2). Comportamiento relacionado con estudios que demuestran patógenos transmitidos por alimentos pueden unirse a las hojas de plantas y ser internalizados al aprovechar heridas o el sistema de raíces endofítica⁴⁴ al estar presente el microorganismo puede ser introducido en cualquier punto de la cadena de producción.

La respuesta de la bacteria a la inoculación realizada al peciolo mostro mayor recuperación de UFC/ g en tallo, en los tres muestreos realizados, presentó la mayor cantidad a los 55 ddt con 90.55 UFC / g y de ahí una disminución de 9 y 7 % a los 90 y 120 ddt respectivamente. En segundo lugar, fue la recuperación en la flor con respuesta similar a la observada en el tallo, de igual forma se observó una disminución paulatina de las UFC presentes con valores de 55 y 32 UFC/g en las muestras. Para el caso de la raíz la mayor recuperación se tuvo en el último muestreo a los 120 días, mientras que en el fruto a los 90 ddt se presentaron recuperación de 28 UFC/ g con un decremento del 16 % en el último muestreo (Figura 3).

De la inoculación realizada al pedúnculo, en la raíz la bacteria mostró un incremento de los 90 a los 120 ddt; mientras que en el tallo, flor y fruto a los mismos días la recuperación disminuyó un 18, 3 y 1% respectivamente (Figura 4).

Las diferentes punciones realizadas a la planta de tomate en tallo, peciolo y pedúnculo; así como la recuperación en órganos no inoculados, incluso en fruto para cosecha, comprueban la capacidad de la bacteria para presentar movilidad y sobrevivencia, similar a lo encontrado por Golberg et al.⁴⁵ en hojas de lechuga donde *S. Tiphymorium* penetró la epidermis, entró a través de estomas abiertos en un proceso que implicó motilidad o movilidad flagelar y quimiotaxis. Otro de los peligros de la inocuidad de alimentos es la internalización de la bacteria en la planta, esto va a depender del tipo de secreción presente y de que los flagelos se encuentren intactos⁴⁵. Barak et al.⁴⁶ y Franz et al.⁴⁷ mencionan que *Salmonella* spp. varían en su capacidad de colonización en plantas de lechuga y alfalfa, debido a factores de virulencia que favorecen la colonización e internalización⁴⁸. La expresión de dichos genes aun no es clara, pero diversos estudios referencian su expresión con mayor frecuencia en microorganismos Gram negativos, por la presencia en la pared de lipopolisacáridos y proteínas que ofrecen resistencia a diversos factores ambientales^{49, 50, 51}.

La sobrevivencia del patógeno y movilidad en la planta hasta llegar a frutos de tomate contrasta con los reportes que emplean abono contaminado con microorganismos patógenos durante todo el ciclo del cultivo de hortalizas de porte bajo por la característica de estar más cerca al suelo poseen mayor riesgo de contaminación, por lo que enfatizan que la extensión de la planta no es factor limitante para la movilidad del patógeno, y con ello la transmisión ocurre en cualquier etapa del cultivo, tanto en condiciones de invernadero como en campo abierto^{52,53,54}. Éstos autores destacan como factores de riesgo la cantidad y calidad de bioabono aplicado³³, la inoculación de las plantas desde la semilla y reinoculación del microorganismo de prueba a lo largo del cultivo⁴²⁻⁴⁷, la cantidad y calidad de agua durante el riego, cosecha o distribución^{35,53,55,56}. Es importante resaltar que

productos cuyo consumo es en fresco de manera natural pueden contener microorganismos epífitos no patógenos, pero durante el crecimiento, cosecha y transporte existe manipuleo, como lo es el caso del cultivo de tomate que presenta varias labores durante el proceso de producción⁵⁷, el producto pasa por diferentes vías donde puede contaminarse por patógenos de origen animal y humano¹⁵⁻⁵⁸. Con frecuencia estos productos se consumen sin un lavado y desinfección adecuado. En este estudio el patógeno se movió de manera descendente y ascendente hasta llegar al fruto, por lo que su contenido microbiano puede representar un factor de riesgo para la salud del consumidor y por lo tanto un problema de seguridad alimentaria⁵⁹.

Conclusiones

La recuperación de la bacteria en las diferentes partes de la planta durante el desarrollo del cultivo con diferentes formas y tiempos de inoculación permitió concluir que *Salmonella* Enteritidis presentó la capacidad de sobrevivir, internalizar y moverse hasta el fruto, así como llegar a ser un peligro latente ya que al estar de manera interna no serían suficiente los métodos de desinfección comúnmente utilizados implicando riesgos a la salud.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma del Estado de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a la primera autora durante sus estudios de doctorado; y al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitir el acceso a través de los Doctores Carlos Eslava Campos y Ulises Hernández Chiñas, así como por todo el apoyo, comentarios y aportaciones.

Cuadros

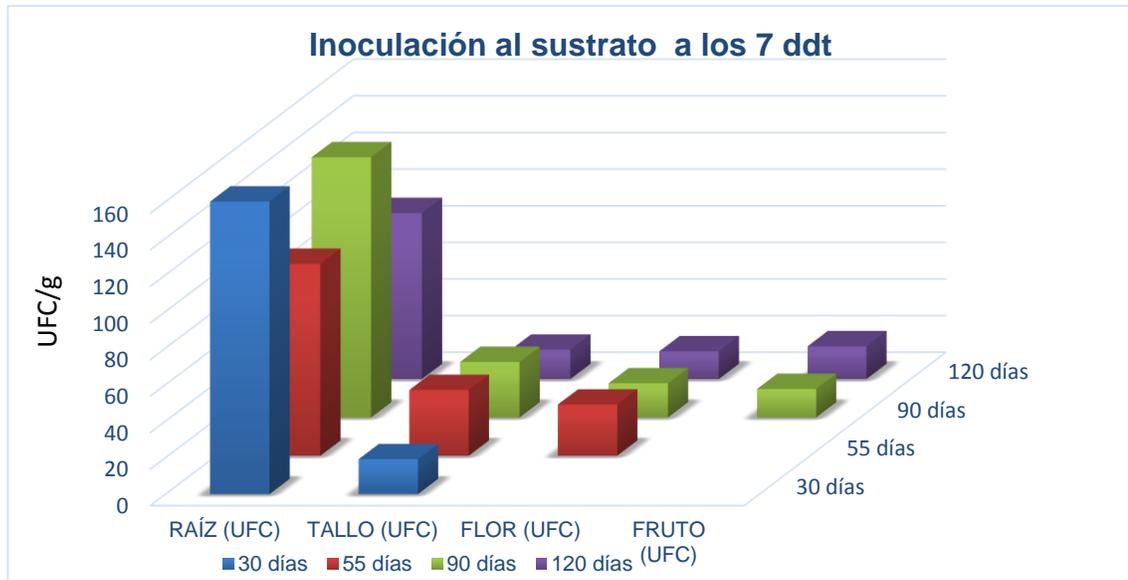
CUADRO I. Resultados del ANDEVA multifactorial ($\bar{X} \pm SD$) de los recuentos de *Salmonella* serovar *enteritidis*, forma de inoculación por etapa de muestreo.

