



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**“DETERMINACIÓN DE MESÓFILOS AEROBIOS, COLIFORMES  
TOTALES Y FECALES EN EL CULTIVO DE ESPINACA (*Spinacia  
oleracea* L.), PRODUCIDO EN TRES MUNICIPIOS DEL ESTADO DE  
MÉXICO.”**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL**

**PRESENTA:**

**Katia Anahí Ramírez Cruz**

**Modalidad: Tesis individual**

**Asesores:**

**Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibáñez.**

**Dra. Gisela Velázquez Garduño**

**Campus Universitario El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca México. Febrero de 2017**

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN .....	vii
ABSTRAC .....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1. GENERAL.....	4
2.2. ESPECÍFICOS:.....	4
III. HIPÓTESIS .....	5
IV. JUSTIFICACIÓN .....	6
V. REVISIÓN DE LITERATURA .....	7
5.1. Producción e importancia del cultivo de la espinaca .....	7
5.2. Clasificación y taxonomía.....	8
5.3. Generalidades del cultivo .....	8
5.4. Producción internacional.....	10
5.5. Entorno Nacional de la producción de espinaca .....	12
5.6. Producción Estatal .....	13
5.7. Inocuidad Alimentaria .....	14

5.7.1. Peligro en los alimentos .....	15
5.7.2. Riesgo en la inocuidad .....	16
5.7.3. Enfermedades transmitidas por Alimentos (ETA) .....	17
5.7.4. Concepto de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).....	17
5.7.5. Concepto de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).....	18
5.8. Métodos para Análisis Microbiológico de Alimentos .....	18
5.8.1. Microorganismos Mesófilos Aerobios .....	20
5.8.2. Cuenta de Coliformes .....	20
5.9. Organismos relacionados con la Inocuidad Agroalimentaria .....	21
5.9.1. <i>Salmonella</i> spp. ....	21
5.9.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	22
5.9.3. <i>Shigella</i> spp. ....	23
5.9.4. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
5.10. Enfermedades gastrointestinales causadas por contaminación microbiológica en hortalizas.....	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
6.1. Ubicación geográfica de los municipios estudiados .....	28
6.2. Tamaño de la muestra .....	29
6.3. Toma de muestras.....	29
6.4. Preparación de las muestras para el análisis microbiológico .....	30
6.5. Siembra y determinación de Bacterias Mesófilas Aerobias .....	31
6.6. Siembra y determinación de Coliformes Totales y Fecales .....	32

<b>VII. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>33</b>
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>X. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA .....</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Principales municipios productores de espinaca del Estado de México.....	14
<b>Cuadro 2.</b> Ubicación geográfica de los municipios.....	28
<b>Cuadro 3.</b> Análisis de varianza multivariado (MANOVA) con valores de <i>P</i> para (MA, CT y CF) en el cultivo de espinaca, por efecto de municipio y localidad.....	36
<b>Cuadro 4.</b> Resultado de Mesófilos Aerobios por colecta por municipio y localidad .....	37
<b>Cuadro 5.</b> Resultado de Coliformes Totales por colecta por municipio y localidad .....	40
<b>Cuadro 6.</b> Resultado de Coliformes Fecales por colecta por municipio y localidad .....	42
<b>Cuadro 7.</b> Resultados Microbiológicos del análisis del agua.....	45
<b>Cuadro 8.</b> Resultados Microbiológicos del análisis del suelo.....	46

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
<b>Gráfica 1.</b> Participación de los primeros países productores de espinaca.....	11
<b>Gráfica 2.</b> Participación del valor de exportaciones mundiales de espinaca.....	12
<b>Gráfica 3.</b> Promedio de Mesófilos Aerobios por municipio del cultivo de espinaca.....	38
<b>Gráfica 4.</b> Promedio de Coliformes Totales por municipio del cultivo de espinaca.....	41
<b>Gráfica 5.</b> Promedio de Coliformes Fecales por municipio del cultivo de espinaca.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Producción de espinaca en México.....	13
<b>Figura 2.</b> Mapa de ubicación de los Municipios del Estado de México donde se realizó el experimento.....	28
<b>Figura 3.</b> Testigos: a) Mesófilos Aerobios agar cuenta estándar, b) Coliformes Totales agar rojo-violeta c) Coliformes Fecales Agar Bilis Rojo-Violeta.....	35

DETERMINACIÓN DE MESÓFILOS AEROBIOS, COLIFORMES TOTALES Y  
FECALES EN EL CULTIVO DE ESPINACA (*Spinacia oleracea* L.), PRODUCIDA  
EN TRES MUNICIPIOS DEL ESTADO DE MÉXICO.

Katia Anahí Ramírez Cruz. Ingeniero Agrónomo Industrial.  
Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Asesores: Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibáñez. Dra. Gisela Velázquez Garduño.

Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.  
Campus Universitario El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México  
Código Postal 50200. Tel. (fax) 29 65 529 ext. 192.  
[ramirezkatia@hotmail.com](mailto:ramirezkatia@hotmail.com), [atarini@uaemex.mx](mailto:atarini@uaemex.mx), [giselavelazquez@hotmail.com](mailto:giselavelazquez@hotmail.com)

### **Resumen**

El objetivo de esta investigación fue determinar la contaminación de origen microbiológico en el cultivo de espinaca, producida en tres Municipios del Estado de México mediante la identificación de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales con el fin de conocer la calidad del producto y que a su vez podamos conocer los posibles riesgos que puedan provocar enfermedades al consumidor y así poder aplicar estrategias preventivas antes de su consumo, así mismo se analizaron muestras de agua de riego y suelo para poder determinar las posibles causas de contaminación del cultivo de la espinaca.

Para la determinación de microorganismos patógenos presentes en las muestras se utilizaron las metodologías señaladas por las Normas Oficiales Mexicanas

NOM-092-SSA1-1994, NOM-109-SSA1-1994, NOM-110-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994.

En los resultados obtenidos de las muestras indican la presencia de microorganismos capaces de afectar la calidad del producto, para Mesófilos Aerobios no sobrepasan los límites permitidos por la NOM-092-SSA1-1994, mientras tanto para Coliformes Totales y Coliformes Fecales en el cultivo de espinaca se encontró el grado de contaminación de dichas variables está por debajo de los límites máximos permitidos por las NOM-113-SSA1-1994, al encontrar la presencia de estos microorganismos nos indica el grado de contaminación por materia fecal en el cultivo y la mala aplicación de prácticas de higiene por parte de los trabajadores ya que estas pueden ser las responsables de ocasionar enfermedades a los consumidores.

Para los resultados de suelo y agua de riego analizados arrojaron elevadas cantidades de contaminación de microorganismos mesófilos aerobios y coliformes fecales, sin embargo no existe norma que indique el límite máximo permitido por dichos microorganismos.

**Palabras clave:** Espinaca, Coliformes Totales, Coliformes Fecales y Mesófilos Aerobios

DETERMINATION OF AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA, TOTAL AND  
FECAL COLIFORMS ON SPINACH (*Spinacia oleracea* L.), PRODUCED IN  
THREE MUNICIPALITIES OF THE STATE OF MEXICO.

Katia Anahí Ramírez Cruz. Industrial Agronomical Engineer. Autonomous  
University  
Of State of Mexico. Faculty of Agricultural Science.

Advisers: Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibáñez. Dra. Gisela Velázquez Garduño.

Autonomous University of State of Mexico. Faculty of Agricultural Science  
Campus Universitario El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México  
Código Postal 50200. Tel. (fax) 29 65 529 ext. 192.

[ramirezckatia@hotmail.com](mailto:ramirezckatia@hotmail.com), [atarini@uaemex.mx](mailto:atarini@uaemex.mx), [giselavelazquez@hotmail.com](mailto:giselavelazquez@hotmail.com)

**Abstrac**

The objective of this research was to determine the contamination of microbiological origin in the spinach culture, produced in three Municipalities of the State of Mexico by means of the identification of Aerobic Mesophiles, Total Coliforms and Fecal Coliforms in order to know the quality of the product and that In turn we can know the possible risks that can cause diseases to the consumer and thus be able to apply preventive strategies before consumption, and also analyzed samples of irrigation water and soil to be able to determine the possible causes of contamination of the spinach crop. For the determination of pathogenic microorganisms present in the samples, the methodologies indicated by Official Mexican Standards NOM-092-SSA1-1994, NOM-109-SSA1-1994, NOM-110-SSA1-1994 and NOM-113- 1994. In the results obtained from the samples indicate the presence of microorganisms capases to affect the quality of the product, for Aerobic Mesophylls do not exceed the limits allowed by NOM-092-SSA1-1994, meanwhile for Total Coliforms and Fecal Coliforms in

the cultivation of Spinach was found the degree of contamination of these variables is below the maximum limits allowed by NOM-113-SSA1-1994, finding the presence of these microorganisms indicates the degree of contamination by fecal matter in the crop and the bad Application of hygiene practices by workers as they may be responsible for causing illness to consumers. Irrigated soil and water results showed high amounts of contamination of aerobic and fecal coliform mesophilic microorganisms, however, there is no standard that indicates the maximum limit allowed by these microorganisms.

**Keywords:** Spinach, total coliforms, fecal coliforms and mesophilic bacterial.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

La espinaca (*Spinacia oleracea* L.), es una especie hortícola que pertenece a la familia de las Quenopodiáceas, cultivada como verdura por sus hojas comestibles y de color verde muy oscuro. Su cultivo se realiza durante todo el año y se puede consumir fresca o cocida. En México como en otras partes del mundo, la espinaca se consume en fresco, es utilizada en jugos y ensaladas principalmente gracias a sus propiedades nutritivas para la salud del consumidor (Lopez, 2001). México no es un experto en la producción de espinaca, pero ha venido mejorando con nuevas estrategias, como son las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), que garantizan que el producto sea inocuo y pueda consumirse tanto en el mercado nacional como en el internacional, sin presentar ningún riesgo a la salud del consumidor (Morales, 2010).

