

# **Análisis de riesgo del agua utilizada en sistemas hidropónicos para el cultivo de *Latuca sativa L.* en Puerto Rico**

**Por**

**Aimee Silvestry Acosta**

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**En**

**CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
2018

Aprobada por:

\_\_\_\_\_  
Edna Negrón - Pérez, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Lynette E. Orellana - Feliciano, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Luis A. Ríos - Hernández, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Silvestre Colón – Ramírez, M.S.  
Representante de Estudios Graduados

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Fernando Pérez - Muñoz, Ph.D.  
Coordinador, Programa Ciencia y  
Tecnología de Alimentos

\_\_\_\_\_  
Fecha

## ABSTRACT

Foodborne diseases cause 48 million people annually to suffer health problems due to the presence of pathogens in their food. This represents a concern in terms of the people affected and the economic cost for public health, which could be prevented (Olaimat y Holley, 2012). Outbreaks of food-borne diseases associated with fruits and vegetables continue in the United States and worldwide. Although the source of contamination of leafy vegetables has not been determined, factors such as longer shipping distances and increased time between harvest and consumption can affect the safety of the food. Likewise, high demand for these products can result in unsuitable growing areas near agricultural breeding sites. Another factor that may be a source of contamination is the water supply. Agricultural water represents a potential source of pathogenic microorganisms requiring analysis and monitoring to determine its sanitary quality.

In this research, four farms located in three municipalities: Hormigueros, Lares and San Germán, P.R., which grow lettuce (*Latuca sativa L.*) in hydroponic systems, were selected. Three farms use well water as their water supply and one of them uses potable water. Six sampling points were established in each farm, four in the hydroponic system, one in the source of the water (well water or potable water) and one in the storage tank. The water samples were taken from the different points at different times (0-5, 15-20 and 30-35 days) during the growing period until harvest. A bacteriological count of *Escherichia coli* was taken using selective media like m-Endo Agar LES and m-FC agar to determine the water quality and verify if the agricultural water complied with the Food Safety Modernization Act (FSMA) - Produce Safety Rule (PSR). The isolated colonies were inoculated in MacConkey sorbitol media to detect the presence of *E. coli* O157:H7. After performing an ANOVA to the number of presumptive colonies of *Escherichia coli* isolated from the water of farms whose supply was well water (Farm 1, Farm 2, Farm 3), it was observed that there was a significant difference between the sampling points analyzed ( $p < 0.0001$ ). For the sampling points distribution tank (TD), starting point (PI), middle point (PM) and end point (PF) the averages of colonies were 3.39, 3.40, 3.39 and 3.35 log CFU/100mL of water respectively. The farms were not in compliance with the microbiological standards (2.10 log CFU of *E. coli*/100mL) established in the Produce Safety Rule (PSR) for the aforementioned points. For the sampling points of the well (P) and storage tank (TA), the farms were in compliance because the averages of colonies were 0.71 and 0.55 log CFU/100mL of

water respectively. The preliminary results of the farm, whose supply was potable water (Farm 4), was not in compliance with the microbiological standards at the sampling points: distribution tank (TD), starting point (PI), midpoint (PM) and end point (PF). The reported values were 3.49, 3.43, 3.46 and 3.47 log CFU/100mL of water respectively for the aforementioned points. For the tap point (G) and storage tank (TA), the farm whose supply was potable water was in compliance, because the reported values were 0.00 log CFU/100mL of water for both points. These results suggest that the problem of contamination lies in the hydroponic system. It is recommended to use chemicals such as sodium hypochlorite, calcium hypochlorite or chlorine dioxide to treat the water and the implementation and validation of a cleaning and sanitizing program in the hydroponic system to eliminate microorganisms that cause diseases. Another strategy to treat water could be heat sterilization, ozone injection, exposure to ultraviolet radiation (UV-C), membrane filtration or ultrasound (US). In addition to these results, the presence of *E. coli* O157: H7 in the analyzed water samples were preliminarily detected for farms 1 and 3.

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos causan anualmente que 48 millones de personas sufran problemas de salud debido a la presencia de patógenos en los alimentos ingeridos. Esto representa una preocupación en términos de las personas afectadas y el costo económico que implica para la salud pública, lo cual puede prevenirse (Olaimat y Holley, 2012). Los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados a frutas y vegetales de hoja continúan tanto en Estados Unidos, como a nivel mundial. Aunque la contaminación de vegetales de hoja no se ha determinado, diversos factores pueden influir en la misma como una larga distancia de envío, el tiempo entre la cosecha y el consumo del alimento aumenta y dado a la alta demanda, estos podrían haber sido cultivados cerca de lugares de crianza de animales. Otro factor que puede ser la fuente de contaminación es el agua contaminada. El agua de uso agrícola representa una fuente potencial de microorganismos. Esta puede ser un vehículo de contaminación de patógenos, por lo que es necesario su análisis y monitoreo. Es por esta razón que es importante determinar la calidad sanitaria del agua para uso agrícola.