INOC	ETAPA	RAÍZ	TALLO	FLOR	FRUTO
		($\bar{X} \pm SD$)	($\bar{X} \pm SD$)	($\bar{X} \pm SD$)	($\bar{X} \pm SD$)
I1	V	160±4.01 a ¹ , A ²	19.10±3.37 b,C	SM	SM
I1	Fl	105±8.09 a,C	36.05±3.60 c,A	28.05±3.52 b,A	SM
I1	Fr	142.15±3.76 a,B	30.40±4.36 c,B	18.70±2.45 b,C	15.60±2.72 b,B
I1	Mf	90.70±3.42 a,D	16.10±2.31 d,D	15.20±2.75 b,C	17.95±3.18 a,A
I2	V	12.45±2.52 b,C	88.2±4.12 a,A	SM	SM
I2	Fl	19.75±2.22 b,B	50.20±2.96 b,C	18.70±3.54 c,A	SM
I2	Fr	27.40±2.68 c,A	31.05±4.74 c,C	12.90±2.25 c,B	17.80±2.78 b,A
I2	Mf	18.15±3.63 d,B	22.75±2.88 c,D	7.0±2.15 c,C	9.80±1.58 c,B
I3	Fl	22.15±3.25 b,B	90.55±3.62 a,A	51.10±3.80 a,A	SM
I3	Fr	24.20±2.84 d,B	81.70±2.64 a,B	39.50±4.86 a,B	28.2±3.29 a,A
I3	Mf	28.95±4.11 c,A	74.55±3.15 a,C	32.35±3.38 a,C	12.60±2.33 b,B
I4	Fr	40.75±3.85 b,A	59.75±3.63 b,A	17.60±2.70 b,A	10.05±2.91 c,A
I4	Mf	42.40±3.10 b,A	41.85±3.62 b,B	14.40±3.01 b,B	8.75±2.38 c,A

¹Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los promedios de los tratamientos entre etapas. ²Las letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los promedios de los tratamientos para forma de inoculación realizada.

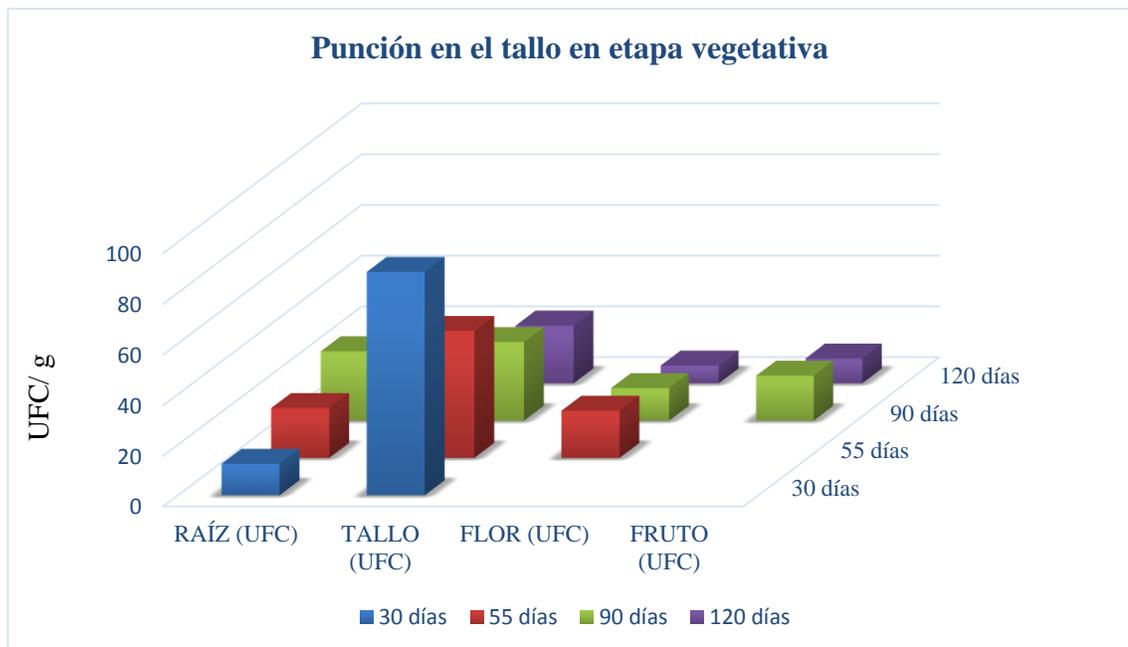
Figuras

Figura 1. Recuperación de *Salmonella* Enteritidis por inoculación al sustrato en plantas de tomate.



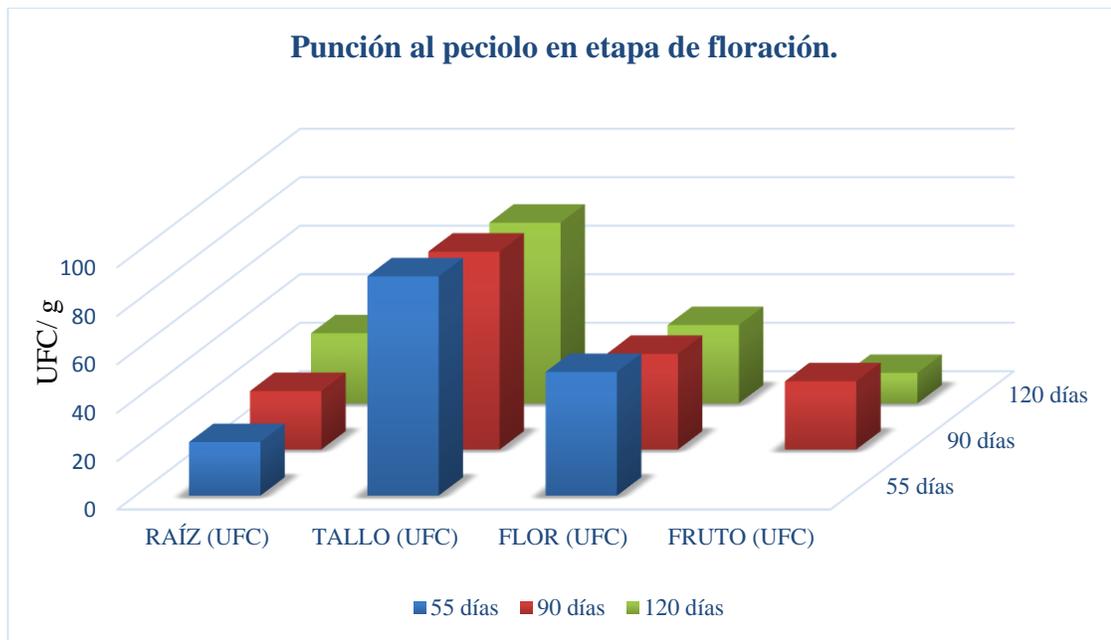
UFC: Unidades Formadoras de Colonias recuperadas por gramo de muestra a los diferentes días de muestreo.

Figura 2. Recuperación de *Salmonella* Enteritidis. Inoculación en el tallo.



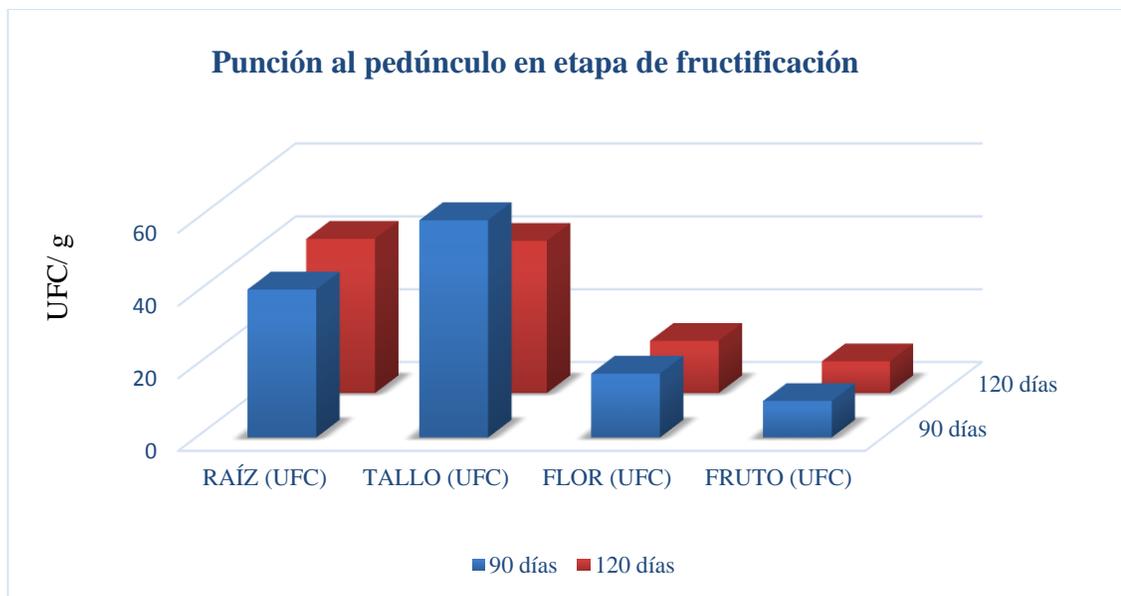
UFC: Unidades Formadoras de Colonias recuperadas por gramo de muestra a los diferentes días de muestreo.

