

Presencia de *Salmonella* sp. y poblaciones de coliformes y *Escherichia coli* en agua, suelo, hojas y *berries* de unidades de producción en una región de interés comercial en Jalisco

Arias López J.G.¹, Pérez Soto D.A.², Ortiz Magaña D.S.², Aguirre Ibañez F.A.², Martínez Gonzáles N.E.², Pérez Montaña J.A.², Cabrera Díaz E.³, Gutiérrez González P.², Martínez Chávez L.²

¹Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara. Sierra Mojada 950, Colonia Independencia, 44340, Guadalajara, Jalisco, México. ²Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Av. Marcelino García Barragán 1421, Colonia Olímpica, 44840, Guadalajara, Jalisco, México ³Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco. Correo: liliana.mchavez@academicos.udg.mx

Palabras Clave (indicadores, patógenos, *berries*, agua de uso agrícola, ambiente)

Introducción

Las *berries* son un conjunto de frutos integrados por arándano, fresa, frambuesa y zarzamora. Su consumo se ha incrementado a nivel mundial, debido a que aportan vitaminas, minerales y sustancias antioxidantes (1). Asimismo, se han presentado brotes de enfermedades asociadas a su consumo en diversas partes del mundo (2). En Estados Unidos, 51 brotes fueron relacionados con estos frutos frescos o congelados contaminados con virus, parásitos o bacterias patógenas entre 1997 y 2018. Los brotes incluyeron 1196 casos, 92 hospitalizaciones y 2 muertes. Los agentes causantes se identificaron en 42 de los 51 brotes, como Norovirus y el virus de la hepatitis A (23 brotes), *Cyclospora* (7 brotes), *Salmonella* (4 brotes), *Escherichia coli* productora de toxina de Shiga (3 brotes), *Cryptosporidium*, *Shigella*, *Bacillus cereus* y sustancias químicas (5 brotes) (3).

Los microorganismos patógenos pueden ingresar a los frutos frescos en distintas etapas de su cadena productiva a través de diversas fuentes. El agua de uso agrícola ha sido referida como una fuente de *Salmonella* a los productos agrícolas frescos, así como el suelo o sustrato para su cultivo (4). La principal fuente de contaminación del agua es de origen fecal. Por tanto, las pautas de calidad microbiana del agua se basan en el análisis de coliformes, coliformes fecales, *E. coli*, estreptococos fecales y huevecillos de nemátodos. Debido a que los recuentos de coliformes y coliformes fecales no pueden excluir las bacterias de origen no fecal, la presencia de *E. coli* se considera un mejor indicador de la calidad microbiana del agua de uso agrícola. La Norma de Productos Agrícolas Frescos (PSR, por sus siglas en inglés), de la Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos establece criterios de calidad microbiana para varios usos del agua agrícola utilizando *E. coli* como indicador de contaminación fecal (5). Sin embargo, el uso de *E. coli* como organismo índice para la presencia de patógenos entéricos en fuentes de agua también se ha discutido en la literatura. Se ha demostrado que la concentración de *E. coli* puede predecir la presencia de *Salmonella* en el agua. Sin embargo, *Salmonella* podría identificarse incluso si los recuentos de *E. coli* estuvieran por debajo de los niveles detectables, lo que genera la preocupación de que la satisfacción del límite actual de *E. coli* no necesariamente representa la ausencia de *Salmonella*. La garantía de la calidad microbiana del agua de uso agrícola es fundamental para mejorar la inocuidad de las *berries* frescas, porque tiene un impacto en el ambiente de producción (suelo, sustrato y plantas) y fruto. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *Salmonella* sp. y el recuento de coliformes y *E. coli* durante el cultivo de zarzamora y arándanos en tres unidades de producción de la Zona Valles del estado de Jalisco.