En esta investigación se seleccionaron cuatro granjas localizadas en tres municipios: Hormigueros, Lares y San Germán, Puerto Rico, que cultivan lechuga (*Latuca sativa L.*) en sistemas hidropónicos. Tres granjas utilizan agua de pozo como suministro de agua y una de ellas utiliza agua potable. Se establecieron seis puntos de muestreo en cada granja, cuatro puntos en el sistema hidropónico, uno en la fuente del agua (pozo ó grifo) y uno en el tanque de almacenamiento. Se tomaron muestras de agua de los diferentes puntos en diferentes tiempos (0-5, 15-20 y 30-35 días) durante el período de cultivo hasta su cosecha. Se hizo un conteo bacteriológico de *Escherichia coli* utilizando medios selectivos y diferenciales como m-Endo Agar LES y m-FC agar para verificar si el agua utilizada estaba en cumplimiento con la Ley de modernización de la inocuidad de los alimentos - Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos (FSMA - PSR, por sus siglas en inglés). Las colonias aisladas también fueron inoculadas en el medio de cultivo MacConkey sorbitol para detectar la presencia de *E. coli* O157:H7. Luego de realizar un ANOVA para la cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* aisladas del agua cuyas granjas tienen como suministro agua de pozo (Granja 1, Granja 2, Granja 3), se observó que había diferencia significativa entre los puntos de muestreo analizados ( $p < 0.0001$ ). Para los puntos de muestreo: tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y

punto final (PF) los promedios de colonias fueron 3.39, 3.40, 3.39 y 3.35 log UFC/100mL de agua respectivamente. Estas no están en cumplimiento con los estándares microbiológicos (2.10 log UFC de *E. coli*/100mL de agua) establecidos en la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos para los puntos antes mencionados. Para los puntos de muestreo del pozo (P) y tanque de almacenamiento (TA) las granjas se encontraron en cumplimiento, ya que los promedios de colonias aisladas fueron de 0.71 y 0.55 log UFC/100mL de agua respectivamente. Los resultados preliminares de la granja cuyo suministro era de agua potable (Granja 4) sugieren que ésta no está en cumplimiento con los criterios microbiológicos para los puntos de muestreo del tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF). Los valores reportados fueron 3.49, 3.43, 3.46 and 3.47 log UFC/100mL de agua respectivamente para los puntos antes mencionados. Para los puntos del grifo (G) y tanque de almacenamiento (TA) ésta se encuentra en cumplimiento, ya que se reportaron valores de 0.00 log UFC/ 100mL de agua. Estos resultados sugieren que el problema de contaminación radica en el sistema hidropónico, por lo que se recomienda establecer estrategias para el tratamiento del agua. Se recomienda la utilización de químicos como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio o dióxido de cloro para tratar el agua e implementar y validar un programa de limpieza y sanitización del sistema hidropónico para eliminar microorganismos causantes de enfermedades. Otras estrategias para tratar el agua podrían ser la esterilización por calor, inyección de ozono, exposición a radiación ultravioleta (UV-C), filtración por membrana o ultrasonido (US). Además de esto se pudo detectar de manera preliminar la presencia de *E. coli* O157:H7 en las muestras de agua analizadas para las granjas 1 y 3.

Derechos de autor reservados ©

Aimee Silvestry Acosta

2018

*Dedicada a mi familia...*

*Mi madre: María L. Acosta*

*Mi hermano: Reinaldo Silvestry*

*A la memoria de mi padre:*

*Luis A. Silvestry*

*y*

*A la memoria de mi abuela:*

*Sofía Ruiz*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por darme la salud, sabiduría y fuerza para completar este capítulo en mi desarrollo profesional.*

*A la Dra. Edna Negrón Pérez por dirigirme y darme la oportunidad de trabajar en esta investigación para los agricultores puertorriqueños.*

*A Luis Ríos Hernández, Lynette Orellana y Mildred Chaparro por compartir sus conocimientos en el área de microbiología y microbiología de alimentos para lograr el éxito de esta investigación.*

*A Magaly Zapata por siempre estar dispuesta a colaborar con materiales y compartir sus conocimientos para esta investigación.*

*A Christian del Río Ramos por ayudarme en el análisis de microorganismos.*

*Al Dr. Raúl Machiavelli, la Dra. Linda Wessel - Beaver y a Edgar Fernando, M.S., por colaborar con sus conocimientos en análisis bioestadísticos.*

*A Andrea P. Barreto y Ramón Couto, por ayudarme en la recolección y análisis de muestras y ser mi compañía durante las largas horas en el laboratorio.*

*Al Proyecto Nacional S1056 H449 - Enhancing Microbial Food Safety by Risk Analysis, al Center for Education and Training in Agriculture and Related Sciences (CETARS) y al programa RISE – Pathways to Diversity in Food Science Careers, Project No. 2013-38422-20998, financiado por USDA NIFA, de la Universidad de Puerto Rico - Mayagüez, por proveer los fondos para la compra de materiales de esta investigación.*