Figura 3. Recuperación de *Salmonella* Enteritidis. Inoculación al peciolo.



UFC: Unidades Formadoras de Colonias recuperadas por gramo de muestra a los diferentes días de muestreo.

Figura 4. Recuperación de *Salmonella* Enteritidis. Inoculación al pedúnculo.



UFC: Unidades Formadoras de Colonias recuperadas por gramo de muestra a los diferentes días de muestreo.

Bibliografía

1. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de agricultura y protección al consumidor. Más frutas y Hortalizas. 2006. Consultado en noviembre del 2017.
2. Rodríguez-Sauceda EN. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. 2011. 7(1): 153-170.
3. Batz MB, Hoffman S, Morris JG. Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with the Greatest Burden on Public Health. Health. University of Florida, Emerging Pathogens Institute, Gainesville, FL.2011
4. OMS. Organización Mundial de la Salud. *Salmonella* (no tifoidea). Nota descriptiva. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
5. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National *Salmonella* Surveillance Annual Report — Appendices, 2010 [documento en internet]. US Department of Health and Human Services, 2013 [consultado el 26 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/salmonella-annual-report-appendices-2010-508c.pdf>
6. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* Infections Linked to Imported Maradol Papayas. 2017. Consultado en diciembre 2017. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
7. de Waal CS, Tian XA, Plunkett D. Outbreak Alert! Center for Science in Public Interest. Center for Science in the Public Interest. Washington, C.2009. Disponible en: <http://cspinet.org/new/pdf/outbreakalertreprot09.pdf>

8. Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW. The growing burden of foodborn outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiol Infect.*2009. 137:307-315.
9. Mandrell RE. *Microbial Safety of Fresh Produce: Enteric human pathogens associated with fresh produce: Sources, transport, and ecology.* Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologies, Ames, IA. Gravani, eds. 2009.1:5-31.
10. Avendaño-Ruiz B, Varela-Llamas R. *Estudios Fronterizos, Universidad Autónoma de Baja California.* 2010. Vol. 11, Núm. 21. Disponible en: <http://ref.uabc.mx/ojs/index.php/ref/article/view/137/253>
11. SAGARPA/ SENASICA. *Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Asamblea General de Asociados, Agrocare.* 2016.
12. FDA. Food and Drug Administration. *La FDA Investiga Múltiples Brotes de Cepas de Salmonella Vinculadas a Papayas.* 2017. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm568393.htm>
13. Beuchat LR. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 2002.4:413-23
14. Aviat F, Gerhards C, Rodriguez-Jerez JJ, Michel V, Le-Bayon I, Rached Ismail R, Federighi M. *Microbial Safety of Wood in Contact with Food: A Review.* *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016. 15(3):491-505.
15. Ocaña-de Jesús RL, Gutiérrez-Ibáñez AT, Sánchez-Pale JR, Mariezcurrena-Berasain MD, Velázquez-Garduño G, Laguna-Cerda A, Rojas-Puebla I.

- Microbiological quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) produced under greenhouse conditions in five Municipalities of the State of Mexico. *Phyton*. 2015. 84:1.
16. Brackett RE. Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables. *J Food Qual*.1987. 10:195-206.
 17. del Rosario BA, Beuchat LR. Survival and Growth of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Cantaloupe and Watermelon. *J Food Prot*. 1995. 58:105-107.
 18. Conner DE, Kotrola JS. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 1995. 61(1):382-385.
 19. Fernández EE, Castillo AA, Saldana LJ. Survival and Growth of *Salmonella* and *Shigella* on Sliced Fresh Fruit. *J Food Prot* .1989. 52: 471-472.
 20. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases. The challenges of 20 years ago persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol*. 2010.139.
 21. DGE. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. Anuario de Morbilidad 1984 – 2016 México, DF.2016. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-epidemiologica>.
 22. SSA. Anuarios de morbilidad [documento en internet]. Secretaría de Salud, México, 2013 [consultado el 26 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

23. Calva E, Lopez-Macías, Mussaret BZ, Constantino-López M. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. Rev Latinoam Microbiol. 2006. Vol. 48(2)121 – 125.
24. T-Brandl M, Clayton-E C, Max-Teplitski. *Salmonella* Interactions with Plants and Their Associated Microbiota. Phytopathology. 2013. 103:316-325.
25. 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.
26. Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.
27. Norma Oficial Mexicana. NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. México, D.F., Diario Oficial de la Federación.
28. Winn, Washington C, Elmer W, Koneman. Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. Print. 6ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Medica Panamericana. 2008.
29. SAS. Institute Inc. (2002). SAS/STAT User's Guide, Software version 9.0. Cary, N.C., USA.
30. Caro A, Got P, Lesne J, Binard S, Baleux B. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. Appl Environ Microbiol.1999.7: 3229–3232
31. Semenov AM, Kuprianov AA, van Bruggen AH. Transfer of enteric pathogens to successive habitats as part of microbial cycles. Microbiol Ecol. 2010. 60:239-249.

32. Schikora A, Virlogeux-Payant I, Bueso E, Garcia AV, Nilau T, Charrier A, et al. Conservation of *Salmonella* infection mechanisms in plants and animals. 2011. PLoS ONE. 6(9).
33. Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. Persistence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Foodborne Pathog Dis. 2004. 1(1):27-35.
34. Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. Fate of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Appl Environ Microbiol. 2004. 70(4):2497-2502
35. Natvig E, Ingham S, Ingham H, Cooperband L, Roper T. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soil with incorporated bovine manure. App Environ Microbiol. 2002. 68: 2737-2744.
36. Franz E, van Diepeningen A, De -Vos Oj, van Bruggen Ahc. The effect of cattle feeding regime and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in manure, manure-amended soil and lettuce. Appl Environ Microbiol. 2005. 71:6165-6174.
37. Rodríguez DM, Elaine-Torres F, Gutierrez EV, López MP, Martínez MM. Determinación de *Salmonella Typhimurium* en compost inoculado artificialmente empleado en cultivo de lechuga. Acta biol Colomb. 2008. 13(3):61 – 74.

38. Chang JM, Fang TJ. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against E. coli O157:H7. *Food Microbiol.* 2007. 24(7-8):745–751.
39. Thurston-Enriquez JA, Watt P, Dowd SE, Enriquez R, Pepper IL, Gerba CP. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J Food Prot.* 2002.65(2):378-382.
40. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. Estadísticas del Agua en México.2007. ISBN 978-968-817-852-2
41. López-Cuevas O, León-Felix J, Jiménez-Edeza M, Chaidez-Quiroz C. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Rev. Fitotec.Mex.*32(2): 119-126, 2009.
42. Johannessen GS, Bengtsson GB, Heier BT, Bredholt S, Wasteson Y, Rørvik LM. Potential Uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from Organic Manure into Crisphead Lettuce. *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71(5):2221-2225.
43. Ibenyassine K, Mhand R, Karamoko Y, Anajjar B, Chouibani M, Ennaji M. Bacterial pathogens recovered from vegetables irrigated by wastewater in Morocco. *J Environ Health.* 2007. 69(10):47-51.
44. Gu G, Hu J, Cevallos-Cevallos JM, Richardson SM, Bartz JA, van Bruggen AH. 2011. Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in tomato plants. 2011. *PLoS One* 6: e27340. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3212569/>
45. Golberg D, Kroupitski Y, Belausov E, Pinto R, Sela S. *Salmonella Typhimurium* internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int J Food Microbiol.* 2011.31;145(1):250-257.