En México esta hortaliza se cultiva principalmente en tierras de riego, en un total de dieciséis Estados. De acuerdo con datos del SIAP/SAGARPA (2015c) los Estados productores de espinaca más representativos son: Guanajuato con 672.00 hectáreas de superficie cosechada y una producción de 9 401,75 toneladas; Baja California con 513,20 hectáreas de superficie cosechada, con una producción de 8 755,48 toneladas; Puebla con 609.09 hectáreas de superficie y un rendimiento de producción de 5 785,02 toneladas; Estado de México con 248 hectáreas y un

rendimiento de 4 101,25 toneladas; Querétaro con 54 hectáreas y un rendimiento de producto de 1 188,00 toneladas; Aguascalientes con 60 hectáreas y un rendimiento de 1 186,25 toneladas; Ciudad de México con 90 hectáreas y un rendimiento de 711,76 toneladas; Hidalgo con 23 hectáreas y un rendimiento de 248,40 toneladas; Michoacán con 7 hectáreas y un rendimiento de 38,5 toneladas; y Durango con 1 hectárea y un rendimiento de 13 toneladas (SAGARPA/SIAP, 2015c).

Los principales municipios productores de espinaca en el Estado de México son: Tenango del Valle, Joquicingo, Valle de Chalco y Solidaridad, Texcalyacac Texcoco y Toluca (SAGARPA/SIAP, 2015c).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de origen vegetal son cada vez más comunes. en México como en Estados Unidos, la incidencia de enfermedades es frecuentemente asociada al consumo de frutas y hortalizas frescas, la contaminación de los vegetales proviene principalmente del manejo inadecuado del producto tales como los utensilios, herramientas de campo, agua de riego y personal de trabajo (Brandl y Mendrell, 2002).

La aplicación de los programas de inocuidad de alimentos constituyen en paso importante para reducir los posibles riesgos de contaminación en los productos hortofrutícolas a lo largo de la cadena de producción, distribución y

almacenamiento, garantizando que el producto sea inocuo y que no presente riesgos a la salud (Siller *et al.*, 2002)

En los últimos años, el consumo de hortalizas ha aumentado a nivel mundial. Una de las principales razones es que los diferentes grupos de consumidores consideran que estos productos son nutritivos, saludables y convenientes para su salud. Pero diferentes factores han contribuido al aumento del riesgo asociado con la presencia de microorganismos bacteriológicos tales como *Salmonella spp.*, *Shigella* y *Escherichia coli* (Campbell *et al.*, 2001).

En septiembre de 2006, la administración de alimentos y medicamentos (FDA) informo sobre un brote por el consumo de espinacas contaminadas con *E. coli* 0157: H7 que provocó un brote en 26 estados de Canadá, dando como resultado 5 muertos y 205 enfermos (Jay *et al.*, 2007).

Para esto, los productores del Estado de México están obligados a cumplir con las medidas internacionales de inocuidad en sus productos agroalimentarios, ya que la exportación de estos es primordial para su venta así como para los consumidores nacionales (FAO, 2008).

## II. OBJETIVOS

### 2.1. GENERAL.

Determinar la contaminación de origen microbiológico en el cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.), producida en tres Municipios del Estado de México (Tenango del Valle, Calimaya y Toluca).

### 2.2. ESPECÍFICOS:

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

- \* Identificar las UFC/mL de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales presentes en el cultivo de espinaca
- \* Cuantificar la presencia de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales presentes en el suelo y en el agua en el cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.), producida en tres Municipios del Estado de México (Tenango del Valle, Calimaya y Toluca).

### III. HIPÓTESIS

La producción de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) sembrada en tres Municipios del Estado de México, se encontrará dentro de los límites permitidos de Mesófilos Aerobios y Coliformes Fecales, establecidos por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La producción y demanda del cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) se ha incrementado notablemente a nivel estatal, nacional y mundial en los últimos años, siendo México uno de los principales exportadores de este producto. Es indispensable que el producto esté libre de cualquier contaminante microbiológico que pueda afectar la salud del consumidor, así mismo la inocuidad de este logrará que los canales de comercialización permanezcan abiertos a la exportación del producto, dado que, las actuales exigencias comerciales de inocuidad de los alimentos son muy estrictas, limitando la participación de pequeños productores que no cumplen con los estándares de calidad exigidos en el mercado.

El Estado de México, es el único productor de espinaca cuya comercialización es principalmente local, es decir, más de la mitad del producto se comercializa en el mismo Estado (SAGARPA/SIAP, 2015c).

Por tal motivo la importancia de esta investigación radicó en determinar calidad microbiológica (Mesófilos aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales) del cultivo de espinaca que se produce en el Estado de México cumplen con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994 y la NOM -113-SSA1-199 respecto a los Límites Máximos Permisibles de UFC/mL .

## V. REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1. Producción e importancia del cultivo de la espinaca

La espinaca es originaria de las regiones asiáticas principalmente de Persia, fue introducida a España por los árabes en el siglo XI y posteriormente comenzó a difundirse por Europa donde se establecieron cultivos para su explotación, principalmente en Holanda, Inglaterra y Francia para posteriormente cultivarse en otros países y aun más tarde en América (Borrego y Josep, 2002).

Las especies con mayor crecimiento (% anual) en el periodo 2000-2005 fueron: espárrago (7,8 %), espinaca (6,5 %), ajo (5,5 %), hongos comestibles (5,2 %) y lechuga (4,1 %) (Ferratto y Mondino, 2008).

Se considera que en el año 2011, la producción mundial de frutas y hortalizas alcanzó los 1,575 millones de toneladas. Cerca de 850 millones de toneladas de hortalizas y 725 millones de toneladas de fruta. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*), a nivel mundial la producción de estos productos han experimentado crecimientos sostenidos durante los últimos años (Minagricultura, 2014).

En México, como en otras partes del mundo, preferimos consumir la espinaca en presentaciones frescas, pero gracias a los avances tecnológicos para su procesamiento y a las modificaciones en gustos y costumbres de las nuevas

generaciones, se ha visto en la necesidad de transformar a diferentes subproductos como son; cremas, purés y salsas. Lo que exige calidad en cuanto a su distribución y venta en fresco, determinando y condicionando nichos de mercado, dado que en el comercio mundial, la espinaca en fresco ha estado expandiéndose, principalmente, entre países vecinos, gracias a la producción de aranceles (firma de tratados comerciales) y a menos costos de transporte derivados de las cercanías geográficas, como es el caso de Estados Unidos, Canadá y México (SAGARPA, 2011).

## 5.2. Clasificación y taxonomía

- \* **Reino:** Plantae
- \* **División:** Magnoliophyta
- \* **Clase:** Magnoliopsida
- \* **Orden:** Caryophyllales
- \* **Familia:** Chanopodiaceae
- \* **Género:** *Spinacia*
- \* **Especie:** *Spinacia oleracea*
- \* **Nombre científico:** *Spinacia oleracea* L. (NCBI, 2016)

## 5.3. Generalidades del cultivo

La espinaca es una planta anual, su raíz es pivotante, poco ramificada y desarrollo superficial; es de tallo erecto de 30 cm a 1 m en el que se sitúan las

flores, de hojas caulíferas, más o menos alternas y pecioladas, de forma y consistencia muy variables, en función de la variedad. Peciolo cóncavo y a menudo rojo en su base, con longitud variable, que va disminuyendo poco a poco a medida que soporta las (Arias *et al.*, 2010).

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

En términos generales las necesidades óptimas para el desarrollo y producción del cultivo de espinaca son: temperaturas mínimas de 3°C a 8°C, máximas de 20°C a 23°C, óptimas de 18°C y una humedad relativa de 60,0 a 80,0% (Gile *et al.*, 2009)

Las condiciones de iluminación y temperatura influyen decisivamente sobre la duración del estado de “roseta”. Al alargarse los días (más de 14 horas de luz diurna) y al superar los 15°C de temperatura, las plantas pasan de la fase vegetativa (roseta) a la de “elevación” y producción (emisión de tallo y flores)

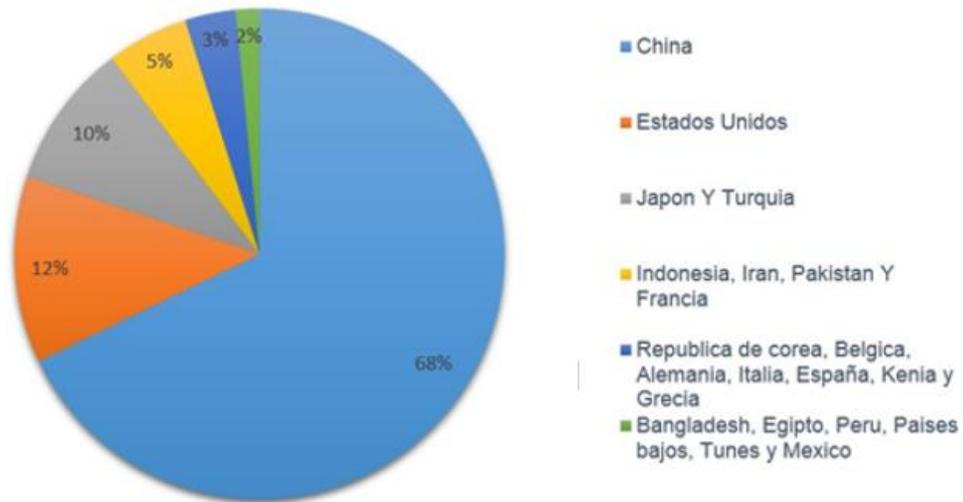
(Morales, 2010). La producción se reduce si el calor es excesivo y a lo largo del fotoperiodo, dado que las plantas pertenecen en la fase de roseta muy poco tiempo, con lo que se alcanza un crecimiento adecuado (Gorini, 2009).