*Al Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos por proveer las facilidades y el personal para llevar a cabo esta investigación.*

*A los agricultores que permitieron la utilización de sus cultivos para esta investigación.*

## CONTENIDO

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>viii</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>FIGURAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>6</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>8</b>
<b>Revisión Literaria</b> .....	<b>9</b>
<b>Sistemas hidropónicos</b> .....	<b>9</b>
<i>Latuca sativa L.</i> (lechuga).....	<b>10</b>
<b>Fuentes de contaminación de alimentos y calidad de agua agrícola</b> .....	<b>11</b>
<b>Patogénesis de <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>18</b>
<b>Internalización de patógenos</b> .....	<b>20</b>
<b>Brotos Asociados a shiga toxin <i>Escherichia coli</i> (STEC) en vegetales de hoja</b> .....	<b>24</b>
<b>Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA, por sus siglas en inglés)</b> .....	<b>29</b>
<b>Estándares mínimos para el cultivo, recolección, embalaje y almacenamiento seguros de frutas y verduras cultivadas para consumo humano</b> .....	<b>31</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>35</b>
<b>Área de estudio general</b> .....	<b>35</b>
<b>Técnica de recogido de muestras</b> .....	<b>36</b>
<b>Técnicas de análisis de laboratorio</b> .....	<b>36</b>
<b>Conteo de colonias</b> .....	<b>37</b>
<b>Fórmula general</b> .....	<b>37</b>
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>37</b>
<b>Resultados y Discusión</b> .....	<b>38</b>

<b>Conclusión .....</b>	<b>62</b>
<b>Recomendaciones .....</b>	<b>65</b>
<b>Literatura Citada .....</b>	<b>67</b>
<b>Apéndices .....</b>	<b>77</b>
<b>Resultados Estadísticos .....</b>	<b>77</b>
<b>Análisis de varianza para la cantidad de colonias presuntivas de <i>E. coli</i> contabilizadas en las granjas 1, 2 y 3 cuyo suministro era agua de pozo.....</b>	<b>77</b>
<b>Análisis de varianza para la cantidad de colonias presuntivas de <i>E. coli</i> contabilizadas en la granja 4 cuyo suministro es agua potable de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados.....</b>	<b>80</b>
<b>Prueba para el supuesto de homocedasticidad .....</b>	<b>81</b>
<b>Prueba para el supuesto de Normalidad .....</b>	<b>82</b>
<b>Fotos de colonias de bacterias. ....</b>	<b>83</b>
<b>Datos de la cantidad de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> para cada granja analizada. ....</b>	<b>85</b>

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación del orden jerárquico y el porcentaje de enfermedades atribuidas a productos alimentarios al ajustar el algoritmo de atribución para tener en cuenta la variación entre el número de enfermedades relacionadas con brotes desde el año 1998 a 2008 en los Estados Unidos (Painter, et al., 2013).....	<b>26</b>
<b>Tabla 2.</b> Etiología de los microorganismos implicados en brotes, enfermedades, hospitalizaciones y muertes asociados a vegetales de hoja en los Estados Unidos desde el año 1973 a 2012 (Herman, et al., 2015). .....	<b>28</b>
<b>Tabla 3.</b> Análisis de varianza para las fuentes de variación (granja, puntos de muestreo, tiempo, y puntos de muestreo por tiempo) en las granjas (1, 2 y 3) que siembran <i>Latuca sativa L.</i> en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un $\alpha = 0.01$ .....	<b>43</b>
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la prueba de Shapiro – Wilks para verificar el supuesto de Normalidad. ....	<b>44</b>
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) contabilizadas en las granjas (1, 2 y 3) que siembran <i>Latuca sativa L.</i> en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un $\alpha = 0.01$ . .....	<b>45</b>
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: pozo (P), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) para las granjas (1, 2 y 3) que siembran <i>Latuca sativa L.</i> en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un $\alpha = 0.01$ . .....	<b>45</b>
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) para el tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en las granjas (1, 2 y 3), que siembran <i>Latuca sativa L.</i> en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un $\alpha = 0.01$ .....	<b>46</b>
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) de la interacción entre puntos de muestreo: pozo (P), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) por tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en las granjas que siembran <i>Latuca</i>	