46. Barak JD, Gorski L, Naraghi-Arani P, Charkowski AO. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl Environ Microbiol* .2005.71: 5685–5691.
47. Franz E, Visser, AA, Van Diepeningen AD, Klerks MM, Termorshuizen AJ, van-Bruggen AH. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Food Microbiol*. 2007.24: 106–112.
48. Klerks MM, Franz E, Gent-Pelzer M, Zijlstra, C, Bruggen AH. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plantmicrobe factors influencing the colonization efficiency. *ISME J*. 2007. (7):620-631
49. Melnikov A, Zaborina O, Dhiman N, Prabhakar B, Chakrabarty A. Clinical and environmental isolates of *Burkholderia cepacia* exhibit differential cytotoxicity towards macrophages and mast cells. *Mol Microbiol*. 2000. 36:1481- 1493.
50. Cao H, Baldini RL, Rahme LG. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol*.2001. 39:259-284
51. Iniguez AL, Dong YM, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, et al. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2005.18: 169–178.
52. Baloda S, Christensen L, Trajcevska S. Persistence of a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl Environ Microbiol*. 2001. 67:2859-2862.
53. Solomon EB, Yaron S, Matthews KR. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its

subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol.* 2002.68:397-400. (Online)

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.1.397-400.2002>

54. Lemunier M, Francou C, Rousseaux S, Houot S, Dantigny P, Piventeau P, et al. Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste compost. *J Appl Microbiol.* 2005.71(10):5779-5786.
55. McMahon M, Wilson I. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2001. 70:155-162.
56. Weissinger W, Chantarapanony L, Beuchat R. Survival and growth of *Salmonella* baidon in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. *J Food Microbiol.* 2000. 62:123-131.
57. SAGARPA, SEDAGRO, SENESICA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Secretaria de Desarrollo Agropecuario, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2010. Disponible en: www.gob.mx
58. Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti Infect. Ther.* 2008.6: 733-750
59. Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Aoppl. Environ. Microbiol.* 2006. 72:3284-3290.

VIII. Discusión General

Los resultados referentes a la calidad microbiológica de tomate producido bajo condiciones de invernadero de 5 Municipios del Estado de México indicaron la presencia de Mesofilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Los resultados demostraron la existencia de serios problemas de contaminación y sobrevivencia microbiana dentro de los invernaderos estudiados, sugiriendo que la disminución de los problemas sanitarios relacionados con los frutos está en la educación de los manipuladores según el checklist realizado en cada invernadero (tutorado, deshoje, corte y poda), y personal encargado del control sanitario de esta actividad. Esto es debido a que se observó que los trabajadores no emplean las medidas de control al momento de corte y no usan guantes, así como ningún tipo de desinfectante, lo anterior concuerda con lo mencionado por Avila *et al.*, 2008 que sugirieron tomar acciones correctivas que minimicen los riesgos de contaminación microbiológica durante el proceso de producción, como por ejemplo la capacitación a productores y personal. Estos resultados sugieren el potencial de brotes de enfermedades a partir del consumo de este alimento en fresco, pero también indica que es posible minimizar el riesgo al proteger a los productos hortícolas del contacto con heces fecales provenientes de la presencia de animales domésticos y de las mismas manos de los trabajadores al no tener la higiene adecuada.

La identificación en medios diferenciales y específicos de las colonias encontradas, resaltan la presencia de *E. coli*, lo cual coincide con lo reportado por Luna *et al.*, 2012 quienes reportaron a *Escherichia coli* como una de las bacterias encontradas con mayor frecuencia en esta misma hortaliza.

En este mismo sentido las pruebas bioquímicas, serotipificación y PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) confirman la identidad de la bacteria aislada. La serotipificación la agrupo como *E. coli* enteropatógena O157:H16 flagelar, mientras que el PCR identifico los grupos filogenéticos que amplificaron bandas de 279, 211 y 152 pb, ubicándolas en el grupo filogenético D, perteneciente a las cepas diarreogénicas. Este resultado es de destacar debido a que Feng *et al.* (2012) mencionan el serogrupo O157 contiene, además del serotipo O157:H7 (perteneciente al patotipo STEC (*E. coli* productora de toxina shiga) y asociado a casos de diarrea con o sin sangre y síndrome urémico hemolítico [SUH]), cepas heterogéneas, en general no-H7, algunas de ellas caracterizadas como (Enteropatógenas) EPEC típica (tEPEC) o atípica (aEPEC). Así mismo indica el aislamiento de cepas aEPEC en diferentes especies animales con diarrea o sin esta, como vacas, ovejas, cabras, cerdos, aves de corral, venados y monos tití (Feng *et al.*, 2012)

Aunque no hay evidencia de transmisión directa del animal al humano, algunas cepas aEPEC de origen animal pertenecen a serogrupos implicados en enfermedad humana. Esto sugiere que algunos animales podrían constituir un reservorio importante de aEPEC desde donde estas cepas podrían transmitirse a humanos (Hernandes, 2009)

De los resultados obtenidos de la segunda etapa para conocer la persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16, O105ab y *Salmonella* serovar Enteritidis en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) indicaron la recuperación de las cepas de *E. coli* y *Salmonella* en tejidos de las plantas de tomate diferentes al punto de inoculación, lo que indica la capacidad de estas para ingresar, permanecer y moverse a través de los órganos de la planta y sobrevivir a lo largo de las etapas fenológicas del cultivo. Como factible punto de entrada de esta bacteria en las plantas se identifica a la raíz, que es la principal vía de absorción de alimentos y agua

(Merick, 2013), pero las heridas inducidas en los tejidos también son puntos de ingreso para las bacterias.

Se estimo que *E. coli* y *Salmonella* lograron sobrevivir en el sustrato y en la planta hasta 120 días posteriores a la inoculación. Estos resultados coinciden con estudios de campo que resaltan la persistencia de *Salmonella* serotipo Typhimurium durante 231 días en suelos modificados con estiércol donde fueron recuperados patógenos en la superficie de las plantas de lechuga y perejil, en donde *Salmonella* sobrevivió hasta la etapa de cosecha. En este sentido Natving *et al.* (2002) y Franz *et al.* (2005) encontraron que diferentes texturas de suelos pueden favorecer la colonización de hortalizas como la lechuga esto debido a la formación de agregados, retención de agua y tensión de oxígeno; factores que posiblemente permitieron la sobrevivencia del microorganismo durante todo el cultivo.

Estos resultados sugieren la capacidad de sobrevivencia de las dos bacterias en ambientes no propios para este tipo de microorganismos, por lo que, dependiendo de la vulnerabilidad del consumidor y la cantidad de bacterias recuperadas en los frutos, son capaces de causar una Enfermedad Transmitida por Alimentos.

Las diferentes punciones realizadas a la planta de tomate en tallo, peciolo y pedúnculo; así como la recuperación en órganos no inoculados, incluso en fruto para cosecha, comprueban la capacidad de la bacteria para presentar movilidad y sobrevivencia, similar a lo encontrado por Golberg *et al.*, 2011 en hojas de lechuga donde *S. Tiphymorium* penetró la epidermis, entró a través de estomas abiertos en un proceso que implicó motilidad o movilidad flagelar y quimiotaxis. Se ha documentado que la transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ocurrir por suelo contaminado con estiércol (fertilizante) y a través del agua de irrigación en plantas de lechuga (Schwartz y Margulis, 1981). Además, algunos autores resaltan que la carga microbiana presente en un vegetal depende de la

probabilidad de que el producto esté en contacto con la fuente de contaminación durante el cultivo: suelo, fertilizantes orgánicos y agua de irrigación (Brandt *et al.*, 2006; Holden, 2009). Y a partir de que ocurre la contaminación, ser hospederos alternos (Lynch *et al.*, 2009) y permanentes como lo sugiere nuestros resultados. Pero contrasta con los reportes donde han empleado abono contaminado con microorganismos patógenos durante todo el ciclo del cultivo de hortalizas de porte bajo por la característica de estar más cerca al suelo poseen mayor riesgo de contaminación, por lo que se enfatiza que la extensión de la planta no es factor limitante para la movilidad del patógeno, y con ello la transmisión ocurrir en cualquier etapa del cultivo, tanto en condiciones de invernadero como en campo abierto (Baloda *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2002; Lemunier *et al.*, 2005). Estos autores destacan como factores de riesgo la cantidad y calidad de bioabono aplicado (Islam *et al.*, 2004b), la inoculación de las plantas desde la semilla y reinoculación del microorganismo de prueba a lo largo del cultivo (Johannessen *et al.*, 2005 y Franz *et al.*, 2005), la cantidad y calidad de agua durante el riego, cosecha o distribución (Natving *et al.*, 2002; McMahon *et al.*, 2001; Weissenger *et al.*, 2000).