Es una especie bastante exigente en cuanto a suelo y prefiere terrenos fértiles, de buena estructura física y de reacción química equilibrada. Por lo tanto, el terreno debe ser fértil, profundo, bien drenado, de consistencia media, ligeramente suelto, rico en materia orgánica y nitrógeno, del que la espinaca es muy exigente. No debe secarse muy fácilmente, ni permitir el estancamiento de agua. En suelos ácidos con pH inferior a 6.5, se desarrolla mal, a pH ligeramente alcalino se produce el enrojecimiento del peciolo y a pH muy elevado es muy susceptible a la clorosis (Gorini, 2009).

#### **5.4. Producción internacional**

La producción de espinaca en el año 2015 se distribuyó de la siguiente manera: China fue el principal productor de espinaca en el mundo, con una participación de 68,0%, le sigue Estados Unidos con 12,0%; Japón y Turquía con 10,0%, Indonesia, Irán, Pakistán y Francia con 5,0%; República de Corea, Bélgica, Alemania, Italia, España, Kenia y Grecia con 3,0% y Bangladesh, Egipto, Perú, Países bajos, Tunes y México con tan solo 2,0% de participación en la producción (FAO, 2015), como se muestra en la Gráfica 1.

## Principales países productores de espinaca

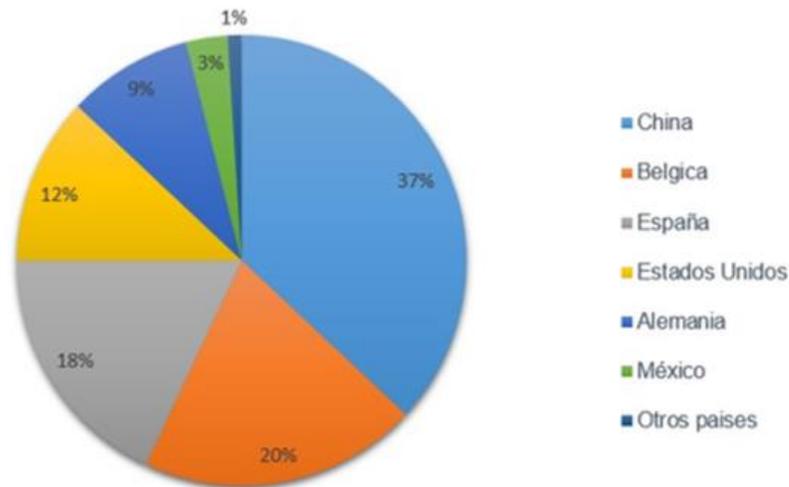


Gráfica 1. Participación de los principales países productores de espinaca a nivel mundial.

Fuente: FAO, 2015

En exportaciones mundiales, China ocupa el primer sitio, con 37,0% del volumen de exportaciones mundiales de espinaca; Bélgica tiene el segundo lugar con 20,0%; y España en tercer lugar, con 18,0% del total mundial (Gráfica 2)

## Paises exportadores de espinaca en el mundo



Gráfica 2. Participación del valor de exportaciones mundiales de espinaca.

Fuente: FAO, 2015

Con respecto a las gráficas 1 y 2, puede observarse que México solo produce el 2,0% de espinaca a nivel mundial, pero se coloca dentro de los 10 principales países exportadores de éste producto, por lo cual es de gran importancia mejorar la calidad e inocuidad de la espinaca, para que esto permita incrementar el mercado de exportación.

### 5.5. Entorno Nacional de la producción de espinaca

Durante el año 2015, se produjeron en todo México 39 738,91 Toneladas (ton) de espinaca, siendo el principal productor el Estado de Guanajuato, cuya producción representa el 28,0% del total nacional, el segundo lugar, Baja California y Puebla con 23,0%, tercer lugar, Estado de México con 7,0%, cuarto lugar, Querétaro con 6,0%. Siguen en la lista Aguascalientes con 4,0%, Distrito

Federal con 3,0%, Hidalgo con 2,0% y Michoacán y Durango con un 1,0%. Regionalmente, a todo lo largo del territorio nacional se distribuye la producción de espinaca, sin embargo las zonas productoras de mayor importancia son la zona noroeste y la zona centro. Como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Principales Estados productores de espinaca en México  
Fuente: SIAP/SAGARPA, 2015c.

## 5.6. Producción Estatal

Según datos de SIAP/SAGARPA, 2015c, el Estado de México es considerado dentro de los principales productores de espinaca pues produce aproximadamente 4 101,25 toneladas de espinaca anualmente.

Los principales Municipios productores en el Estado de México se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Toneladas de espinaca producidas por en los Municipios del Estado de México.

Municipio	Producción (Ton)
Tenango del Valle	3 144,96
Joquicingo	462,24
Valle de Chalco Solidaridad	352,50
Calimaya	96,60
Toluca	33,00
Texcoco	11,96
Producción total	4 101,25

Fuente: SIAP/SAGARPA, 2015a

### 5.7. Inocuidad Alimentaria

La inocuidad alimentaria es cualquier producto alimenticio que esté libre de contaminantes (Osuna, 2012). La higiene en los alimentos está orientada por consiguiente a reducir al mínimo la contaminación, los cuales puedan producir un peligro para la salud humana (Johns, 2008).

La inocuidad alimentaria se puede entender como la implementación de medidas para reducir los riesgos tanto biológicos como químicos, con la finalidad de proteger a los consumidores de peligros involuntarios (Avendaño *et al.*, 2006)

### **5.7.1. Peligro en los alimentos**

Peligro es un agente biológico, químico o físico presente en el alimento que puede causar un efecto adverso para la salud del consumidor (Forsythe y Hayes, 2002).

#### **5.7.1.1. Tipos de peligros asociados a productos agrícolas**

##### **a) Peligros Biológicos**

Son aquellos microorganismos patógenos como: bacterias, virus y parásitos que pueden causar un efecto nocivo a la salud de los consumidores, (Gardea *et al.*, 2007). Algunos de los patógenos microbiológicos asociados con las frutas y hortalizas frescas son *Salmonella* spp, *Shigella* spp., cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, virus análogos al de Norwalk, virus de la Hepatitis A y parásitos tales como *Ciclospora*. Algunos de estos patógenos están asociados al entorno agrícola o agua contaminada, mientras que otros pueden proceder de trabajadores infectados esto puede suceder cuando la persona que manipula los frutos no procura una higiene adecuada (Johns, 2008).

##### **b) Peligros Químicos**

Los peligros químicos son toda sustancia, que por accidente puedan llegar a contaminar el alimento o durante cualquier etapa de la cadena productiva y que al entrar al organismo, ya sea ingerido, inhalado o por vía cutánea, sea un riesgo para la salud. Existen peligros químicos naturales como son las toxinas

producidas por hongos y que principalmente se llegan a desarrollar en los cereales o frutos secos. También se consideran peligros químicos los metales pesados como plomo, arsénico, mercurio y cadmio que se pueden encontrar en los terrenos de cultivo y el agua; así como agentes de limpieza utilizados en el proceso productivo, aceites y lubricantes utilizados en la maquina o equipo de cosecha y empaque, plaguicidas, antibióticos y hormonas aplicadas a los cultivos (Gardea *et al.*, 2007).

### **c) Peligros físicos**

Los peligros físicos son cualquier material extraño no comestible cuya presencia es indeseable en un alimento, como pedazos de vidrio, metales, madera, piedras, plásticos, cabello, uñas, entre otros; que de alguna forma pueden llegar al producto (llevados por los trabajadores, provenientes del equipo o del material de empaque y que ponen en riesgo la salud del consumidor (Gardea *et al.*, 2007).

### **5.7.2. Riesgo en la inocuidad**

Riesgo, es la probabilidad de que un agente contaminante, presente en un alimento cause algún efecto nocivo para la salud humana (Forsythe y Hayes, 2002).

Los factores que influyen en la presencia de riesgos de contaminación en los procesos productivos de alimentos son: la materia prima infectada o de

procedencia desconocida, el almacenamiento inadecuado de materia prima y producto terminado, los malos hábitos de higiene y de procesos de los manipuladores, las malas condiciones de las instalaciones físicas de la empresa, equipos inadecuados, deficientes, la falta de mantenimiento, Instalaciones sanitarias inadecuadas o deficientes; manejo inadecuado de residuos sólidos y líquidos, manejo inadecuado de control de plagas y la falta de capacitación y técnicas (Rodríguez, 2004).

### **5.7.3. Enfermedades transmitidas por Alimentos (ETA)**

Son cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o tóxica cuya causa parece tener origen en el consumo de alimentos y/o agua, es decir son enfermedades causadas por algunos microorganismos o algún contaminante químico cuyo vehículo sea un alimento, el cual no ha sido procesado y manipulado bajo condiciones adecuadas tales que afecten a la salud del consumidor (Barrera, 2010).

### **5.7.4. Concepto de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)**

Conjunto de medidas higiénico-sanitarias mínimas que se realizan en el sitio de producción primaria de vegetales, para asegurar que se minimiza la posibilidad de contaminación física, química y microbiológica de un vegetal o producto fresco. Las BPA incluyen métodos de cultivo, cosecha, selección, almacenamiento y transporte de los productos agrícola, desarrolladas y

aplicadas para asegurar su buena condición sanitaria, mediante la reducción de los peligros de contaminación biológica, química y física (SIAP/SAGARPA, 2015b).

#### **5.7.5. Concepto de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)**

Las Buenas Prácticas de Manufactura BPM son una herramienta de gran importancia para la obtención de productos seguros para el consumo humano. La implementación de las BPM apunta a asegurar la inocuidad y la salubridad de los alimentos. La inocuidad de los alimentos es una característica de calidad esencial y engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad, abarcando toda la cadena de alimentación, desde la producción hasta el consumo (SIAP/SAGARPA, 2015b).