<i>sativa L.</i> en sistemas hidropónicos (1, 2 y 3) y cuyo suministro es agua de pozo con un $\alpha = 0.01$ . .....	<b>50</b>
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza para las fuentes de variación (puntos de muestreo, tiempo, y puntos de muestreo por tiempo) en la granja 4, que siembra <i>Latuca sativa L.</i> en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua potable con un $\alpha = 0.01$ . .....	<b>51</b>
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: grifo (G), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) para la granja 4 que siembra <i>Latuca sativa L.</i> en un sistema hidropónico y cuyo suministro es agua potable con un $\alpha = 0.01$ . .....	<b>52</b>
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) para el tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en la granja 4, que siembra <i>Latuca sativa L.</i> en un sistema hidropónico y cuyo suministro es agua potable con un $\alpha = 0.01$ . .....	<b>54</b>
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) de la interacción entre puntos de muestreo: grifo (G), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) por tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en la granja 4, que siembra <i>Latuca sativa L.</i> en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua potable con un $\alpha = 0.01$ . .....	<b>55</b>
<b>Tabla 13.</b> Cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>E. coli</i> contabilizadas durante el tiempo de cultivo (0-5 días, 15-20 días, 30-35 días) para las granjas 1, 2 y 3. ....	<b>85</b>
<b>Tabla 14.</b> Cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>E. coli</i> contabilizadas durante el tiempo de cultivo (0-5 días, 15-20 días, 30-35 días) para la granja 4. ....	<b>87</b>
<b>Tabla 15.</b> Cantidad de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de la granja 1. ....	<b>89</b>
<b>Tabla 16.</b> Cantidad de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de la granja 2. ....	<b>90</b>
<b>Tabla 17.</b> Cantidad de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de la granja 3. ....	<b>91</b>
<b>Tabla 18.</b> Cantidad de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de la granja 4. ....	<b>92</b>

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cantidad estimada de millones de galones de agua (Mgal/día) extraídos por día para el año 2010 en los diferentes estados y territorios de los Estados Unidos (Maupin, et al., 2014)....	<b>12</b>
<b>Figura 2.</b> Cantidad estimada de millones de galones de agua dulce y agua salada extraídos por día (Mgal/día) para el año 2010 en los diferentes estados y territorios de los Estados Unidos (Maupin, et al., 2014).....	<b>13</b>
<b>Figura 3.</b> Cantidad estimada de millones de galones de agua (Mgal/día) extraídos por día por categoría de uso (suministro público, uso doméstico, irrigación, ganado, acuicultura, uso industrial, minería y energía termoeléctrica) para el año 2010 en los diferentes estados y territorios de los Estados Unidos (USGS, 2017).....	<b>14</b>
<b>Figura 4.</b> Micrografía electrónica de barrido que muestra la unión de EAEC (cepa 1917) a las células de guarda de la estoma de la hoja y las bacterias alcanzando la sub estoma (Berger, et al. 2010). .....	<b>20</b>
<b>Figura 5.</b> Micrografía fluorescente y de campo claro de maní contaminado con <i>Salmonella typhimurium</i> en la epidermis (A), corteza (B), tejido vascular (C) y médula (D) (Deering, et al., 2012b). .....	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b> Cantidad de brotes asociados a enfermedades transmitidas por alimentos reportados desde el año 1995 a 2014 en los Estados Unidos (CDC and Food Safety, 2016). .....	<b>24</b>
<b>Figura 7.</b> Distribución de brotes asociados a tipos de alimentos desde el año 2009 a 2014 en los Estados Unidos (CDC and Food Safety, 2016). .....	<b>25</b>
<b>Figura 8.</b> Fotografía del área de muestreo donde se encuentran los puntos de muestreo: tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF). .....	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Foto de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (color verde metálico) en el medio de cultivo m-Endo Agar LES. ....	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> Foto de colonias de <i>Escherichia coli</i> en el medio de cultivo m-FC agar. ....	<b>40</b>
<b>Figura 11.</b> Foto de colonias de <i>Escherichia coli</i> en el medio de cultivo MacConkey sorbitol agar.....	<b>40</b>
<b>Figura 12.</b> Foto de colonias de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ATCC 700728) en el medio de cultivo MacConkey sorbitol agar.....	<b>41</b>
<b>Figura 13.</b> Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas (homocedasticidad).....	<b>43</b>

<b>Figura 14.</b> Representación gráfica de la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: pozo (MP-P), tanque de almacenamiento (MP-TA), tanque de distribución (MP-TD), punto inicial (MP-PI), punto medio (MP-PM), y punto final (MP-PF), para las granjas 1, 2 y 3 a través del tiempo de siembra de <i>Latuca sativa L.</i> en un sistema hidropónico, cuyo suministro es agua de pozo.....	<b>47</b>
<b>Figura 15.</b> Representación gráfica de la cantidad promedio de colonias presuntivas de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: grifo (G), tanque de almacenamiento (TA), tanque de distribución (TD) punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) para la granja 4 a través del tiempo de siembra de <i>Latuca sativa L.</i> en un sistema hidropónico, cuyo suministro de agua es agua potable.....	<b>53</b>
<b>Figura 16.</b> Colonias aisladas de la granja 3 en el medio de cultivo MacConkey sorbitol. Colonia de <i>E. coli</i> (Placa 1) y colonias presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7 (Placas 2, 3, 4, 5, 6, 7,8). ....	<b>57</b>
<b>Figura 17.</b> Colonias aisladas de la granja 1 en el medio de cultivo MacConkey sorbitol. Colonia de <i>E. coli</i> (Placa 9) y colonias presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7 (Placas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). ....	<b>59</b>
<b>Figura 18.</b> Comparación de colonias de <i>E. coli</i> O157:H7 en resultados obtenidos por Park, et al. (2011) en el medio de cultivo MacConkey sorbitol (1) y resultados obtenidos en esta investigación de colonias presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7 en el mismo medio de cultivo para la granja 1 (B) y granja 3 (C).....	<b>61</b>
<b>Figura 19.</b> Fotografía de lechugas empacadas. ....	<b>62</b>

