

Variabilidad de los niveles de *Escherichia coli* y frecuencia de *Salmonella* spp en agua de pozo para uso agrícola en la zona Sureste de Jalisco

García Díaz J.M.¹, López Arias, J.G.², De la Cruz Ascencio G.L.², Rodríguez Herrera D.L.², Martínez Gonzáles N.E.², Pérez Montañón J.A.², Martínez Chávez L.², Rodríguez García M.O.², Cabrera Díaz E.¹

¹Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. ²Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Av. Marcelino García Barragán 1421, Colonia Olímpica, 44840, Guadalajara, Jalisco, México. Correo: elisa.cabrera@academicos.udg.mx

Palabras Clave: indicadores, *Salmonella*, *berries*, agua de uso agrícola

Introducción

El agua destinada al uso agrícola puede constituir una fuente de patógenos asociados a la generación de casos y brotes de enfermedades por el consumo de productos frescos, lo que puede generar riesgos a la salud del consumidor [1, 2]. Una de las fuentes de agua con mayor aprovechamiento en la producción de frutas y hortalizas frescas (F&H) es el agua subterránea, debido a que es la que tiene menor probabilidad de presentar contaminación [3]. Sin embargo, las aguas subterráneas pueden contaminarse por la infiltración de contaminantes aportados por diversas fuentes asociadas al crecimiento poblacional y antropogénico, como vertederos de drenaje urbano, residuos provenientes de industrias, actividades agropecuarias, fosas sépticas, entre otras [4]; por otra parte, una mala estructura y falta de mantenimiento de la bomba extractora de agua, podría facilitar una contaminación al interior del pozo.

Jalisco es uno de los principales productores de *berries* a nivel nacional; gran parte de su producción se exporta a los Estados Unidos de América (EUA) para lo cual, los productores deben cumplir con el marco regulatorio nacional (SENASICA-COFEPRIS) y con los lineamientos del Reglamento de Productos Agrícolas Frescos (PSR, por sus siglas en inglés), de la Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos, la cual establece criterios de calidad microbiana para el agua agrícola utilizando *E. coli* como indicador de contaminación fecal [3].

Un aspecto fundamental en las reglamentaciones nacionales e internacionales que norman la producción de F&H, es el relacionado con la calidad del agua para usos agrícolas, debido a su importancia como potencial fuente de contaminación hacia los productos. El PSR establece que la utilización de una fuente de agua para actividades agrícolas debe decidirse luego de un riguroso análisis microbiológico durante un periodo relativamente largo de tiempo. Para la irrigación están permitidas las fuentes de agua superficiales o subterráneas toda vez que la forma de riego no implique el contacto directo del agua con el producto, y siempre y cuando los resultados microbiológicos sean favorables en un estudio denominado “encuesta inicial”. Para agua de pozo, la encuesta inicial consiste en la recolección de al menos 4 muestras en un año y tan próximas a la cosecha como sea aplicable y debe calcularse la media geométrica (GM) y el valor umbral estadístico (VUE) para comparar los valores obtenidos con los señalados en el PSR y determinar su idoneidad, o en su caso aplicar medidas correctivas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de *E. coli* y la presencia de *Salmonella* en agua de pozo utilizada en la producción de *berries* para exportación en unidades de producción ubicadas en la zona Sureste de Jalisco, determinando la variación en los recuentos del indicador microbiano a lo largo del tiempo y la posible influencia de factores meteorológicos.

Metodología

Se analizaron un total de 50 muestras de agua de tres unidades de producción de *berries* ubicadas en la zona Sureste de Jalisco, durante el periodo de octubre 2020 a agosto 2021; la cantidad de muestras recolectadas por unidad de producción se muestran en la Tabla 1. Los datos de temperatura y humedad

relativa de la zona de estudio se obtuvieron del portal del Sistema Meteorológico Nacional (estación meteorológica #14077).

Tabla 1. Número de muestras recolectadas en la zona Sureste de Jalisco de octubre de 2020 a agosto de 2021

Unidad de producción	Tipo de muestra	No. muestras
A	Agua del punto de desfogue del pozo #1	10
	Agua del punto de desfogue del pozo #2	7
B	Agua de la salida del filtro del pozo #2	6
	Agua del punto de desfogue del pozo #1	10
C	Agua del punto de desfogue del pozo #2	5
	Agua del punto de desfogue del pozo #1	7
	Agua de la salida del filtro del pozo #1	5