Las bacterias presentaron similar comportamiento en su penetración, traslocación y sobrevivencia al ser inoculadas por punción en el tejido vegetal o agregadas al sustrato; con tendencia a reducir la población bacteriana hasta no detectable en algunos frutos conforme transcurría el tiempo. Esto no sugiere la ausencia de las misma, ya que se ha reportado que bacterias patógenas en ambientes hostiles pueden entrar en estado viable, pero a su vez no son cultivables lo que dificulta su aislamiento e identificación en medios selectivos (Caro *et al.*, 1999). Por otra parte, Natving *et al.*, 2002, reportan que el riego periódico puede contribuir la disminución de la población bacteriana. La sobrevivencia

también nos indica su capacidad de traslocarse en el interior de la planta, así como pasar de una etapa fenológica a otra hasta llegar a la cosecha del fruto.

La mayor respuesta de recuperación del serotipo O157:H16 recuperada en plantas de tomate del invernadero de Texcalitlán se asocia con la posible adaptación que pudo haber desarrollado al tener contacto con dicho cultivo (Machado *et al.*, 2006; Orozco *et al.*, 2008).

Las cepas inoculadas presentaron la capacidad de moverse en toda la planta de forma ascendente por el xilema y descendente por el floema, sin mostrar ningún tipo de respuesta o síntoma en la plantas. Otros autores, sin embargo, demostraron que las enterobacterias pueden activar el sistema de defensa de *Arabidopsis thaliana*, que expresaron clorosis y marchitez (Schikora *et al.*, 2008) similar a lo reportado por Landa *et al.*, 2013 donde *Salmonella* inoculado en nopal verdura mostró su habilidad para inducir una respuesta de defensa y síntomas de enfermedad (oscurecimiento denso y deshidratación) en cladodios. Se reporta que el constante contacto del patógeno con el cultivo ya sea por el uso de abonos, aguas de mala calidad, presencia de animales y humanos, incrementaría la población bacteriana del patógeno debido a la presencia de nutrientes disponibles (Ibenyassine, 2007) y a su vez existe la posibilidad de que este pueda llegar al fruto; comportamiento que presentó el patógeno en la presente investigación. Otros estudios demuestran que patógenos transmitidos por alimentos pueden unirse a las hojas de plantas y ser internalizados al aprovechar heridas o el sistema de raíces endofítica para ser introducido en cualquier punto de la cadena de producción (Gu *et al.*, 2011).

Otro de los peligros de la inocuidad de alimentos es la internalización de la bacteria en la planta, esto va a depender del tipo de secreción presente y de que los flagelos se encuentren intactos (Golberg *et al.* 2011), Barak *et al.* (2005) y Franz *et al.* (2007) mencionan que

Salmonella spp. varían en su capacidad de colonización en plantas de lechuga y alfalfa, debido a factores de virulencia que favorecen la colonización e internalización (Klerks *et al.*, 2007). La expresión de dichos genes aun no es clara, pero diversos estudios referencian su expresión con mayor frecuencia en microorganismos Gram negativos, por la presencia en la pared de lipopolisacáridos y proteínas que ofrecen resistencia a diversos factores ambientales (Melnikov *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2001; Iniguez *et al.*, 2005).

Conocer el comportamiento de *E. coli* y *Salmonella*, así como los procesos involucrados en su internalización y supervivencia en plantas cuyas partes comestibles se consumen en fresco es de gran importancia, ya que los desinfectantes solo previenen la contaminación superficial y no tienen acceso a tejidos internos (Barak *et al.*, 2012; Cooley *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 2002). Esto representa un riesgo latente para el consumidor, si desde etapas tempranas el cultivo se contamina.

Los resultados de la presente investigación permitieron identificar la capacidad de *E. coli* y *Salmonella* para internalizar, permanecer y moverse en plantas y frutos de tomate. Esto abre las puertas a futuras investigaciones para poder evaluar a otros patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* e incluso virus entéricos como Norovirus ya que han sido documentados están relacionados en brotes alimentarios.

Finalmente, es importante resaltar que productos cuyo consumo es en fresco como el tomate, de manera natural pueden contener microorganismos epífitos no patógenos, pero durante el crecimiento, cosecha y transporte existe manipuleo, donde el producto pasa por diferentes vías y puede contaminarse por patógenos de origen animal y humano (Hamilton *et al.*, 2006; Ocaña *et al.*, 2015). Con frecuencia estos productos se consumen sin un lavado y desinfección adecuado. En este estudio el patógeno se movió de manera descendente y ascendente hasta llegar al fruto, por lo que su contenido microbiano puede

representar un factor de riesgo para la salud del consumidor y por lo tanto un problema de seguridad alimentaria:

IX. Conclusiones Generales

En un invernadero de producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de los municipios evaluados se encontró presencia de *Escherichia coli*, en específico el serotipo O157:H16 que representa riesgo a los consumidores si lo ingieren crudo.

Tres cepas de *E. coli* (O157:H7, O157:H16 y O105ab) y *Salmonella Enteritidis*, al ser inoculadas al sustrato y por medio de punciones, presentaron la capacidad de penetrar en plantas de tomate, lograron permanecer durante el desarrollo del cultivo hasta 120 días y traslocarse hasta los frutos.

Todas las bacterias evaluadas se transportaron a las diferentes partes de la planta hasta llegar al fruto sin mostrar ningún síntoma que pudiera advertir de su presencia.

La persistencia dependió de la etapa fenológica (vegetativa, floración, fructificación y Madurez Fisiológica) en que se hizo la inoculación, así como al patógeno inoculado y al serotipo al que pertenecían las cepas.

Los mayores recuentos en frutos de tomate lo tuvieron en primer lugar cepas de *E. coli* de los serotipos O157: H16 y O157:H7; seguido por *Salmonella* Enteritidis y el serotipo de *E. coli* O105ab.

Los resultados encontrados indican que enteropatógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* en contacto con plantas de tomate representa un peligro latente, ya que, al presentar la capacidad de penetrar, permanecer y traslocarse hasta llegar al fruto, limita la acción de los métodos de desinfección utilizados normalmente.

X. Bibliografía consultada

1. Althaus D., Hofer E., Corti S., Julmi A., and Stephan R. 2012. Bacteriological Survey of Ready-to-Eat Lettuce, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts Collected the Swiss Market. *Journal of Food Protection* 75:1338–1341.
2. Avila, G., Sanchez E., Muñoz E., Martínez L. R. y Villalobos E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica en frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton, Revista Internacional de Botánica Experimental* 77: 129-136.
3. Ávila-Quezada G. D., Sánchez E., Gardea-Béjar A. A. and Acedo- Félix E. 2010. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*: survival and growth in plant tissue. *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science* 38:47-55. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/01140671003767834>
4. Barak J.D., Gorski L., Naraghi-Arani P., Charkowski A.O.2005. *Salmonella* enterica virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5685–5691.
5. Batz M.B., Hoffman S., Morris J.G. 2011. Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with the Greatest Burden on Public Health. Health. University of Florida, Emerging Pathogens Institute, Gainesville, FL.
6. Benenson S., Raveh D., Schlesinger, Alberton J., Rudensky B., Hadas-Halpern I. and Yinnon A.M. 2001. The risk of vascular infection in adult patients with non-Typhi *Salmonella* bacteriemia. *The American Journal of Medicine* 110 (1):60-63.
7. Berger C.N., Sodha S. V., Shaw R.K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12:2385-2397.