Las BPM son el conjunto de procedimientos, condiciones, y controles que se aplican en las plantas de empaque, las cuales incluyen limpieza y esterilización del equipo, utensilios, instalaciones físicas y sanitarias, así como higiene y salud del personal antes y durante dichos procesos con el objetivo de disminuir los riesgos de contaminación, química, física y biológica de los productos empacados (Barrera, 2010).

#### **5.8. Métodos para Análisis Microbiológico de Alimentos**

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

- **Recuento en placa:** método utilizado para la cuantificación del número de células viables o unidades formadoras de colonias (UFC) en el alimento.
- **Método del número más probable (NMP):** es un cálculo estadístico del número de células viables. Se basa en determinar la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismos.
- **Técnicas de reducción de colorantes:** Se utiliza para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora. Está basado en el uso de colorantes que pasan por un proceso de reducción.
- **Recuento microscópico directo,** tanto para células viables como para las no viables y se prepara con porta objetos, se tiñe con un colorante adecuado y se cuentan las células (ICMSF, 2000).

El método más utilizado para el conteo de microorganismos en alimentos es el de recuento en placa. Una ventaja muy importante de esta técnica es que mide el número de células viables, se requiere por lo general 24 horas para la formación de colonias visibles, aunque esta técnica no detecta a todos los microorganismos, pero sí a los más significativos para la calidad del alimento, por ejemplo a Mesófilos Aerobios ya que son indicadores general de la población que puede estar presente en la muestra (Adams y Moss, 2006).

Las bacterias son microorganismos unicelulares capaces de reproducirse en sí mismo por bipartición (mitosis), cuya velocidad de crecimiento depende de las condiciones del medio en que se encuentre como son temperatura, acidez, oxígeno y nutrientes. Son de interés sanitario ya que su presencia en alimentos son frecuentes (Martínez, 2004).

### **5.8.1. Microorganismos Mesófilos Aerobios**

Son todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30°C, pero pueden hacerlo en rangos muy amplios de temperaturas inferiores y mayores a los 30°C (ICMSF, 2000). El recuento de este tipo de microorganismos permite conocer el grado de contaminación de una muestra, se lleva a cabo a partir de diluciones decimales de la muestra, que se inoculan en placas vertidas en Agar cuenta Estándar. Las placas se inoculan en condiciones de aerobiosis a una temperatura de 35°C durante 24 a 48 horas. es importante aplicar las reglas indicadas en la NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa (Moreno *et al.*, 2000).

### **5.8.2. Cuenta de Coliformes**

El grupo de bacterias coliformes totales el cual comprende a todos los bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas, aunque algunos pueden ser fermentadores tardíos o no fermentadores. La mayoría de los coliformes pueden

encontrarse en la flora normal del tracto digestivo del hombre o animales, por lo cual son expulsados especialmente en las heces, por ejemplo *Escherichia coli* (Camacho *et al.*, 2009).

Los coliformes son el grupo más ampliamente utilizados en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. Estas bacterias se distinguen entre Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Su determinación se basa principalmente en fermentar la lactosa. La demostración y cuenta de microorganismos puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales (Camacho *et al.*, 2009).

Para la cuenta en placa se usa el medio Agar-Rojo-Violeta-Bilis-Lactosa (RVBA), en temperaturas y tiempos diferentes. Para la determinación de y se incuban a una temperatura de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  por un lapso de 24 horas (ICMSF, 2000).

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

### **5.9.1. *Salmonella* spp.**

Son bacilos gram-negativos facultativos anaeróbicos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Las salmonellas son quimioorganotróficas, con una capacidad para metabolizar nutrientes por las vías metabólicas respiratoria y fermentativa (Doyle *et al.*, 2001).

Entre las especies de mayor importancia se encuentra *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, que actúan en su mayoría originando efectos al hombre como infecciones gastrointestinales (Molina *et al.*, 2010).

### **5.9.2. *Escherichia coli* O157:H7**

Las cepas *Escherichia coli* son parte común de la microflora anaeróbica facultativa normal del tracto intestinal de las humanos y animales. La mayoría de los organismos de las cepas *E. coli* son inofensivos; sin embargo, algunas cepas son patógenas y provocan enfermedades diarreicas graves (Parrilla *et al.*, 2007). Las cepas de *E. coli* que provocan las enfermedades diarreicas se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serogrupos O:H diferentes. Estas clases incluyen: cepas de *E. coli* enteropatógenas (EPEC) que pueden producir diarrea grave; cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC) que son la causa principal de la diarrea infantil en los países en desarrollo y son los agentes responsables de la diarrea del viajero; cepas *E. coli* (EIEC) producen diarrea no sanguinolenta y disentería parecida a la producida por *Shigella* spp. Por invadir y multiplicarse en el interior de las células epiteliales del colon; diversas cepas de *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) se han sido relacionadas con diarrea en niños en México, estas cepas son capaces de producir diarrea ligera con sangre; cepas de *E. coli* enteroagregantes (EAaggEC) han sido relacionadas con diarrea persistente

en bebés y niños de diferentes países y cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) fueron identificadas por primera vez como un patógeno humano en 1982, cuando *E. coli* del serogrupo O157:H7 fue relacionado con dos casos de colitis hemorrágica (Doyle *et al.*, 2001).

### **5.9.3. *Shigella* spp.**

Existen cuatro especies del género *Shigella* agrupadas serológicamente: *Shigella dysenteriae* (grupo A), *S. flexneri* (grupo B), *S. boydii* (grupo C) y *S. sonnei* (grupo D). Como representante de la familia Enterobacteriaceae, en el aspecto genético son casi idénticas a *E. coli* y están emparentadas estrechamente con las especies de *Salmonella* y *Citrobacter*. La mayoría de las especies de *Shigella* son bacilos inmóviles gram-negativos, incapaces de fermentar lactosa.

La mayoría de los casos de shigelosis son ocasionados por la ingestión de comida o de agua contaminados fecalmente, y en el caso de los alimentos, el factor principal de la contaminación es la poca higiene de los manipuladores de alimentos. Este patógeno se puede propagar por varias vías, que incluyen los alimentos, los dedos de las manos y las heces fecales (Doyle *et al.*, 2001).

### **5.9.4. *Listeria monocytogenes***

*L. monocytogenes* es una bacteria gram positivas, es un anaerobio facultativo no esporulado y móviles con flagelos de forma bacilar. El género *Listeria* comprende numerosas especies como son *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L.*

*ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. seeligeri*. En el género *Listeria* solo son consideradas virulentas las especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Doyle *et al.*, 2001).

*L. monocytogenes* es una bacteria ampliamente difundida en la naturaleza. Su presencia en los alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente-tierra, agua servida (desagües de fábricas), material fecal, vegetación, ensilados y en torno a la producción de alimentos lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos (Doyle *et al.*, 2001).

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, como la *Salmonella*. La bacteria se transmite por alimentos cocidos que se contaminan luego del proceso térmico y por alimentos crudos. La listeriosis es considerada una infección oportunista; es decir se presenta en individuos vulnerables. Presenta dos tipos de cuadros: invasivo y gastroentérico. El cuadro más severo presenta manifestaciones invasivas que dan lugar a la septicemia, meningitis, conjuntivitis, encefalitis, endocarditis, partos prematuros y abortos, entre otros (Doyle *et al.*, 2001).

## 5.10. Enfermedades gastrointestinales causadas por contaminación microbiológica en hortalizas

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de origen microbiano y parasitario, son las causadas por el consumo de agua o comida contaminada por microorganismos patógenos, parásitos o sus toxinas. La contaminación de los alimentos puede ser endógena, o bien ocurrir en algún punto de su transformación. Por tanto, el agente etiológico debe existir en los animales, vegetales o medio ambiente donde se almacena, maneja o procesa el alimento (Flores *et al.*, 2005).

Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad (Flores *et al.*, 2005). Las manifestaciones de enfermedades transmitidas por alimentos son generalmente de tipo gastrointestinal, aunque no necesariamente, pues en muchos casos el cuadro clínico es principalmente de tipo extra-intestinal; por ejemplo: brucelosis, tifoidea y botulismos (Osuna, 2012).

En México en el año 2007, se reportaron 4,556 decesos causados por infecciones intestinales, dichas enfermedades, son ocasionadas por bacterias y parásitos ocupando la decimocuarta causa de fallecimientos a nivel nacional, los estados

con mayor incidencia son: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y el Distrito Federal, tan solo en el 2008, el Seguro Social brindo 2 millones 188 consultas asociadas con enfermedades gastrointestinales (Cortez *et al.*, 2011).

El tema de la inocuidad en la producción de alimentos involucra el estudio no sólo de los riesgos económicos para el sector exportador en Sinaloa, incluye también la prevención y detección de Enfermedades de Transmisión por Alimentos, cuyos costos se miden en vidas humanas.

La Secretaría de Economía, señaló que la promoción de las Enfermedades Transmitidas por alimentos afectan de manera negativa a la economía mundial ya que se reportaron 33 millones de casos de Enfermedades de Transmisión por Alimentos en 2010 costó por concepto de gastos de atención, sin calcular los días perdidos ni otros tipos de impacto, fue de 23 millones de dólares, y ocasionó entre seis y nueve mil muertes en todo el mundo (Osuna, 2012).