Las muestras se recolectaron en bolsas Whirl-Pak estériles y se transportaron al laboratorio en contenedores insulated con hielo; a su llegada se almacenaron en refrigeración y se analizaron en menos de 24 h. Para detectar *Salmonella* se empleó la técnica de filtración por membrana. Se filtró 1 L de cada muestra y la membrana fue preeriquecida en 100 mL de agua peptonada amortiguada e incubada a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. A partir de los preenriquecimientos se elaboraron muestras compuestas y se analizaron usando el Sistema de Detección Molecular MDS 3M™. Las muestras que resultaron positivas se confirmaron por cultivo usando el método publicado en el Manual de Análisis Bacteriológico de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EUA [5]. Del preenriquecimiento de cada muestra individual se transfirieron 0.1 y 1.0 mL a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y caldo tetrionato (CTT) respectivamente; se incubó a 42.5 °C para RV y a 43 °C para CTT por 24 h en un termo baño. A partir de cada tubo de enriquecimiento se realizó el aislamiento en agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), agar entérico hektoen (HE) y agar sulfito bismuto (SB) después de incubar a 35 ± 2 °C por 24 h (48 h para SB). Se seleccionaron colonias típicas para confirmación mediante pruebas bioquímicas en agar triple azúcar y hierro, agar de hierro y lisina y caldo urea; los aislamientos con perfil bioquímico típico de *Salmonella* se confirmaron mediante serología con antisuero polivalente A-I&Vi.

El recuento de *E. coli* se realizó por el Método 1604 de la Agencia de Protección Ambiental de los EUA [6] por filtración por membrana. Se filtraron 100, 10 y 1 mL de cada muestra y las membranas se colocaron sobre placas de agar MI que se incubaron a 35°C por 24 h. Las colonias de *E. coli* se contaron bajo luz UV y siguiendo las indicaciones del fabricante. Se calculó la MG y el VUE de los recuentos de *E. coli* y se compararon los resultados obtenidos con los límites máximos establecidos en el PSR para evaluar el perfil de la calidad microbiológica del agua subterránea (MG=126 UFC/100 mL y STV=410 UFC/100 mL).

Resultados y discusión

De las 50 muestras analizadas de agua de pozo, 37 fueron colectadas en su punto de desfogue y 13 después de pasar por un proceso de filtración. En la unidad A, el agua de los pozos #1 y #2 cumplió con los niveles de *E. coli* establecidos como límite máximo en el reglamento del PSR (Tabla 2), pero puede observarse que las cuentas del indicador aumentaron después de que el agua pasó por un filtro. En la unidad B, el agua del pozo #1 tampoco sobrepasó los límites del PSR pero el agua del pozo #2 rebasó el VUE con un valor de 708 UFC/100 mL. En la unidad C, el agua del pozo #1 rebasó el límite del PSR al presentar una MG de 155 UFC/100 mL y un VUE de 7,079 UFC/100 mL, sin embargo, en las muestras de agua del mismo pozo colectadas después de pasar por un proceso de filtración, los niveles no rebasaron los límites del reglamento.

De acuerdo con la reglamentación de los Estados Unidos, cuando el agua para uso agrícola rebasa los límites de *E. coli*, deben aplicarse medidas correctivas para prevenir la contaminación de los productos hortofrutícolas. Una medida correctiva permitida por el reglamento de PSR es la aplicación de un intervalo

de tiempo entre la última aplicación del agua (riego, aplicaciones foliares) y la cosecha para lograr la mortandad o reducción microbiana de 0.5 log/día durante un máximo de 4 días consecutivos. De acuerdo con los niveles obtenidos, la medida correctiva inmediata consistiría en asegurarse que transcurra al menos 1 y 3 días entre la última aplicación y la cosecha para la unidad B y C, respectivamente. Otras medidas correctivas aceptables son la aplicación de tratamientos químicos, filtración o radiación UV.

Tabla 2. Niveles de *Escherichia coli* y frecuencia de *Salmonella* en agua de pozo para uso agrícola en unidades de producción de berries para exportación de la zona Sureste de Jalisco

Unidad de producción	Media geométrica (MG) y valor umbral estadístico (VUE) UFC/100 mL								No. muestras positivas a <i>Salmonella</i>
	Pozo #1				Pozo #2				
	Punto de desfogue		Después de filtro		Punto de desfogue		Después de filtro		
	MG	VUE	MG	VUE	MG	VUE	MG	VUE	
A	6	89	nd	nd	3	11	11	324	0
B	6	89	nd	nd	20	708	nd	nd	2
C	155	7,079	14	191	nd	nd	nd	nd	0