8. Bernstein N., Sela S., Neder-Lavon S. 2007a. Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *Journal of Food Protection* 70:1717-1722.
9. Bernstein N., Sela S., Pinto R., Ioffe M. 2007b. Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. *Journal of Food Protection* 70:471-475.
10. Beuchat L.R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*. 4:413-23.
11. Beuchat L.R., Ryu J.H. 1997. Produce handling and processing. *Emerging Infectious Diseases* 3:459-465.
12. Bihn E. A., Gravani R. B., Hawkes J. 1999. Reduzca la contaminación microbiana con buenas prácticas agrícolas. Publicación del Programa “Good Agricultural Practices Program” de la Universidad de Cornell, E.U.
13. Bihn E.A y Gravani R.B. 2005. Good agricultural practices in produce safety. In: *Microbiology of fresh produce: Emerging issues in food safety*, Matthews KR, ed. ASM Press: Washington, DC, pp. 21-53.
14. Blackburn, C. y P. McClure. 2002. Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Boca Raton, FL: CRC Press. 3-12.
15. Brandt S., Pek Z., Barna E. 2006. Lycopene content and color of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:568-572.
16. Brandl M y Amudson R. 2008. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied Environmental Microbiology* 74:2298-2306.

17. Burnett S.L. and Beuchat L.R. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25:281-287. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000106>. Fecha de consulta: 13 de noviembre 2017.
18. Calva E., López-Macías, Mussaret B.Z., Constantino-López M. 2006. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2):121 – 125.
19. Calvin L. 2003. Produce, food safety, and international trade: Respose to US foodborne illness outbreaks associated with imported produce. In: *International Trade of Food Safety, AER-828*. Economic Research Service/ USDA. Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/publications/aer828/aer828g.pdf>. Fecha de consulta: 12 de octubre, 2017.
20. Cao H., Baldini R.L., Rahme L.G. 2001. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annual Review of Phytopathology* 39:259-284.
21. Carey C.M., Kostrzynska M. y Thompson S. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression on romaine lettuce using comparative real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 77:235-242. Disponibe en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.02.010>. Fecha de consulta: 19 de mayo 2017.
22. Caro A, Got P., Lesne J., Binard S., Baleux B. 1999. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Applied Environmental Microbiology* 7: 3229–3232.

23. Castillo A., Mercado I., Lucia L.M., Martínez-Ruiz Y., Ponce J., Murano E.A., Acuff G.R. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. *Journal of Food Protection*. 67:713-720.
24. Castro J, Rojas M., Noguera Y., Santos E.M., Zúñiga A., Gómez C.A. 2006. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. *Industria Alimentaria* 9-21.
25. Castro-Rosas J., Gómez Aldapa C. A., Acevedo-Sandoval O. A., González-Ramírez C. A., Villagomez-Ibarra J.R., Chavarría-Hernández N., Villarruel-López A., Torres-Vitela M del R. 2011. "Frequency and Behavior of *Salmonella* and *Escherichia coli* on Whole and Sliced Jalapeño and Serrano Peppers". *Journal of Food Protection* 74, 6, 874-881.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669062>. Fecha de consulta: 16 de agosto 2015.
26. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov>. Fecha de consulta: 25 de octubre 2014.
27. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2017. *Salmonella* Infections Linked to Imported Maradol Papayas. Fecha de consulta: 14 de diciembre 2017.
Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
28. Cedric N., Berger. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12(9), 2385-2397.
29. CENA VECE, 2016. Anuarios de morbilidad 1984-2016. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_enfermedad.html. Fecha de consulta: 6 de diciembre 2017.

30. Cooley M.B., Miller W.G. and Mandrell R.E. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella* enterica and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied Environmental Microbiology* 69:4915-4926.
31. Cuellar J. 2001. El Codex Alimentarius y su Importancia para la Salud Pública Taller subregional sobre gestión del Codex y programación de actividades del proyecto TCP/RLA/0065. Disponible en:
http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/pdf/salud.pdf. Fecha de consulta: 18 de septiembre 2015.
32. Clayton H., 2006. An epidemiologic study to describe the relationship between farming practices and microbial indicator concentrations on produce from farms in the southern United States. Thesis (M.P.H.). Emory University.
33. DebRoy C., Roberts E., Fratamico M. 2011. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews* 9 (2): 169 - 185.
34. Deering A.J, Mauer L.J. and Pruitt R.E. 2012. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants. *Food Research International* 45:567-575.
35. Dong Y., Iniguez A.L., Ahmer B.M.M., Triplett E.W. 2003a. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1783-1790.
36. Dong Y., Iniguez A.L., Triplett E.W. 2003b. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant and Soil* 257:49-59.

37. Doyle M.P y Erickson M.C. 2007. Summer meeting 2007. The problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology* 105:317-330.
38. Erickson M. 2012. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3:283-310.
39. Feng P.C., Keys C., Lacher D.W., Beutin L., Bentancor A., Heuvelink A, Afset J.E., Rumi V., Monday S. 2012. Clonal relations of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H16 strains isolated from various sources from several countries. *FEMS Microbiology Letters* 337:126-131.
40. Ferens W.A y Hovde C.J. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:465-487.
41. Fernández E. E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. P 11.
42. FIRA. Fideicomiso Instituido en Relación con la Agricultura. Panorama agroalimentario. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. tomate rojo. 2016.
43. Franz E., Van Diepeningen A., De -Vos Oj, Van Bruggen Ahc. 2005. The effect of cattle feeding regime and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure, manure-amended soil and lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6165-6174.
44. Franz E, Visser A.A., Van Diepeningen A.D., Klerks M.M., Termorshuizen A.J., van- Bruggen A.H. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology* 24: 106–112.

45. Food and Drug Administration (FDA). 2017. La FDA investiga múltiples brotes de cepas de *Salmonella* Vinculadas a Papayas. 2017. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm568393.htm>. Fecha de consulta: 2 de noviembre 2017.
46. García Blancas P., Mendoza Medellín A. 2014. Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias. Acta bioquímica clínica latinoamericana 48 (2): 249-54.
47. Gomes C., Da Silva P., Moreira R.G., Castell-Pérez E., Ellis E.A. y Pendleton M. 2009. Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. International Journal of Food Microbiology 135:238-247. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.026>. Fecha de consulta: 12 de enero 2017.
48. Golberg D., Kroupitski Y., Belausov E., Pinto R, Sela S. 2011. *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. Int J Food Microbiol 31;145(1):250-257.
49. Gorbach S. L., J. G. Bartlett, N.R. Blacklow. 2004. Infectious Diseases. 3rd ed. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. USA. 2700p.
50. Greene, S. K., E. R. Daly, E. A. Talbot, L. J. Demma, S. Holzbauer. 2008. “Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005.” Epidemiology and Infection 136: 157–165.
51. Greig J.D., Todd E.C.D., Bartleson C.A., Michaels B.S. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. Journal of Food Protection 70:1752-1761.

52. Gu G., Hu J., Cevallos-Cevallos J.M., Richardson S.M., Bartz J.A., van Bruggen A.H. 2011. Internal colonization of *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* in tomato plants. PLoS One 6: e27340. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3212569/>
53. Guo X., Van Iersel M.W., Chen J., Brackett R.E., Beuchat L.R. 2002. Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. Applied and Environmental Microbiology 68:3639-3643.
54. Gyles C. L., 2007, “Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview”. Journal of Animal Science 85 (E. Suppl.): E45–E62.
55. Hamilton A.J., Stagnitti F., Premier R., Boland A.M., Hale G. 2006. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. Applied. Environmental Microbiology 72:3284-3290.
56. Heaton J.C. and Jones K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. Journal of Applied Microbiology 104:613-626.
57. Helms M, J. Simonsen, K. Molbak. 2006. “Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study”. Journal of Infection. 3 (3): 217-225.
58. Hernandez R.T., Elias W.P., Vieira M.A.M., Gomes T.A.T. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 297:137-149.
59. Hernández F., Monge R., Jiménez C., Taylor L. 1997. Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica. International Journal of Food Microbiology 37:221-223.