Metodología

Se realizaron 6 visitas a tres unidades de producción de zarzamora y/o arándanos (A, B y C) ubicadas en la Zona Valles del Estado de Jalisco, de diciembre de 2020 a julio de 2021. Durante las visitas se tomaron 110 muestras de agua (pozo, reservorio o manguera), 37 de suelo o sustrato, 32 de fruto y 36 de hoja para el recuento de coliformes totales y *E. coli* y la detección de *Salmonella* sp. Las muestras se colectaron con guantes y fueron colocadas en bolsas estériles y transportadas en hieleras a temperatura de refrigeración para analizarse en no más de 24 h después de su recolección.

El recuento de coliformes totales y *E. coli* en agua se realizó por la técnica de filtración por membrana con volúmenes de 100, 10 y 1 mL de agua de uso agrícola. Después de filtrar las muestras, las membranas se

colocaron en la superficie de placas de agar MI y se incubaron a 35°C durante 24 h. Las muestras de hoja y fruto consistieron en 50 g de muestra y 450 mL de agua peptonada amortiguada (BPW, por sus siglas en inglés), las cuales fueron homogeneizadas manualmente por 1 min. Posteriormente, a partir de las muestras de fruto se filtraron 100, 10, y 1 mL, las membranas se colocaron en placas Petrifilm™ para coliformes/*E. coli* previamente hidratadas con agua destilada estéril, el resto del líquido de enjuague se incubó a 35°C por 24 ± 2 h para determinación de *Salmonella*. En tanto, para las muestras de hoja se filtraron 10 mL del líquido de enjuague e inocularon diluciones decimales en placas para el recuento de ambos indicadores bajo las condiciones descritas previamente. El líquido de enjuague restante se utilizó para determinar *Salmonella*. Las muestras de suelo o sustrato de 25 g fueron adicionadas con 225 mL de diluyente de peptona al 0.1%, a partir de esta dilución inicial se prepararon diluciones decimales para inocular las placas de Petrifilm™ para coliformes/*E. coli*. También, el resto del líquido de enjuague se incubó a 35°C por 24 ± 2 h para determinar *Salmonella*. Las placas Petrifilm fueron incubadas a 35°C por 24 ± 2 h para el recuento de coliformes totales y por 48 ± 2 h para el recuento de *E. coli*.

Para la determinación de *Salmonella* se usó la metodología del Manual de Análisis Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos con modificaciones. Las muestras de agua (1 L) se analizaron por filtración con membrana, la cual fue transferida a 100 mL de BPW, con incubación a 35°C por 24 ± 2 h. A partir de los caldos de preenriquecimiento de las muestras de agua, hoja y fruto se transfirió 1 mL a caldo tetraciónato verde brillante (TT) y 100 µL a caldo Rappaport Vassiliadis (RV), los caldos inoculados fueron incubados a 43 y 42°C, respectivamente por 24 h (FDA 2021). A partir de los caldos TT y RV se sembraron por estría el agar entérico Hektoen, agar xilosa-lisina-desoxicolato y agar sulfito y bismuto. Transcurridas 24 h de incubación a 35°C se seleccionaron colonias presuntivas de *Salmonella* para confirmarse mediante las pruebas bioquímicas con agar triple azúcar hierro, agar de hierro y lisina y caldo urea; aquellos aislamientos con el perfil bioquímico típico de la bacteria, se confirmaron mediante serología con antisuero polivalente (FDA 2021).

Los recuentos de *E. coli* y coliformes se expresaron en UFC/100 mL de agua, y UFC/muestra para las muestras de suelo, hoja y fruto. Los datos se expresaron mediante estadística descriptiva con la frecuencia y niveles de coliformes y *E. coli* y positividad a *Salmonella* por tipo de muestra en las unidades de producción A, B y C.