nd= no determinado

En general, los niveles de *E. coli* fueron mas altos en la unidad C, seguidos por B y A, y mostraron variabilidad a lo largo del tiempo (Tabla 3). Los recuentos más bajos fueron observados entre los meses de octubre a abril, incluso a pesar de que abril fue uno de los meses con la temperatura promedio más alta (23°C) en la zona de estudio (Figura 1). Se detectaron dos muestras de agua positivas a *Salmonella* en el pozo #1 de la unidad B, las cuales fueron colectadas en el mes de abril, cuando se registraron las primeras temperaturas más altas del año con un promedio de 23 °C y un máximo de 35 °C. Esto coincide con reportes previos que señalan una asociación positiva entre el aumento de la temperatura ambiental y la frecuencia de patógenos en agua agrícola [7]. A partir del mes de junio se observó un incremento en los niveles de *E. coli*; los mayores se registraron en agosto que correspondió al mes más lluvioso y con humedad relativa más alta (79%). En general, la unidad de producción C mostró la mayor variabilidad de recuentos de *E. coli*.

Tabla 3. Niveles de *Escherichia coli* en agua de pozo para uso agrícola en unidades de producción de berries para exportación según el mes de muestreo

Mes	Recuento promedio de <i>E. coli</i> por unidad de producción UFC/100 mL (rango)			Recuento promedio mensual de <i>E. coli</i> UFC/100 mL (rango)
	A	B	C	
Octubre (n=9)	0	3 (0-9)	0	1 (0-9)
Diciembre (n=9)	25 (0-103)	3 (2-3)	1	15 (0-103)
Abril (n=14)	2 (0-4)	3 (2-9)	40 (3-98)	13 (0-98)
Junio (n=11)	95 (1-440)	300 (10-790)	331 (11-650)	194 (1-790)
Agosto (n=7)	2 (3-4)	12 (1-22)	1,620 (140-3,100)	467 (0-3,100)

Por otro lado, *Salmonella* se detectó en 1 de 5 pozos (20%) incluidos en el estudio. El patógeno fue detectado en 2 de las 10 muestras colectadas del pozo #1 de la Unidad B, a pesar de que el agua cumplió con los límites de *E. coli*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Gu y colaboradores [8] quienes observaron la presencia de *Salmonella* en el agua de cuatro pozos agrícolas en Virginia, USA, a pesar de que los niveles de *E. coli* estuvieron por debajo de los límites establecidos en el PSR con una MG entre 1.0 y 1.3 NMP/100 mL y un VUE entre 0 y 71.8 NMP/100 mL. Topalcengiz y colaboradores [9], reportaron un

fenómeno similar en agua superficial para uso agrícola en Florida, USA, encontrando que el 4.8% de las muestras analizadas fueron positivas a *Salmonella* a pesar de presentar niveles de *E. coli* por debajo de los límites del PSR.

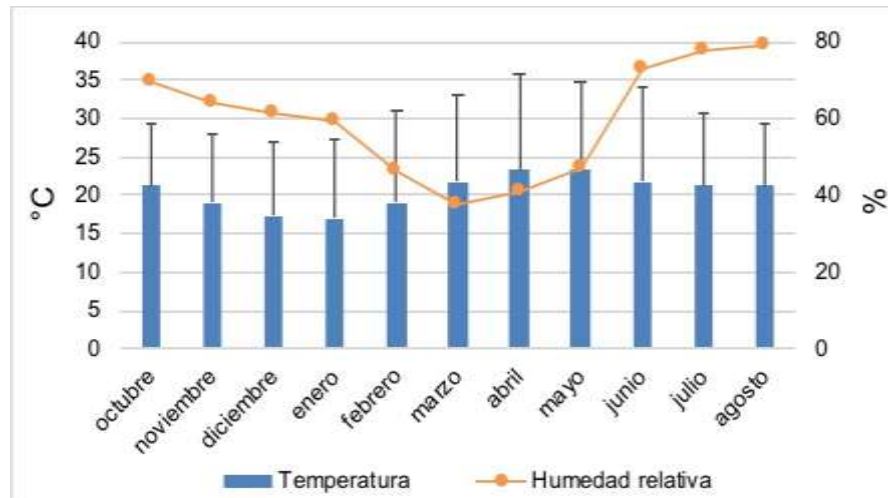


Figura 1. Temperatura promedio (barras azules), temperatura máxima (línea negra vertical) y humedad relativa promedio (línea naranja) mensual en la zona de estudio

Los niveles más altos de *E. coli* se observaron en las unidades de producción B y C, mientras que *Salmonella* se detectó en muestras de agua de la unidad B; en ambas unidades productivas existen áreas ganaderas en proximidad, lo cual podría ser un factor influyente en la calidad del agua. Se observó una granja avícola anexa a la unidad de producción B, a una distancia aproximada de 20 m con respecto al pozo #1, así como corrales con ganado bovino y equino a una distancia aproximada de 24 m del pozo de la unidad C. Estos resultados coinciden con Valenzuela y colaboradores [10], quienes encontraron niveles de *E. coli* por arriba de los límites establecidos en la normatividad Chilena en agua de pozos en una zona agrícola-ganadera del sur de Chile. En el mismo sentido, Sigua y colaboradores [11] determinaron que los niveles de *E. coli* y coliformes fecales así como la frecuencia de *Salmonella* fueron mayores en aguas superficiales cercanas a zonas ganaderas en Brasil.