60. Hernández C.C., Aguilera A.M.G., Castro E. G. 2011 Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 31 (4): 137-151.
61. Hirotsu H., Naranjo J., Moroyoqui P.G., Gerba C.P. 2001. Demonstration of indicator microorganisms on surface of vegetables on the market in the United States and Mexico. *Journal of Food Science* 67:1847-1850.
62. Hughes D. T. y Sperandio V. 2008. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology* 6(2):111-20.
63. Iguchi A., Thomson N.R., Ogura Y., Saunders D., Ooka T., Henderson I.R., Harris D., Asadulghani M., Kurokawa K., Dean P., Kenny B., Quail M.A., Thurston S., Dougan G., Hayashi T., Parkhill J., Frankel G. 2009. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *Journal of Bacteriology* 191(1):347-54.
64. Iniguez A.L., Dong Y.M, Carter H.D., Ahmer B.M.M., Stone J.M. 2005. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 18: 169–178.
65. Islam M., Morgan J., Doyle M.P., Phatak S.C., Millner P., Jiang X. 2004a. Persistence of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens and Disease* 1(1):27-35.
66. Islam M, Morgan J, Doyle M.P., Phatak S.C., Millner P., Jiang X. 2004b. Fate of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied Environmental Microbiology* 70(4):2497-2502.

67. Izumi H., Poubol J., Hisa K., Sera K. 2008. Potential sources of microbial contamination of satsuma mandarin fruit in Japan, from production through packing shed. *Journal of Food Protection* 71:530-538.
68. Jablasone J, Warriner K. and Griffiths M. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology* 99:7- 18.
69. Jaramillo, J., V.P. Rodríguez, M.A. Guzmán, M.A. Zapata y T. Rengifo. 2007. Buenas Prácticas Agrícolas-BPA Producción de tomate bajo condiciones protegidas. 65 CORPOICA – MANA – Gobernación De Antioquia - FAO. Manual Técnico No 21. 331p.
70. Kaper J., Nataro J., Mobley H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-140.
71. Kauffmann F., Orskov F., Ewing W. 1956. Designations for the k antigens of *Escherichia coli* serotypes. *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy* 6 (2): 63 – 64.
72. Klerks M. M., Franz E., Gent-Pelzer M., Zijlstra C., Bruggen A.H. 2007. Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plantmicrobe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME Journal* 7:620-631.
73. Kroupitski Y., Golberg D., Belausov E., Pinto R., Swartzberg D., Granot D. and Sela S. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology* 75:6076-6086. Disponible en: [http:// dx.doi.org/10.1128/aem.01084-09](http://dx.doi.org/10.1128/aem.01084-09). Fecha de consulta: 19 de febrero 2017.

74. Kutter S., Hartmann A., Schmid M. 2006. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. Federation of European Microbiological Societies 56: 262-271. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com> Fecha de consulta: 15 de octubre 2017.
75. Landa Salgado P., A. M. Hernandez Anguiano, M. Vargas Hernandez, C. A. Eslava Campos, C. Chaidez Quiroz y J Patel. 2013. Persistencia de *Salmonella* Typhimurium en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) Revista Fitotecnia Mexicana 36 (2): 147 – 153.
76. Lemunier M., Francou C., Rousseaux S., Houot S., Dantigny P., Piventeau P. 2005. Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste compost. Journal of Applied Microbiology. 71(10):5779-5786.
77. León J.S, Jaykus L.A, Moe C.L. Heredia N., Wesley I., García S. 2009. Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables. In: Microbiologically safe foods. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, pp. 255-290.
78. López C., Cerna J.F., Villegas N., Thompson R., Velazquez F.R., Torres J., Estrada T. 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases 127-131. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.3201/eid0901.010507>.
Fecha de consulta: 16 de diciembre 2016.
79. López-Molina J., Eslava-Campos C.A. 2015. *Escherichia coli* diarrogénica. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Departamento de Microbiología y parasitología, recursos en bacteriología. UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México.

80. Lugtenberg B.J.J., Dekkers L. and Bloemberg G.V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. Annual Review of Phytopathology 39:461- 490. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.46>. Fecha de consulta: 16 de marzo 2017.
81. Luna, M.L., A. Delgado, B.E. Herrera, A.G. Torres, F. Avelino, A. Navarro, F. Parada. 2012. Diversity of enterobacteria associated with tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill) fruits and greenhouse soils. Journal of Scientia Agropecuaria 2: 161-169.
82. Luna Guevara M.L., J.J. Luna Guevara, H. Ruiz Espinosa, L. Leyva Abascal y C B. Díaz González. 2015. Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y ultrasonido sobre *Escherichia coli* inoculada en frutos de tomate y el impacto sobre la actividad antioxidante. Revista Argentina de Microbiología 47(3):251-255.
83. Lynch M.F., Tauxe R.V., Hedberg C.W. 2009. The growing burden of foodborn outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. Epidemiology and Infection 137:307-315.
84. Machado D.C., Maia C.M., Carvalho I.D., da Silva N.F., Dantas M.C., Andre PB. 2006. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. Brazilian Journal Microbiology 37:538-544. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822006000400025>. Fecha de consulta: 11 de febrero 2015.
85. Malorny B. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella*. Food Applied Environmental Microbiology 70:7046-7052.

86. Mandrell, R. 2009. "Enteric human pathogens associated with fresh produce: sources, transport, and ecology." In *Microbial Safety of Fresh Produce*, edited by X. Fan, B. A. Niemira, C. J. Doona, F. E. Feeherry, and R. B. Gravani. Ames, Iowa: Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologies.
87. McMahon M., Wilson I. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70:155-162.
88. Mejía A. A., y H. R. Lopez. 2008. Propuesta Legislativa. Senado de la República. Gaceta 16.
89. Melnikov A., Zaborina O., Dhiman N., Prabhakar B., Chakrabarty A. 2000. Clinical and environmental isolates of *Burkholderia cepacia* exhibit differential cytotoxicity towards macrophages and mast cells. *Molecular Microbiology* 36:1481- 1493.
90. Méric G., Kemsley E.K., Falush D., Siggers E.J., Lucchini, S. 2013. Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology* 15: 487–501.
91. Natvig, E.E., Ingham, S.C., Ingham, B.H., Cooperband, L.R. and Roper, T.R. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2737–2744
92. NF V08-060. 1996. Microbiologie des aliments - Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C. Organización Nacional Francesa para Estandarización (AFNOR).

93. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Norma Oficial Mexicana. México.
94. NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Norma Oficial Mexicana. México.
95. NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
96. NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
97. NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Norma Oficial Mexicana. México.
98. NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Norma Oficial Mexicana. México.
99. NOM-120-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas. Norma Oficial Mexicana. México.
100. NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. Norma Oficial Mexicana. México.
101. NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Norma Oficial Mexicana. México.

102. National Center for Biotechnology (NCBI). 2017. Information.Taxonomy database. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Fecha de consulta: 18 de diciembre 2017.
103. Ocaña R.L., Gutiérrez A.T., Sánchez J.R., Mariezcurrena M.D., Velázquez G., Laguna A., Rojas I. 2015. Microbiological quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) produced under greenhouse conditions in five Municipalities of the State of Mexico 84:45-50.
104. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Estimaciones de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria. Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria (FERG). Pp.1-2. Disponible en:
http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/es/.
Fecha de consulta: 17 de agosto 2016.
105. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Inocuidad de los alimentos, Centro de prensa. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>. Fecha de consulta: 2 de diciembre 2017.
106. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. Centro de prensa, *E. coli*. Nota descriptiva. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
Fecha de consulta: 3 de enero 2018.
107. Orskov I., Orskov F., Jann B., Jann K. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriological Reviews 41 (3): 667 – 710.
108. OPS,2017. González Ayala, Silvia E. Cecchini, Diego M. Diagnostico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos.