Resultados y discusión

Del total de muestras de agua recolectadas (n=110), 100 (91%) tuvieron recuentos de coliformes con niveles entre 1 y 570000 UFC/100 mL, en tanto que *E. coli* fue recuperada de 95 muestras (86%) con cuentas entre 1 y 370000 UFC/100 mL. *Salmonella* fue recuperada de las tres unidades productoras en dos muestras de pozo, cuatro de reservorio y una proveniente de la manguera (6.4%). Respecto a las muestras de suelo y sustrato, se detectaron coliformes en 26 de las mismas (70%) con niveles entre 2500 y 5200000 UFC/25g, mientras que *E. coli* se recuperó de 18 muestras (49%), sus niveles variaron entre 100 y 220000 UFC/25g. En tres de estas muestras se recuperó *Salmonella*. Para 29 (81%) muestras de hoja, se obtuvieron recuentos de coliformes entre 4.5 y 61000 UFC/50g, por su parte *E. coli* se detectó en 14 muestras con recuentos entre 1 y 2600 UFC/50 g. En el caso de las muestras de fruto se obtuvieron recuentos de coliformes con niveles entre 4.5 y 61000 UFC/50 g en 13 muestras (41%), mientras que *E. coli* se recuperó en 8 muestras (25%) con recuentos entre 1 y 100 UFC/50 g. No se recuperó *Salmonella* de las muestras de hoja y fruto.

Los resultados de este trabajo muestran la heterogeneidad de la calidad microbiológica del agua de uso agrícola y su posible impacto en otros medios como el suelo, sustrato, hojas de las plantas y fruto. En las unidades B y C, los recuentos de coliformes y *E. coli* se incrementaron conforme avanzó el sistema de distribución del agua. En este trabajo se recuperó *E. coli* en muestras de agua donde estuvo ausente *Salmonella* y viceversa. Por otra parte, la presencia de *E. coli* en muestras de frutos alerta sobre la posible presencia de patógenos entéricos. Lo anterior confirma la necesidad de intervenir en la capacitación, regulación y vigilancia en la producción de *berries* frescos para asegurar su inocuidad.

Tabla 1. Niveles de coliformes totales y *E. coli* y positividad a *Salmonella* en agua de uso agrícola de tres unidades de producción de *berries* ubicadas en la Zona Valles de Jalisco.

Unidad productora	Origen	n	Coliformes totales			<i>Escherichia coli</i>			No. muestras positivas a <i>Salmonella</i> (%)
			No. muestras con niveles contables (% positividad)	Recuento promedio ^a (UFC/100 mL)	Mínimo-máximo (UFC/100 mL)	No. muestras con niveles contables (%positividad)	Recuento promedio ^a (UFC/100 mL)	Mínimo-máximo (UFC/100 mL)	
A	Pozo	14	11 (79)	480	1-5000	9 (64)	340	1-3000	0 (0)
	Reservorio	15	14 (93)	82	5-340	14 (93)	46	2-200	1 (7)
	Manguera	13	13 (100)	220	4-1900	13 (100)	60	3-300	1 (8)
B	Pozo	13	12 (92)	1800	14-15000	12 (92)	1300	1-11000	2 (15)
	Reservorio	12	12 (100)	14000	1-160000	12 (100)	14000	11-160000	2 (17)
	Manguera	11	10 (91)	79000	25-570000	9 (82)	54000	23-370000	0 (0)
C	Pozo	4	4 (100)	220	2-850	4 (100)	170	2-680	0 (0)
	Reservorio	15	12 (80)	31000	2-320000	11 (73)	27000	11-260000	1 (7)
	Manguera	13	12 (92)	100000	2-530000	11 (85)	67000	20-320000	0 (0)

^a El recuento promedio se calculó considerando solo las muestras con niveles contables.

Tabla 2. Niveles de coliformes totales y *E. coli* y positividad a *Salmonella* en muestras de suelo de tres unidades de producción de *berries* ubicadas en la Zona Valles de Jalisco.

Unidad productora	n	Coliformes totales			<i>Escherichia coli</i>			No. de muestras positivas a <i>Salmonella</i> (%)
		No. muestras con niveles contables (% positividad)	Promedio ^c (UFC/25 g)	Mínimo-máximo	No. muestras con niveles contables (%positividad)	Promedio ^c (UFC/25 g)	Mínimo-máximo	
A	Suelo ^a (12)	12 (100)	530000	2500-520000	5 (42)	3400	100-11000	1 (8)
B	Sustrato ^b (12)	12 (100)	220000	70000-490000	5 (42)	10000	5000-20000	2 (17)
C	Suelo (3)	3 (100)	280000	230000-320000	1 (33)	13000	13000	0 (0)
	Sustrato (10)	10 (100)	180000	78000-300000	7 (70)	38000	2500-220000	0 (0)

^aTierra agrícola, ^bFibra de coco. ^c El recuento promedio se calculó considerando solo las muestras con niveles contables.