Conclusiones

Los niveles de *E. coli* en agua de pozo utilizada para el riego de berries muestran variabilidad a lo largo del tiempo con un mayor incremento en los meses más calidos y lluviosos y en algunos casos sobrepasan los límites máximos establecidos en el Reglamento para la Inocuidad de Productos Hortofrutícolas Frescos de los Estados Unidos de América para este indicador microbiológico. El agua para usos agrícolas de la zona de estudio puede tener presencia de *Salmonella* aún cuando cumpla con los criterios microbiológicos establecidos en el PSR, lo cual representa una limitación del indicador microbiológico que debe considerarse en el plan de inocuidad de las unidades de producción. Es importante mantener un monitoreo de las fuentes de agua y vigilar las prácticas para su uso agrícola a fin de cumplir con la normatividad para la exportación de productos frescos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Fondo para Atención de Problemas Estatales FODECIJAL 2019 del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL Proyecto 8112-2019). Los autores agradecen las facilidades otorgadas por la Asociación Nacional de Exportadores de Berries, A.C. (ANEBERRIES) para realizar esta investigación, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionar una beca para el estudiante de la Maestría en Ciencias en Salud Ambiental Jesús Magdiel García Díaz.

Referencias

1. Gelting, R.J. and Baloch, M. (2013). A system analysis of irrigation water quality in environmental assessments related to foodborne outbreaks. *Aquatic Procedia* **1**: 130-137.
2. Lu, Y., Song, S., Wang, R., Liu, Z., Meng, J., Sweetman, A.J., Jenkins, A., Ferrier, R.C., Li, H., Luo, W., and Wang, T. (2015). Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environment International* **77**: 5–15.
3. Código de Regulaciones Federales Título 21 Parte 112. (2015). Estándares para el cultivo, cosecha, empaque y almacenamiento de los productos agrícolas frescos para el consumo humano. Federal Register **80**(228): 74547-74568.
4. Muralikrishna, I.V. and Manickam, V. (2017). Chapter Eleven - Principles and design of water treatment. Environmental Management, Science and Engineering for Industry. Muralikrishna, I.V. and Manickam, V. (Eds.) First Edition, 209-248. Elsevier, United Kingdom.
5. United States Food and Drug Administration. (2020). Bacteriological Analytic Manual (BAM), Chapter 5: *Salmonella*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam-chapter-5-salmonella#Prep>, Consultado: 10 marzo 2020.
6. United States Environmental Protection Agency. (2002). Method 1604: Total coliforms and *Escherichia coli* in water by membrane filtration using a simultaneous detection technique (MI medium). <https://www.epa.gov/water-research/microbiological-methods-and-online-publications>, Consultado: 21 marzo 2020.
7. Holvoet, K., Sampers, I., Seynaeve, M. and M. Uyttendaele. (2014). Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. *International Journal of Food Microbiology*, **171**:21-31.
8. Gu, G., Strawn, L.K., Ottesen, A.R., Ramachandran, P., Reed, E.A., Zheng, A.J., Boyer, R.R., and S. L. Rideout. (2021). Correlation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in irrigation water to environmental factors, fecal indicators, and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology* **11**, 1-16.
9. Topalcengiz, Z., Strawn L.K., and Danyluk M.D. (2017). Microbial quality of agricultural water in Central Florida. *PLoS ONE* **12**(4): e0174889.
10. Valenzuela, E., Godoy, R., Almonacid, L. y M. Barrientos. (2012). Calidad microbiológica del agua de un área agrícola-ganadera del centro sur de Chile y su posible implicancia en la salud humana. *Revista Chilena de Infectología*. **29**(6): 628-234.
11. Sigua, C.G., Pascale, P.J.C., Deon, K.J., Mulinari, M.G., Mattei, M., Kleinm J.B., Muller, S. and Plieske, G. (2010). Microbiological quality assessment of watershed associated with animal-based agriculture in Santa Catarina, Brazil. *Water Air Soil*, **210**(1): 307-316.