Disponible en: <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroetas/modulo2/modulo2z1.html>. Fecha de consulta: 16 de noviembre 2017.

109. Orozco L., Rico R., Fernández E.E. 2008. Microbiological Profile of Greenhouses in a Farm Producing Hydroponic Tomatoes. *Journal of Food Protection* 1: 60–65.
110. Palomino-Camargo C. y González-Muñoz Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 31(3):535-546. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v31n3/a20v31n3.pdf>. Fecha de consulta: 16 de enero 2018.
111. Pao S., Long W., Kim C., Rafie A.R. 2012. *Salmonella* population rebound and its prevention on spray washed and non-washed jalapeño peppers and roma tomatoes in humid storage. *Foodborne Pathogens and Disease* 9(4):361-366.
112. Petterson S.R, Teunis P.F., Ashbolt N.J. 2001. Modeling virus inactivation on salad crops using microbial count data. *Risk Analysis* 21:1097-1108.
113. Pommerville J. C.2004. *Alcamo's Fundamentals of Microbiology* 7th edition. Jones and Bartlett Publishers 318-320 ISBN 0-7637-0067-3.
114. Popoff M.Y. and Le Minor L. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume II, Editorial Board, p. 786.
115. Popoff M.Y. y Le Minor L. 1992. *Antigenic formulas of the Salmonella serovars*. Institute Pasteur. Dr. Roux. Paris, France.
116. Prescott L.M., Harling J.P., Klein D.A. 2004. "Microbiologia" 5a edicion, editorial McGraw-Hill. Pp1034 – 1036.

117. Ramos Ortega A., Carballo Carballo A., Hernández Livera A., Corona Torres T., Sandoval Villa M. 2006. Caracterización de líneas de jitomate en hidroponía. *Agricultura Técnica en México* 32:213-223.
118. Riley L.W., Remis R.S. and Helgerson D. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine* 308:681-685. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198303243081203>. Fecha de consulta: 18 de abril 2017.
119. Rivera J.M., Rodríguez C. y López J. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26:45- 48. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-6342009000100009&script=sci_arttext. Fecha de consulta: 12 de mayo 2017.
120. Rodríguez M., De Diego I. y Mendoza M.C. 1998. Extra-intestinal salmonellosis in a general hospital 1991-96. Relationships between *Salmonella* genomic groups and clinical forms. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3291.
121. Rodríguez I., Herrero A., Martínez N., Martín M.C., Rodicio M.R. y Mendoza M.C. 2006. Detección and caracterización of *Salmonella enterica* serovar Virchow. En: “Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and their Interactions”. Méndez Vilas. Ed. Wiley- VCH, Alemania. Pp. 687-91.
122. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Monografía de cultivos, jitomate Pp. 3-10.
123. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2011. Tomate. Disponible en:

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/Tomate.aspx>

124. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2016. Sanidad e Inocuidad para producir Alimentos con calidad de exportación. Boletín de prensa. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JACO108-26.aspx>. Fecha de consulta: 15 de abril 2016.
125. Saldaña Z., Sánchez E., Xicohtencatl-Cortes J., Puente J.L. and Giron J.A. 2011. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology* 2:119. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00119>. Fecha de consulta: 14 de marzo 2016.
126. Sánchez Cruz E. 2014. Normatividad vigente aplicada a la inocuidad de las frutas y hortalizas frescas en México. Memorias, Congreso Internacional de Fitopatología. Ixtapan de la sal, Edo. De México.
127. SAS. Institute Inc. (2002). SAS/STAT User's Guide, Software version 9.0. Cary, N.C., USA.
128. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17:(1) 7–15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192848>. Fecha de consulta: 16 de enero 2018.
129. Scheutz F., Cheasty T., Woodward D., Smith H.R. 2004. 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* 112 (6) 569-584.
130. Sheutz F, Strockbine N. 2005. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941TAL. *Bergey's Manual of systematic bacteriology* 2: 607 – 624.
131. Schikora A., Carreri A., Charpentier E., Hirt H. 2008. The dark side of the salad: *Salmonella* Typhimurium overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. 2008. *PLoS One* 3 e2279. (On-line) doi:10.137/journal.pone.0002279
132. Schwartz W y Margulis L. 1981. *Symbiosis in Cell Evolution. Life and its Environment on the Early Earth.* 59 Tab. San Francisco 22: 427.
133. SEDAGRO, Secretaría de Desarrollo Agropecuario. 2016. Producción Agrícola por cultivo, Gobierno del Estado de México. Disponible en: http://sedagro.edomex.gob.mx/produccion_agricola_por_cultivo_2016. Fecha de consulta: 7 de febrero 2018.
134. SENASICA, Servicio Nacional de sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección de Inocuidad agroalimentaria. 2011. Operación orgánica y plaguicidas de uso agrícola. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx>. Fecha de consulta: 12 de marzo 2015.
135. SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. Una mirada al panorama Agroalimentario de México y el mundo. Boletín semanal del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA. Número 18. Disponible en: <http://www.campomexicano.gob.mx/boletinsiap/018-e.html>. Fecha de consulta: 18 de marzo 2016.

136. SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas Agroalimentario. 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>. Fecha de consulta: 3 de febrero 2017.
137. Smoot M.L, Pierson M.D. 1997. Microorganismos indicadores y criterios microbiológicos. Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. Ed. Acribia. España. pp. 69-82.
138. Solomon, E.B., Yaron, S. and Matthews, K.R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalisation. Applied Environmental Microbiology 68:397–400. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.1.397-400.2002>. Fecha de consulta: 25 de Junio 2017.
139. Solomon E. B. y Matthews K.R. 2005. Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. Journal of Food Protection 68:870-873.
140. Terragno R., Cafer M., Bruna S. y Binsztei N. 2003. Manual de procedimientos. *Salmonella*, aislamiento identificación y serotipificación. Instituto Nacional de enfermedades infecciosas. Global Salm-SURV y CDC. Buenos Aires argentina.
141. Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. 1995. Microbiology An Introduction 5th edition. The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc. ISBN 0-8053-8496-0 Pp. 278-279.
142. United States Department of Agriculture, USDA. 2001. Agricultural chemical usage: fruit and vegetable agricultural practices. Disponible en: <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1568>. Fecha de consulta: 9 de mayo de 2014.

143. Ukuku O.D., Sapers G.M. 2001. Effect of Sanitizer Treatments on Salmonella Stanley Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-cut Tissues during Cutting Practices. *Journal Food Protection* 64:1286-1291.
144. Wan-Ying X., Jian-Qiang S. and Yong-Guan Z. 2015. Phyllosphere bacterial community of floating macrophytes in paddy soil environments as revealed by illumine high-throughput sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 81:522-532. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03191-14>. Fecha de consulta: 12 de febrero 2017.
145. Wang F, Yang Q, Kase JA, Meng J, Clotilde LM, Lin A and Ge B. 2013. Current trends in detecting non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Foodborne Pathogens and Disease* 10:665-677. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1448>
146. Wachtel MR, Whitehand LC, Mandrell RE. 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection* 65:18-25.
147. Warriner, K., Ibrahim, F., Dickinson, M., Wright, C., Waites, W.M., 2003a. Interaction of *Escherichia coli* with growing salad spinach plants. *Journal of Food Protection* 66, 1790–1797.
148. Warriner, K., Spaniolas, S., Dickinson, M., Wright, C., Waites, W.M., 2003b. Interaction of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo with growing bean sprouts. *Journal of Applied Microbiology* 95, 719–727.
149. Weissinger W., Chantarapanony L., Beuchat R. 2000. Survival and growth of *Salmonella* bairdii in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. *Journal Food Microbiology* 62:123-131.

150. Wu, Y., 2009. "Multiplex PCR-capillary electrophoresis-SSCP used to identify foodborne pathogens." *Eur Food Res Technol* 228: 511-518.
151. Zucca I, Bougeois CM, Mescle JF. 1998. *Microbiología alimentaria Volumen 1*. Acribia: España, pp 487-677