## Introducción

La transmisión de enfermedades por el consumo de alimentos de origen animal como la carne, aves y leche cruda contaminados con patógenos está bien establecida, pero la preocupación ha aumentado en cuanto al consumo de frutas y vegetales frescos o mínimamente procesados (Steele y Odumeru, 2004). Las frutas y vegetales frescos pueden ser fuentes de patógenos como bacterias patogénicas, virus y parásitos (protozoarios, helmintos) (Allende y Monaghan, 2015). Las bacterias patogénicas pueden incluir *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* enterotoxigénica, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolítica* y *Escherichia coli* O157:H7 y otras *Escherichia coli* productoras de la toxina de shiga. Los virus patogénicos pueden incluir hepatitis A, enterovirus, echovirus, rotavirus y norovirus (virus tipo Norwalk). Los protozoarios pueden incluir *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolítica*. *Ascaris lumbricoides* es un tipo de helmintos que pueden ser transmitidos por alimentos. La presencia de la mayoría de estos patógenos son indicativos de contaminación fecal de origen animal o humana, aunque *B. cereus*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *C. botulinum* y *L. monocytogenes*, son patógenos comúnmente encontrados en el ambiente (Steele y Odumeru, 2004).

El agua agrícola ha sido definida como el mayor riesgo de contaminación con patógenos en vegetales de hoja consumidos crudos como las ensaladas (Allende y Monaghan, 2015). El agua agrícola es el agua utilizada para actividades agrícolas como la irrigación, aplicación de pesticidas y fertilizantes, enfriar productos y control de escarcha, entre otros (CDC, 2016). Las fuentes de irrigación de agua pueden ser agua subterránea, agua superficial y agua residual. El agua subterránea es en general de buena calidad microbiana, a menos que se contamine con escorrentías superficiales, mientras que el agua superficial es de calidad variable. El agua residual es de muy pobre calidad y requiere que se trate extensamente antes de ser utilizada para irrigación. El agua residual se refiere al agua de alcantarillado, la cual es comúnmente utilizada en países como Estados Unidos y Canadá donde el uso de agua está limitado (Steele y Odumeru, 2004).

El riesgo de transmisión de enfermedades por microorganismos patógenos presentes en el agua de irrigación está influenciado por el nivel de contaminación, la persistencia de patógenos en el agua, suelo, cultivo y rutas de exposición. La presencia de patógenos en el agua de irrigación puede causar la contaminación de frutas y vegetales (Steele y Odumeru, 2004). La contaminación de frutas y vegetales con patógenos también puede estar influenciada por otros factores como: suelo, composta o el manejo del alimento por los empleados (Olaimat y Holley, 2012). La demanda de alimentos mínimamente procesados, fácil de preparar, alimentos frescos listos para consumo, la globalización del comercio de alimentos y la distribución desde un lugar centralizado, también representan un reto para la inocuidad de alimentos y su calidad. La contaminación microbiológica es la mayor preocupación debido a las enfermedades causadas por alimentos. La presencia de microorganismos en los alimentos puede causar reacciones indeseables como deterioro en el sabor, olor, color y textura del alimento. También pueden causar enfermedades transmitidas por alimentos, ya que microorganismos patógenos pueden sobrevivir en el alimento debido factores intrínsecos como nutrientes, actividad de agua ( $a_w$ ) (Hamad, 2012), pH, presencia de oxígeno y factores extrínsecos en las condiciones de almacenamiento como tiempo, temperatura, y humedad relativa (Lucera, et al., 2012).

Microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 son los patógenos de mayor preocupación en cuanto a la inocuidad de alimentos frescos. El brote más grande asociado a *Escherichia coli* O157:H7 ocurrió en Japón en 1996 cuando 7,892 niños de una escuela y 74 miembros del personal resultaron infectados al consumir brotes de rábano (Park, et al., 2012). Este patógeno, hoy día, sigue siendo el causante de brotes por el consumo de alimentos contaminados. Según datos estadísticos, en Estados Unidos, Norovirus (NoV) fue responsable de la mayor cantidad de brotes (223) asociados a frutas y vegetales, seguido por *Salmonella* (con 71 brotes) y luego *Escherichia coli* (con 46 brotes), durante los años 2004 y 2012 (Callejón, et al., 2015). Para el año 2011, *Listeria monocytogenes* causó que 146 personas se enfermaran y 30 murieran al consumir melones contaminados con este microorganismo. Estos patógenos constituyen una carga económica para la sociedad, la salud pública, la industria de alimentos y el gobierno. La contaminación de productos con estos microorganismos en términos de salud pública y consecuencias económicas son un incentivo fuerte para prevenir la contaminación de vegetales frescos con estos patógenos. Es conocido que éstos son enmascarados en el ambiente a través de las heces de animales

colonizados o infectados. Desde el punto de vista de prevención es importante identificar cómo los patógenos se introducen en los productos y porqué persisten allí. El agua utilizada para cultivo puede causar que los productos se contaminen y puede influenciar la presencia de patógenos en las plantas (Park, et al., 2012).