Tabla 3. Niveles de coliformes totales y *E. coli* y positividad a *Salmonella* en hoja y fruto de tres unidades de producción de *berries* ubicadas en la Zona Valles de Jalisco.

Unidad productora	Tipo de cultivo	Tipo de muestra (n)	Coliformes totales			<i>Escherichia coli</i>			No. de muestras positivas a <i>Salmonella</i> (%)
			No. muestras con niveles contables (%positividad)	Promedio ^c (UFC/50g)	Mínimo-máximo	No. muestras con niveles contables (%positividad)	Promedio ^c (UFC/50g)	Mínimo-máximo	
A	Zarzamora	Hoja (12)	11 (92)	4800	4.5-13000	6 (50)	830	4.5-2600	0 (0)
		Fruto (11)	7 (64)	18000	4.5-47000	4 (36)	33	4.5-100	0 (0)
B	Arándano	Hoja (12)	8 (67)	6500	4.5-50000	3 (25)	100	45-210	0 (0)
		Fruto (10)	3 (10)	56	9-150	1 (10)	14	14	0 (0)
C	Arándano	Hoja (12)	10 (83)	12000	90-61000	5 (42)	450	120-900	0 (0)
		Fruto (11)	3 (27)	14	4.5-20	3 (27)	8	1-18	0 (0)

^cEl recuento promedio se calculó considerando solo las muestras con niveles contables.

Conclusiones

Los resultados de coliformes y *E. coli* en las muestras de agua para uso agrícola provenientes de las tres unidades de producción confirman su papel como un factor de riesgo de contaminación con patógenos entéricos como *Salmonella* en la producción de *berries* en la región de interés comercial en Jalisco.

Reconocimientos o agradecimientos

Este trabajo forma parte de un proyecto apoyado por el Fondo para Atención de Problemas Estatales FODECIJAL 2019 (Proyecto COECYTJAL 8112-2019). Los autores reconocen las facilidades otorgadas por la Asociación Nacional de Exportadores de Berries, A.C para realizar esta investigación. Asimismo, agradecen a 3M México por donar las placas Petrifilm™ para coliformes/*E. coli* usadas en este estudio y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por proporcionar una beca en la Maestría en Ciencias en Inocuidad Alimentaria a Jessica Gabriela Arias López.

Referencias

- Mortaşa H, Şanlıer N. (2017). Nutritional evaluation of commonly consumed berries: composition and health effects. *Fruits* 72(1), 3–2.
- Krug, M. D., Palumbo, M., Harris, L. J., & Danyluk, M. (2020). Outbreaks of Foodborne Illness Associated with Common Berries, 1983 through 2019: FSHN13-08/FS232, rev. 6/2020. *EDIS*, 2020(5). <https://doi.org/10.32473/edis-fs232-2020>
- National Outbreak Reporting System (NORS) [Internet]. [Updated 7 Dec 2018], Centers for Disease Control and Prevention (CDC); [consultado el 02 septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/norsdashboard/>.
- Alegbeleye OO, Singleton I, Sant'Ana S A. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiol.* 73, 177-208. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7127387/pdf/main.pdf>
- Produce Safety Alliance (PSA). (2019). Curso de capacitación para productores. Derechos de autor © Universidad de Cornell [Internet]. [Consultado el 25 de Mar 2021]. Disponible en: <https://es.producesafetyalliance.cornell.edu/curriculo-de-la-psa/manual-para-productores-en-espanol-version-electronica-de-divulgacion-publica/>
- Food and Drugs Administration. (2021). Bacteriological Analytical Manual Chapter 5: *Salmonella* [Internet]. [Consultado el 24 de Mar 2021]; Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>