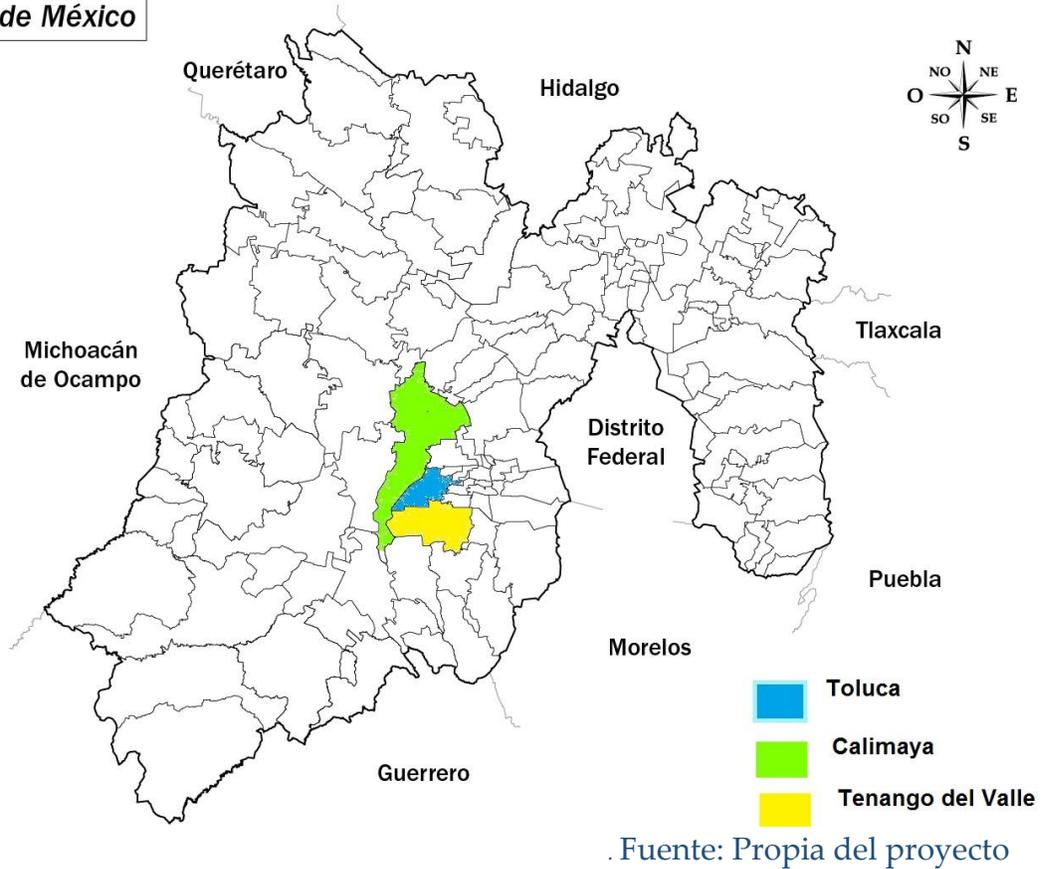
Existen más de 250 enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo, en el año 2010 se reportaron en México 5 millones 681 mil casos de estas enfermedades, según la cifras oficiales del Sistema Nacional de Vigilancia epidemiológica del País, pero se sospecha que en realidad son mucho más que las registradas (Osuna, 2012).

Según los reportes obtenidos del Departamento de Bioseguridad e Inocuidad Alimentaria de la UNAM apuntaron que el estados más afectado por las Enfermedades Transmitidas por Alimentos es Aguascalientes y el menos afectado es Baja California Sur. En el caso de la salmonelosis se reporta a Sinaloa como el más afectado (Osuna, 2012).

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la realización de este trabajo de investigación se muestrearon dos parcelas de tres municipios del Estado de México (Tenango del Valle, Calimaya y Toluca). Los análisis microbiológicos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Calidad de los Productos Agropecuarios, Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en la Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 14,5 Unidad El Cerrillo Piedras Blancas Toluca, México. (Figura 2).

Figura 2. Mapa de ubicación de los Municipios del Estado de México donde se realizó el experimento  
**Estado de México**



### 6.1. Ubicación geográfica de los municipios estudiados

Los tres municipios de estudio presentan las siguientes características geográficas (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Ubicación geográfica de los municipios.

Municipio	Altitud (msnm)	Latitud Norte	Longitud Oeste
Toluca	2,680	19° 16' 41.1"	99° 39' 23.1"
Calimaya	2,600	19° 10' 25"	99° 37' 02"
Tenango del Valle	2,600	18° 39' 7"	99° 31' 37"

Fuente: SIAP/SAGARPA, 2015b

## **6.2. Tamaño de la muestra**

El tamaño de muestras se realizó con un recorrido previo de las parcelas seleccionadas, de las cuales se muestrearon dos parcelas por cada municipio, la superficie de estos fue de 5 000 m<sup>2</sup>, debido al tamaño de las parcelas se decidió recolectar 10 muestras de espinaca en cada uno, se seleccionó con base a su apariencia y coloración.

## **6.3. Toma de muestras**

La toma de muestras se realizó en forma de zig zag recolectando 10 muestras totales de la superficie mencionada de espinaca al momento de la cosecha. El muestreo se realizó, cuando la espinaca concluyó su fase de crecimiento fisiológico. Las plantas de espinaca colectadas se colocaron en bolsas plásticas rotuladas con el nombre del municipio y el número de parcela correspondiente y se transportaron en condiciones de refrigeración en una hielera al Laboratorio de Calidad de los Productos Agropecuarios de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Así también se colectó una muestra compuesta de suelo de cada uno de las parcelas, dicha muestra fue obtenida de cinco puntos del terreno, cuatro de las orillas y una más del centro de la parcela, y una muestra de agua de riego, obtenida de los pozos de almacenamiento de agua. De la misma forma fueron rotulados y transportados de forma individual. .

Todo el material fue recolectado y transportado de acuerdo a lo señalado 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. Dicha norma menciona que la obtención de las muestras debe realizarse con rapidez pero de una manera cuidadosa, se debe evitar contaminación cruzada, al momento de la recolección y durante todo el transporte, y así mismo se declara que las muestras deben llegar lo más rápido posible al laboratorio para dar proceso a su análisis microbiológico.

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

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. Que se basa en la preparación de diluciones primarias para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en una porción de la muestra.

Para poder llevar a cabo las diluciones correspondientes se prepararon tubos de ensaye previamente lavados y esterilizados, cada uno se llenó con 9 mL de agua peptonada (solución de peptona al 0,1 % + NaCl al 0,85 %), los cuáles fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 30 min

Para la homogenización, se molieron 10 gr de muestras de materia vegetal perfectamente para poder eliminar las partículas de mayor tamaño en una zona limpia y previamente esterilizada en 90 mL de agua peptonada de cada una de las muestras, se extrajeron 10 mL para la solución madre y se realizaron las siguientes diluciones:  $10^0$  (solución madre), esta dilución contuvo exclusivamente 10 mL de espinaca molida,  $10^{-1}$  con 9 mL de agua peptonada y 1 mL de la dilución  $10^0$  y la dilución  $10^{-2}$  con 9 mL de agua peptonada y 1 mL de la dilución  $10^{-1}$ .

#### **6.5. Siembra y determinación de Bacterias Mesófilas Aerobias**

Para la siembra de bacterias Mesófilas Aerobias, se utilizó Agar para Cuenta Estándar, cada una de las muestras y soluciones se sembraron por duplicado.

Esta determinación se realizó siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 de Bienes y Servicios en su apartado sobre el “Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa”.

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias que se desarrollan en “Agar para Cuenta Estándar”.

El conteo se realizó por el método de cuenta total en placa después de ser incubadas  $48 \pm 1$  horas a una temperatura de incubación de  $35 \pm 2$  °C. Con ayuda del contador de colonias, se obtuvo el conteo total de los Mesófilos Aerobios existentes en cada una de las muestras de espinaca suelo y agua.

Para Mesófilos Aerobios la norma marca que se deben contar todas aquellas cajas que se encontraron en el intervalo de 25 y 250 UFC/ mL.

#### **6.6. Siembra y determinación de Coliformes Totales y Fecales**

Para la siembra de bacterias Coliformes Totales y Coliformes Fecales, se utilizó “Agar Rojo Violeta Bilis Lactosa (RBVA). Se sembró por duplicado cada una de las muestras, incubando a temperaturas y tiempos diferentes, para Coliformes Totales fue a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas y para Coliformes Fecales a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

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

Por ultimo las muestras de agua de cada parcela se sembraron de forma directa y por duplicado en cajas Petri; es decir que se tomó 1 mL, de la muestra, para determinar Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales.

Para la muestra de suelo se tomó 1 gr de suelo en 9 mL de agua peptonada para realizar las diluciones correspondientes, para su posterior siembra de los microorganismos en estudio.

Los datos obtenidos de los análisis microbiológicos en la espinaca, agua y suelo, fueron el resultado del conteo de microorganismos presentes en las cajas petri sembradas, utilizando el método de cuanta total en placa, reportándose en UFC/ mL, tal como lo establece, la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994,

Bienes y servicios. “Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa”, y la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. “Método para la cuenta de microorganismos Coliformes Totales en placa”.

## **VII. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para encontrar el efecto por localidad sobre las variables microbiológicas se aplicó un ANOVA, y para evaluar el efecto entre los dos factores municipio y localidad sobre las variables se aplicó un MANOVA, en tanto para la comparación de medias se realizó una prueba de Tukey. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de confianza del 95,0%. Se usó el paquete estadístico Stat Graphics Versión 5.0 plus.

Los resultados obtenidos por microorganismos analizados (Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Fecales) se presentan mediante cuadros, en estos se observó la cantidad de UFC/mL presentes en la espinaca, también se muestra el promedio de cada parcela y por municipio estudiado. Las gráficas muestran el Límite Máximo Permisible (LMP) establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Esta norma establece que para Mesófilos Aerobios el LMP debe ser menor o igual a 150,000 UFC/mL, en tanto para los Coliformes Fecales el LMP no debe de exceder de 100 UFC/mL.

También se analizó una muestra compuesta del suelo y el agua de riego, por cada municipio. La determinación de la Cuenta Total en Placa de UFC/mL de

las muestras de agua y suelo, ofrece información importante sobre el grado de contaminación de microorganismos patógenos presentes en el cultivo.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para todos los análisis microbiológicos realizados durante este trabajo de investigación se realizaron muestras testigos, la Figura 3 muestra las UFC/mL de microorganismos de estudio: los resultados obtenidos de los testigos demostraron que no existió ningún grado de contaminación durante el proceso lo que indica que el análisis estuvo bien realizado con las medidas de seguridad e higiene correspondiente de acuerdo a lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994.