Los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) relacionados a frutas y vegetales frescos o mínimamente procesados han aumentado (Tomita y Sawai, 2017). La mayoría de estos brotes surgen por la contaminación microbiológica de estos productos con heces de animales o humanos. Esta contaminación fecal se puede dar por utilizar estiércol no tratado o composta no tratada apropiadamente, pero en la mayoría de los casos se puede dar por contaminación indirecta como el uso de agua contaminada para irrigación, pesticidas, aplicaciones de químicos, cosecha y lavado. Es por esto que es importante concientizar a los agricultores de los peligros asociados a la utilización de agua contaminada que pueda entrar en contacto con la parte comestible del alimento. Esto es particularmente importante, ya que alimentos que se consumen crudos una vez se contaminan es prácticamente imposible remover esa contaminación con un lavado solamente (Bourquin, 2009). La lechuga es un vegetal de hoja que se consume crudo y que ha sido implicado en brotes según reportes del Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC, por sus siglas en inglés). Los patógenos asociados a brotes relacionados a vegetales de hoja son *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* O145 desde el año 2006 hasta el presente, según datos del CDC (CDC, 2017a). Cepas de *Escherichia coli* productoras de la toxina de shiga (STEC, por sus siglas en inglés) han sido reconocidos como agentes causantes de enfermedades por alimentos desde el 1982 (Beutin, et al., 2017).

Con el propósito de disminuir el riesgo de consecuencias adversas a la salud o muerte por el consumo de productos contaminados, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha establecido unos estándares mínimos para el cultivo, recolección, embalaje y almacenamiento seguros de frutas y verduras cultivadas para consumo humano. Estos estándares forman parte de lo que se conoce como la Ley de modernización de la inocuidad de los alimentos - Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos (FSMA - PSR, por sus siglas en inglés). Dentro de esta Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos (PSR, por sus siglas en inglés) se encuentra una parte dedicada al agua agrícola, para la cual se establecen unos requisitos microbiológicos en el agua utilizada durante el cultivo de productos agrícolas frescos

(Kux, 2015). La Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos aplica a productos que serán cultivados domésticamente, importados u ofrecidos para importación en cualquier estado o territorio de los Estados Unidos, Distrito de Columbia o Puerto Rico (CFR, 2017b).

El agua agrícola es utilizada en el cultivo de productos agrícolas frescos donde el agua puede o es posible que entre en contacto con el producto o superficies de contacto con el alimento (CFR, 2017d). Esto incluye el agua agrícola utilizada para el riego de brotes, el agua que se aplica directamente sobre el cultivo de productos (a excepción de los brotes), agua que de alguna manera entre en contacto directo con el producto agrícola fresco durante o después de la cosecha (agua de lavado, agua de enfriamiento o agua para prevenir la deshidratación de los productos), agua que va a entrar en contacto con superficies de contacto con el alimento, agua para hacer hielo y agua utilizada para el lavado de manos (CFR, 2017a).

Los alimentos clasificados como productos agrícolas frescos incluyen frutas y vegetales clasificados como materias primas agrícolas crudas (RAC, por sus siglas en inglés). Estos alimentos se consumen crudos y no reciben un procesamiento adecuado para reducir microorganismos de importancia para la salud pública. Algunos productos exentos de la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos son productos que raramente se consumen crudos, productos cultivados para consumo personal o dentro de la granja, productos que no son RAC y productos que reciben un procesamiento comercial que reduce de forma adecuada los microorganismos de importancia pública. Los productos que van a recibir un procesamiento comercial más adelante en la cadena de distribución deben estar acompañados de una declaración que establece que ese producto no ha sido procesado de manera adecuada para reducir los microorganismos de importancia pública. También se debe obtener anualmente una carta de garantía del comprador, la cual establece que éste va a procesar el producto comercialmente para reducir los microorganismos de importancia pública o una carta de garantía del comprador, la cual establece que una entidad más adelante en la cadena de distribución llevará a cabo el procesamiento comercial para reducir los microorganismos de importancia pública (CFR, 2017c).

En la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos se establecen dos criterios microbiológicos basados en la presencia de *Escherichia coli* (*E. coli*) en el agua agrícola utilizada para el cultivo de productos agrícolas frescos, lo que puede indicar la presencia de

contaminación fecal. El primer criterio establece niveles no detectables de *E. coli* en ciertos usos del agua agrícola donde es razonablemente probable que los microbios potencialmente peligrosos, si están presentes, se transfieran al producto a través del contacto directo o indirecto. Algunos ejemplos incluyen el agua utilizada para el lavado de manos durante y después de la cosecha, el agua utilizada en las superficies de contacto con alimentos, el agua utilizada en el contacto directo con los productos (incluyendo hacer hielo) durante o después de la cosecha, y el agua utilizada para el riego de brotes. El segundo criterio establece que el agua que se aplica directamente sobre el cultivo de productos (a excepción de los brotes) debe tener una media geométrica de 126 o menos UFC de *E. coli* genérica por 100mL de agua agrícola, con una desviación estándar de 410 o menos UFC de *E. coli* genérica por 100mL de agua agrícola (U.S. FDA, 2018b).