Figura 3.- Testigos: a) Mesófilos Aerobios agar cuenta estándar, b) Coliformes Totales agar rojo-violeta c) Coliformes Fecales agar Bilis rojo-violeta

Se realizaron análisis microbiológicos de planta, agua y suelo de los cuales el resultado se reporta en UFC/mL, con respecto a la cantidad de Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Coliformes Fecales presentes en las placas.

Los resultados se obtuvieron con un MANOVA con un nivel de confianza del 95% para evaluar el efecto de los factores entre Municipio y Localidad (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Análisis de varianza multivariado (MANOVA) con valores de *P* para Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales y Fecales del cultivo de espinaca, por efecto de Municipio y Localidad

Valores de <i>P</i> (<0.05)			
	Mesófilos Aerobios	Coliformes Totales	Coliformes Fecales
<b>Municipio</b>	0.000 ++	0.1881 N.S	0.1332 N.S
<b>Localidad</b>	0.7428 N.S	0.2381 N.S	0.2390 N.S
<b>Municipio x Localidad</b>	0.2252 N.S	0.0021 ++	0.1363 N.S

*P* < 0.05 =indica diferencias significativas

+ = Significativo

++ = Altamente significativo

N.S = No Significativo

De acuerdo a los resultados obtenidos en el MANOVA, se encontró que existe efecto por municipio sobre la variable Mesófilos aerobios y efecto por la interacción municipio por localidad en Coliformes totales. Por lo que para encontrar este efecto se llevó a cabo un ANOVA por variable y una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas por efecto de Localidad y Municipio sobre las variables de estudio.

Los resultados obtenidos del crecimiento de microorganismos Mesófilos Aerobios de las parcelas y las diluciones empleadas se presentan en el Cuadro 4 y gráfica 3.

**Cuadro 4. Resultados de contaminación microbiológica por Mesófilos Aerobios en muestras de espinaca por Municipio y Localidad, expresadas en UFC/mL**

Mesófilos Aerobios						
Municipio	Localidad	Promedio	Promedio	D.S	P (<0.05)	Diferencia Significativa
		por localidad	por municipio			
Tenango del Valle	1	18,121.2	17,996.50	12,401.5	0.9678	N.S
	2	17,871.7		14,729.4		
Calimaya	1	2,827.5 <sup>a</sup>	9,347.30	1,571.9	0.0024	++
	2	15,867.0 <sup>b</sup>		11,603.0		
Toluca	1	41,715.5	37,765.10	13,039.9	0.5509	N.S
	2	33,814.7		38,979.9		

D.S = Desviación Estándar

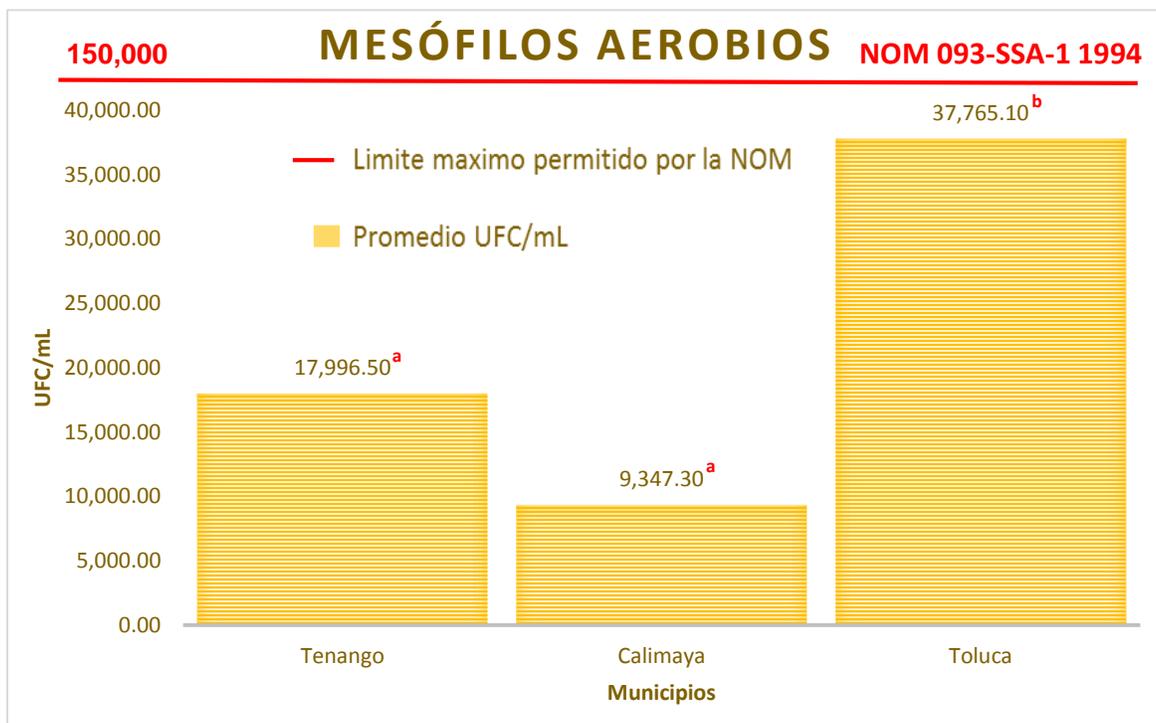
+ = Significativo

++ = Altamente significativo

N.S = No Significativo

<sup>a,b</sup> = Medias con literales son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ )

Se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.05$ ), por el factor localidad en el Municipio de Calimaya, dado que las características observadas de las dos parcelas muestreadas eran diferentes, posiblemente este comportamiento se debe a que una de las parcelas estaba más cerca de la urbanización pudiendo ser estos el principal factor de contaminación del cultivo.



Gráfica 3. Promedio de Mesófilos Aerobios por Municipio en muestras de espinaca.

Siguiendo los parámetros de aceptación de los niveles de contaminación microbiológica de la espinaca, en los tres Municipios del Estado de México se observa que las muestras analizadas presentaron algún grado de contaminación de Mesófilos Aerobios; sin embargo estuvieron dentro de los límites aceptables por la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios “Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos”. Aunque todos los municipios no sobrepasan los Límites Máximos Permisibles establecidos por la Norma que son 150, 000 UFC/mL. Se puede notar con gran diferencia que el Municipio de Toluca es el que presenta un mayor grado de contaminación por

este microorganismo, mientras que Calimaya presenta una cantidad menor, esto puede deberse a la mala manipulación del cultivo durante su cadena de producción sin haber tenido el cuidado necesario contaminando así todo el producto.

Lo anterior coincide con lo reportado por Valerianes (2013), en su estudio realizado en el Estado de Veracruz sobre el diseño de metodologías para la reducción de microorganismos Coliformes Fecales presentes en hortalizas de hoja y tallo, entre ellas la espinaca, donde sugiere tomar acciones correctivas que minimicen los riesgos de contaminación del producto durante el proceso de producción como por ejemplo la aplicación de las Buenas Prácticas Agrícolas y la capacitación adecuada a los productores.

Otro estudio realizado por De Jesús (2016), donde reporta la presencia de mesofilos aerobios en el cultivo del cilantro producido en el estado de México, sugiriendo tomar acciones correctivas que minimicen los riesgos de contaminación microbiológica durante el proceso de producción.

En cuanto a la presencia de Coliformes Totales presentes en el estudio de dichos microorganismos presentes en placa los resultados se muestran en el Cuadro 5 y grafica 4 así como el promedio por municipio.

**Cuadro 5. Resultados de contaminación microbiológica por Coliformes Totales en muestras de espinaca por colecta por Municipio**

Coliformes Totales						
Municipio	Localidad	Promedio por localidad	Promedio por municipio	D.S	P (<0.05)	Diferencia Significativa
		UFC/mL				
Tenango del Valle	1	5,762.8	4,578.56	9,903.7	0.5151	N.S
	2	3,394.2		6,377.1		
Calimaya	1	2,234.6 <sup>a</sup>	9,906.79	1,466.2	0.0002	++
	2	17,578.9 <sup>b</sup>		10,399.1		
Toluca	1	10,369.1	8,155.69	12,360.2	0.4105	N.S
	2	5,942.2		11,101.6		

D.S = Desviación Estándar

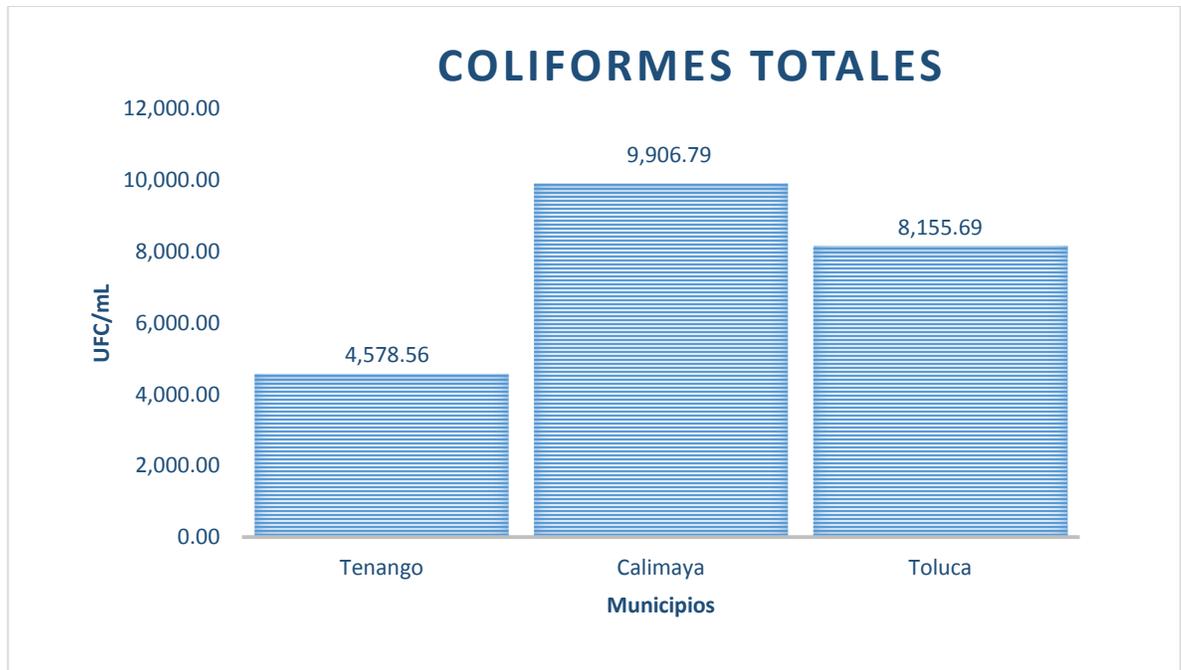
+ = Significativo

++ = Altamente significativo

N.S = No Significativo

<sup>a,b</sup> = Medias con literales son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ )

Se encontraron diferencias altamente significativas en el Municipio de Calimaya ya que presenta la mayor cantidad de UFC/mL de coliformes totales asociando las posibles causas de contaminación de las parcelas a las características observadas en ellas ya que la parcela A estaba cerca de un bordo de aguas negras y la parcela del grupo B anteriormente fue una presa de agua estancada y presentaba un mal olor.



Gráfica 4. Promedio de Coliformes Totales por Municipio en muestras de espinaca.

Como se puede observar en el cuadro 5 y gráfica 4, el Municipio de Calimaya es el más contaminado por microorganismos Coliformes Totales, mientras que Tenango presenta menor cantidad de UFC/mL.

Para los Coliformes Totales, la Norma Oficial Mexicana no establece un límite máximo permisible de UFC/mL. Sin embargo, la presencia de estos microorganismos puede de ser de gran ayuda para la evaluación de la calidad sanitaria por lo que es conveniente incluirla en las normas, para complementar la información de evaluación de la calidad del producto.

Respecto a Coliformes Fecales, en el cuadro 6 se muestra el promedio por municipio de presentes en las placas.

**Cuadro 6. Resultados de contaminación microbiológica por Coliformes Fecales en muestras de espinaca por Municipio y Localidad, expresadas en UFC/mL**

Coliformes Fecales						
Municipio	Localidad	Promedio por localidad	Promedio por municipio	D.S	P (<0.05)	Diferencia Significativa
		UFC/mL				
Tenango del Valle	1	3.75 <sup>a</sup>	20.88	7.32502	0.0399	+
	2	6597.55 <sup>b</sup>		9412.18		
Calimaya	1	2.26697	2.06	3.68028	0.7746	N.S
	2	1.86667		2.32246		
Toluca	1	4.25	2.59	8.2635	0.2251	N.S
	2	0.93333		1.19464		

D.S = Desviación Estándar

+ = Significativo

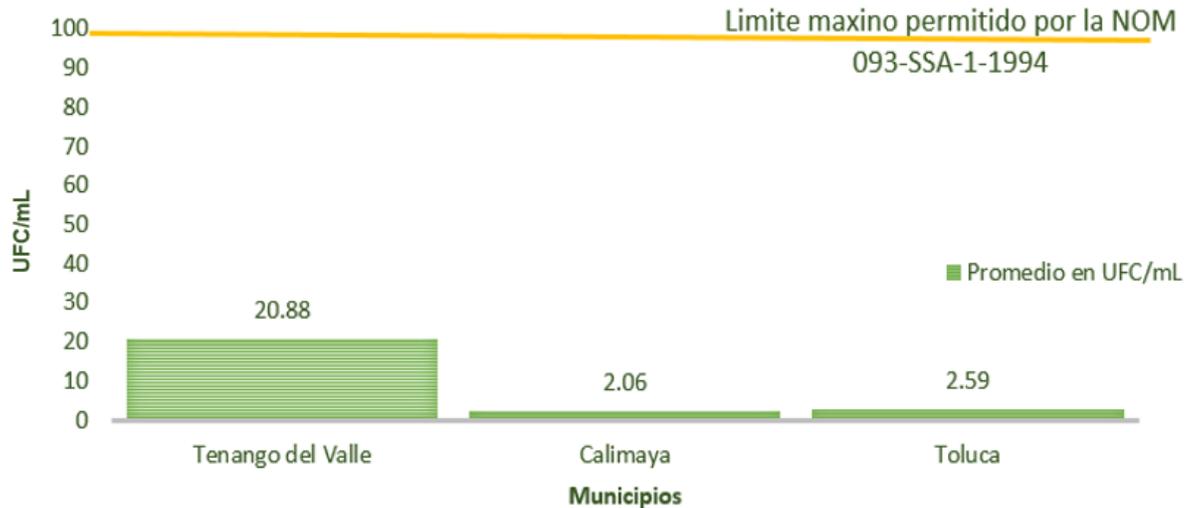
++ = Altamente significativo

N.S = No Significativo

<sup>a,b</sup> = Medias con literales son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ )

En el cuadro anterior se encontraron diferencias significativas en el factor localidad formado dos grupos diferentes en el Municipio de Tenango del Valle, estas dos agrupaciones posiblemente se deben a que la parcela de grupo A se encontraban muy cerca de un establecimiento de ganado porcino y al grupo B podría estar asociado a que la parcela se encontraba a un costado de un drenaje, sin contar que no había sanitarios cerca de las parcelas para uso de los trabajadores siendo estos algunos factores de contaminación fecal en el cultivo.

## COLIFORMES FECALES



Gráfica 5. Promedio de Coliformes Fecales por Municipio en muestras de espinaca.

En el gráfica anterior se observan los resultados de Coliformes Fecales los cuales no sobrepasan el Límite máximo permitido por la NOM-093-SSA 1-1994. Especificaciones sanitarias “Especificaciones microbiológicas de los Alimentos” que establece el máximo de 100 UFC/mL. Sin embargo el Municipio más afectado por Coliformes Fecales es Tenango del Valle, mientras que el menos contaminado es el Municipio de Calimaya, lo anterior refleja las condiciones sanitarias de producción son determinantes para una adecuada calidad del producto.

Se observa que en los tres municipios estudiados existe la presencia de Coliformes Fecales indicando la presencia de contaminación por algún microorganismo y por lo que hay que tener precauciones sanitarias para el

consumo de esta hortaliza en crudo, esto coincidiendo con lo reportado por Vélez y Ortega (2013) en su estudio sobre la determinación de Coliformes Totales y *E coli* en muestras de lechuga expandidas en cuatro mercados de la ciudad de Cuenca-Ecuador, donde resalta posibles brotes de enfermedades por el consumo de alimentos frescos contaminados, sugiriendo llevar a cabo la vigilancia estricta de las Prácticas Agrícolas, así como de productores para poder controlar posibles enfermedades.

Otro estudio realizado por Ocaña *et al.* (2014) reporta la presencia de Coliformes Fecales en el cultivo de jitomate producido en el Estado de México, sugiriendo que para la disminución de los problemas sanitarios relacionados con los frutos hay que tomar acciones correctivas para la manipulación del producto así como implementar las Buenas Prácticas Agrícolas.

La presencia de este tipo de microorganismos indica el grado de contaminación por materia fecal en el cultivo de espinaca asociándolos al mal manejo del cultivo por parte de los productores y trabajadores, y a la presencia de animales en las parcelas.

## Análisis de agua

La determinación de la cuenta total de microorganismos en placa en las muestras de agua ofrece información sobre el grado de contaminación presente en el cultivo de espinaca como se muestra en el cuadro 7.

**Cuadro 7. Resultados Microbiológicos de Análisis de agua por Municipio**

Municipio	Mesófilos Aerobios	Coliformes Totales	Coliformes Fecales
	UFC/mL		
Tenango del Valle	27,764	8,947	97
Calimaya	19,257	19,257	47
Toluca	51,548	14,367	57

Cabe mencionar que no hay norma que contemple estos parámetros microbiológicos para el uso de agua de riego sin embargo con los resultados obtenidos se refleja la densidad de la carga bacteriológica presentes, siendo el Municipio de Tenango del Valle el que presenta mayor cantidad de microorganismos patógenos debido a que la fuente de riego proviene de un bordo de agua estancada atribuyéndolo como uno de las probables fuentes principales de contaminación.

## Análisis del Suelo

A partir de análisis realizados en muestras de suelo de los tres Municipios, en el cuadro 8 se observa la presencia de microorganismos Mesófilos Aerobios. Mientras que en el caso de Coliformes Fecales el municipio con mayor afectación es Tenango del Valle, y Toluca es el municipio con menor cantidad de UFC/mL. Indicando que el alimento está contaminado por materia fecal, derivado de la mala aplicación de las prácticas agrícolas por parte del productor y trabajadores siendo estos la principal vía de contaminación hacia el cultivo y que al ser consumido pueda afectar la salud del ser humano.

**Cuadro 8. Resultados Microbiológicos de análisis de suelo por Municipio.**

Municipio	Mesófilos Aerobios	Coliformes Totales	Coliformes Fecales
	UFC/mL		
Tenango del Valle	21,746	5,737	56
Calimaya	16,472	12,465	28
Toluca	47,841	9,874	18

## IX. CONCLUSIONES

A partir de los análisis realizados en los tres municipios del Estado de México (Tengo del Valle, Calimaya y Toluca) presentan un grado de contaminación por microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales.

Los resultados obtenidos de las muestras de espinaca, agua y suelo no sobrepasan los límites y se encuentran dentro de lo establecido por las normas mexicanas.