Luego de haber establecido la relación que existe entre el agua agrícola y la posible contaminación de frutas y vegetales con patógenos encontrados en el agua, esta investigación se enfocó en la detección de colonias de *E. coli* en el agua para el cultivo de lechugas (*Latuca sativa L.*), el cual es un vegetal de hoja que se consume crudo. En esta investigación se utilizó *E. coli*, ya que este es el microorganismo indicador de contaminación fecal en agua agrícola designado por la FDA, para determinar si las granjas están en cumplimiento con los estándares microbiológicos establecidos en la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos (Assar, s.f.). Con estos datos también se buscó proporcionar datos cruciales que ayudarán a los productores de *Latuca sativa L.* en hidropónicos con una evaluación del agua agrícola basada en una evaluación científica, para que puedan implementar estrategias que reduzcan la probabilidad de contaminación del producto. Además de esto se buscó hacer una comparación entre el agua de cultivo proveniente de agua de pozo y el agua potable proveniente de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados (AAA) de Puerto Rico. También se buscó determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 en el agua, ya que este patógeno ha sido implicado en brotes asociados a vegetales de hoja.

## Justificación

Las enfermedades transmitidas por alimentos causan anualmente que 48 millones de personas sufran problemas de salud debido a la presencia de patógenos en los alimentos ingeridos. Esto representa una preocupación en términos de las personas afectadas y el costo económico que implica para la salud pública, lo cual puede prevenirse (Olaimat y Holley, 2012). Según datos del CDC, de los 48 millones de personas que sufren problemas de salud, 128,000 son hospitalizadas y 3,000 mueren cada año (Olaimat y Holley, 2012), pero sólo una pequeña cantidad de estas enfermedades se asocia a brotes. Estos datos pueden utilizarse por oficiales de la salud pública, agencias reguladoras y por la industria de alimentos para establecer medidas de control específicas desde la granja a la mesa contra patógenos y para alimentos específicos (CDC, 2015).

Los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados a frutas y vegetales de hoja continúan tanto en Estados Unidos, como a nivel mundial. El aumento en el consumo de frutas y vegetales en los Estados Unidos ha traído como consecuencia un aumento en las importaciones de éstos (Deering, et al., 2012a). Para el año 2010 la importación de frutas frescas fue de 48.8% y la importación de vegetales frescos fue de 24.5%. La importación de lechuga, el cual es un vegetal de hoja fresco, tuvo un porcentaje de importación de 4.4% para ese mismo año. La importación de este producto tuvo un aumento de 2.5% para el año 2010, ya que para el año 2005 se importó un 1.9%. El total de importaciones de frutas y vegetales para el año 2015 en Estados Unidos fue de \$17.6 billones (Johnson, 2016).

Aunque la contaminación de vegetales de hoja no se ha determinado, diversos factores pueden influir en la misma. El aumento en el riesgo de contaminación por patógenos humanos puede aumentar debido a que la distancia de envío es más larga, el tiempo entre la cosecha y el consumo del alimento aumenta y, dado a la alta demanda, los mismos podrían haber sido cultivados cerca de lugares de crianza de animales. Otro factor que puede ser la fuente de contaminación es el agua contaminada. Las inundaciones pueden afectar los cuerpos de agua utilizados para el cultivo de las plantas debido a la presencia de fauna y modificaciones de terreno cercanos a éstos (Mootian, et al., 2009).

El agua de uso agrícola representa una fuente potencial de microorganismos. Esta puede ser un vehículo de contaminación de patógenos, por lo que es importante su análisis y monitoreo. Es por esta razón que es importante determinar la calidad sanitaria del agua para uso agrícola (Hernández-Domínguez, et al., 2008).

En este trabajo se analiza el agua de uso agrícola para el cultivo de lechugas y determinar su calidad sanitaria. Esto es importante, ya que en la Ley FSMA se establecen unos estándares para la calidad del agua agrícola que se deben cumplir para prevenir el riesgo de causar enfermedades transmitidas por los alimentos.

## Objetivos

Objetivo general:

1. Establecer si el agua agrícola utilizada en sistemas hidropónicos para el cultivo de *Latuca sativa L.* (lechuga) en Puerto Rico, cumple con los estándares microbiológicos de calidad de agua agrícola establecidos en la Ley de modernización de la inocuidad de los alimentos - Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos.
2. Proporcionar datos cruciales que ayudarán a los productores de *Latuca sativa L.* en hidropónicos, con una evaluación del agua agrícola basada en una evaluación científica, para que puedan implementar estrategias que reduzcan la probabilidad de contaminación del producto.
3. Hacer una comparación entre el agua de cultivo proveniente de agua de pozo y el agua de cultivo proveniente de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados (AAA) de Puerto Rico.
4. Detectar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en las muestras de agua analizadas.