El Municipio de Toluca presentó la mayor carga de microorganismos Mesófilos Aerobios posiblemente esto se debe a la manipulación del cultivo sin haber tenido el cuidado necesario durante su proceso de producción, por la presencia de animales o incluso por la urbanidad.

Para Coliformes Totales el municipio con mayor cantidad de microorganismos fue Calimaya quien presenta mayor cantidad de UFC/mL. Aunque las normas no consideran un límite máximo permisible para estos microorganismos son indicativos para la evaluación de la calidad higiénica del cultivo.

El municipio con más contaminación por Coliformes Fecales fue Tenango del Valle, indicando del grado de contaminación por materia fecal presente en el cultivo e indicativo de las malas prácticas de higiene por parte de los productores de la zona.

Aun que no existan normas que establezcan algún límite máximo permisible de microorganismos de interés en muestras de agua y suelo los resultados nos sirven para determinar las posibles fuentes de contaminación del cultivo.

En general, los resultados de las muestras analizadas del cultivo de espinaca, agua y suelo dan una idea del nivel higiénico sanitario que se presenta en el Estado de México.

## **X. RECOMENDACIONES**

Fomentar la capacitación de los agricultores y comerciantes en lo que se refiere a Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura con la finalidad de asegurar la inocuidad del producto reduciendo los niveles de contaminación para evitar la probabilidad de adquirir algún tipo de enfermedad ocasionada por un producto mal manipulado durante su cadena de producción y así también prolongar la vida de anaquel del producto.

Realizar pruebas de bioquímicas y técnicas moleculares como PCR para identificar de forma clara y precisa el microorganismo patógeno presente en la espinaca.

## XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Adams M., R. y Moss, M., O. 2006. Food Microbiology. Zaragoza (España): The Royal Society of Chemistry. p.472.

Arias, J, L. Espinoza, L.Fuentes, L.Garzón, C.Gil, R.Niño, N.Rodriguez, M. 2010. El cultivo de la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y su manejo fitosanitario en Colombia. Bogota Colombia: Universidad de Bogota "Jorge Tadeo Lozano".

Avendaño, B. Rindermann, R., Lugo, S. y Mungaray, A. 2006. La Inocuidad Alimentaria en México. "Las hortalizas frescas de exportacion". Universidad Autonoma de Baja California. Baja California, México. 4-16 p.

Barrera, A. B., 2010. Programa Universitario de Alimentos-UNAM. [En línea] Available at: <http://www.ticscalidadenserviciosalimenticios.com.mx/etas/> [Último acceso: 10 marzo 2016].

Brandl, M. y Mendrell, R. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* Thompson in the cilantro phyllosphere. [En línea] consultado en : <http://aem.asm.org/content/68/7/3614.short>. El 26 de Febrero de 2015

Borrego, M. y Josep, V., 2002. Horticultura Herbacea Especial. 5° Ed.. Madrid: S.A. Mundi-Prensa Libros. p.124-126.

Camacho, M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez., 2009. Técnicas para el Analisis Microbiologico de Alimentos 2° ed.. Mexico: UNAM. p.217.

Campbell, M, Reporter, R. Abbott, S. Farrar, J. Brandl, M. R. Y Werner, S. 2001. An outbreak of salmonella serotype thompson asociates whit fresh cilantro. [en línea] consultado en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237818>, el 23 de marzo de 2016.

Cortez, C. H., Guadalupe, A. A. M. y Graciela, C. E., 2011. Situación de las enfermedades. [En línea] Available at: <http://www.amimc.org.mx/revista/2011/31/4/situacion.pdf>.

Doyle, M., R.Beuchat, L. y Montville, T. J., 2001. Microbiología de los alimentos Fundamentos y fronteras. Zaragoza (España): ACRIBIA, S.A. 133-238 p.

FAO. 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion. (BPA). [En línea] Consultado en [http://www.fao.org/prods/gap/index\\_es.htm](http://www.fao.org/prods/gap/index_es.htm). El 26 de febrero de 2015.

FAO, 2015.FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion [Enlínea]Availableat:<http://WWW.faostat.com/193.43.36.221/site/339/default.aspx>[Consultado el: 22 de Abril de 2016]

Ferratto, I. A. J. y Mondino, I. A. M. C., Importancia de la gestion de la calidad en frutas y hortalizas. Revista Agromensajes. agromensajes, (24 de Abril de 2008) 19(7): 12.

Fitosanitaria, C. d. E., 2014. Frutas Colombanas en proceso de Análisis de Riesgo de Plagas (ARP), Espinaca. [En línea] Available at: <http://www.ica.gov.co/Consulta> [Último acceso: 18 Abril 2015].

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

Forsythe y Hayes, 2002. Higiene De Los Alimentos, Microbiología y HACCP. Zaragoza (España): Acribia, S.A..

Gardea-Béjar, A., González., G. Higuera-Ciapara, I. y Cuamea-Navarro, F. (2007). Buenas prácticas en la producción de alimentos. Ed. Trillas México.

Gile, M., A. Ortegón., A. Camacho., M. Palao y O. Velázquez, 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos 2° ed.. Mexico: UNAM.

Gorini, F, 2009. La Coltivazione dello Spinacio. Barcelona España: Edizioni Agricole Bologna.

ICMSF, 2000. Micro Organismos de los Alimentos 1 su significado y métodos de enumeración 2° edición. Zaragoza (España): ACRIBIA, S.A. 20-21-22 p.

Jay, M.T., M Cooley, D. Carichao, G. W, Wiscomb, R.A. Sweiter, L. Crawford Miksza, J, A. Farrar, D. K.Lau, J. O'Connel, A. Millintong, R.V. Asmunds, E.R. Arwill, and R.E. Mendrell. 2007. Escherichia coli O157:H7 in feral swine near

spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1908-1911.

Johns, N., 2008. *Higiene de los alimentos Directrices para Profesionales de Hosteleria, Restauracion y Catering.* España: ACRIBIA, S.A..

López, A. V., 2001. *Produccion de Hortalizas.* Mexico: LIMUSA.

Martínez, F. B. 2004. *El manejo Higienico de los Alimentos.* Limusa S.A. de C.V. México. 20 p.

Minagricultura, 2014. *ministerio de agricultura y desarrollo rural.* [En línea] Available at: <https://www.minagricultura.gov.co/Paginas/inicio.aspx>

Molina, J., Manjarrez, Ma. E. y Tagy, J. 2010. *Microbiologia. Bacterologia y Virologia.* Mendez Editores, S.A de C.V.(1° Ed.), México DF. 225p.

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

Moreno, B., Diez, V., García, Ma. L., Menes, I., Gutierrez, L. y Polledo, F. 2000. *Microorganismos de los alimentos.* Acribia S.A. Zaragoza, España. 13-14 p.

NCBI, 2016. *Centro Nacional de informacion Biotecnologica* [En línea] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=3562&lvl=3&p=has linkout&p=blast url&p=genome blast&p=mapview&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlik> consultado el 10 de Noviembre de 2016.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios.  
Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM- 093-SSA1-1994, Bienes y Servicios.  
Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de los alimentos.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios.  
Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios.  
Método para la cuenta de Microorganismos Colifórmes Totales en Placa.

Ocaña R. L. Gutiérrez A. T. Sanchez J. R. Mariescurrena Ma. D. Velázquez G. Laguna A. Rojas I., 2014. Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido bajo condiciones de invernadero en 5 municipios del Estado de México. [En línea] consultado en: <http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol84-1/OcañaDeJesus.pdf>, [Último acceso: el 25 de julio de 2016].

Osuna, J., 2012. Inocuidad Alimentaria Aumentan enfermedades transmitidas por alimentos. [En línea] Available at: <http://www.noroeste.com.mx/>

[publicaciones.php?id=757008](#) [Último acceso: 18 de Abril 2016].

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

Rodríguez, F., 2004. Produccion Hortícola y seguridad alimentaria. España: Universidad de Almeria.

SAGARPA. 2011. SIAP. [En línea] Available at: [www.sagarpa.gob.mx/inicio](http://www.sagarpa.gob.mx/inicio) [Último acceso: 16 Abril de 2016]

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

SIAP/SAGARPA/, 2015a. Estimación de importaciones y exportaciones agroalimentarias. [En línea] Available at: [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Estima\\_Exp\\_Edo.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Estima_Exp_Edo.pdf) [Último acceso: 18 de Abril de 2016].

SAGARPA, 2015b . SAGARPA. [En línea] Available at: <http://www.sagarpa.gob.mx/Glosario/Paginas/Buenas%20pr%C3%A1cticas%20agr%C3%ADcolas%20%28BPA%27s%29.aspx> [Último acceso: 18 de Abril 2016].

SIAP/SAGARPA,2015c.[http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp). [En línea] Available at:  
[http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp)  
[Último acceso: 18 de Abril 2016].

Siller, J ., Baez, M., Sañudo, A y Baez, R. 2002. Manual de Buenas Practicas Agrícolas . Guia para el agricultor. Centro de investigacion en alimentos y desarrollo A.C. (1° Ed.), Culiacán, Sinaloa 6-7 p.

Valerianes P. M. D. C., 2013. Diseño de una metodologia para la reducción de microorganismos Coliformes Fecales en hortalizas de hojas y tallo Xalapa, Veracruz: Universidad Veracruzana.

Vélez B. A., P. y Ortega G. J. E., 2013. Determinacion de coliformes Totales y E coli en muestras de lechuga expendidas en cuatro mercados de la ciudad de Cuenca-Ecuador: Universidad de Cuenca

Villanueva, J. A. 2014. Salud y buenosalimentos.es. [En línea] Available at:  
<http://www.saludybuenosalimentos.es/alimentos/?s1=Verduras%252FHortalizas&s2=Hojas&s3=Espinaca#>  
[Último acceso: 23 de Mayo de 2016].