Objetivo específico:

1. Enumeración bacteriológica de *Escherichia coli* en muestras de agua de pozo y agua potable utilizada en sistemas hidropónicos para el cultivo de *Latuca sativa L.* a diferentes tiempos de cultivo.
2. Determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 mediante la utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales.

## Revisión Literaria

### Sistemas hidropónicos

La técnica de cultivar productos en una solución enriquecida y aireada es lo que define un sistema hidropónico. Esta técnica fue desarrollada por investigadores a mediados de 1850 para determinar los elementos que cuando están ausentes pueden causar desbalances en la planta o que esta muera. Esta técnica se continúa utilizando actualmente modificando los elementos en la solución nutriente para adaptarlos a los requisitos de los cultivos (Benton- Jones, 2012).

Existen varios sistemas hidropónicos hoy día para la producción comercial tales como: irrigación por goteo para la producción de tomates, pepinos y pimientos; “standing aerated nutrient solution method” para la producción de lechuga y hierbas; “nutrient flow technique” (NFT), para la producción de lechuga, fresas y hierbas (Benton- Jones, 2012). Esta última es la técnica utilizada por los agricultores para el cultivo de *Latuca sativa L.* (lechuga), de los cuales se obtuvieron las muestras de agua analizadas. Para el sistema NFT, la solución nutriente se puede utilizar de dos formas: en un sistema abierto donde el agua pase una sola vez por la raíz de la planta y luego se descarta o utilizando un sistema cerrado donde la solución nutriente pasa a través de la raíz de la planta y luego es recuperada y recirculada. En el sistema abierto es uno antieconómico en cuanto al uso de agua y nutrientes. En el sistema cerrado, el cual es el método utilizado por los agricultores participantes de este proyecto, se requiere un envase para la recuperación de la solución y recircularla. A la solución se le añade más agua para alcanzar el volumen deseado y luego puede ser recirculada sin añadirle más nutrientes o puede ser reconstituida ajustando el pH y añadiendo los nutrientes que el cultivo requiere para su desarrollo. También el agua puede ser tratada para remover materia suspendida y aireada. La solución también puede ser sometida a tratamientos como esterilización por calor, inyección de ozono o exposición a radiación ultravioleta para eliminar organismos causantes de enfermedades. Sin estos tratamientos a la solución, la planta se puede ver afectada por insuficiencia de elementos y enfermedades en las raíces. Dependiendo del tratamiento que se le aplique a la solución esta puede ser utilizada para toda la vida (Benton- Jones, 2012).

La solución nutriente debe contener 13 elementos esenciales en su forma de iones para que la planta los pueda absorber a través de las raíces. Estos se dividen en macronutrientes y

micronutrientes. Los macronutrientes incluyen nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg), los cuales se requieren en mayor concentración. Los micronutrientes incluyen boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), y zinc (Zn), los cuales se requieren en una menor concentración. La temperatura, el pH y la conductividad eléctrica (EC, por sus siglas en inglés) son parámetros que también se deben monitorear para mantener un balance en el cultivo. La temperatura de la solución nutriente, así como la del ambiente alrededor puede afectar el cultivo. Temperaturas frías pueden causar marchitez en la planta, mientras que temperaturas por encima de los 90°F pueden interferir con el metabolismo de las raíces, la concentración de oxígeno disuelto en agua (OD) y disminuir el volumen de la solución nutriente afectando el crecimiento de la planta. El pH de la solución debe mantenerse en un rango de 5.0 a 6.0, aunque algunas especies de plantas prefieren un pH cercano a 6.0. Si el pH se excede de 7.0, volviéndose alcalino, este debe ser ajustado, mientras que si el pH llega hasta 4.5, la planta puede desarrollarse sin problemas y no es necesario el ajuste. La EC es otro parámetro importante que mide la acumulación de iones o sales. Si la EC aumenta, la habilidad de la planta de adquirir nutrientes y agua de la solución nutriente disminuye. Cuando esto sucede es necesario añadir agua a la solución. Para lograr un balance se debe programar la aplicación de nutrientes y agua de manera que se cumpla con los requerimientos de agua y nutrientes de la planta sin saturarla (Benton- Jones, 2012).

### ***Latuca sativa L.* (lechuga)**

La lechuga (*Latuca sativa L.*) es una especie de la familia *Asteraceae*. El género *Latuca* contiene aproximadamente 100 especies (17 europeas, 10 americanas, 33 del este de África y 40 de Asia). Es una especie diploide (2n) con un total de 18 cromosomas. Las variedades de lechuga se clasifican de acuerdo a su morfología y crecen principalmente como un vegetal de hoja. Los principales centros de producción de lechuga son Estados Unidos y Europa. En Puerto Rico, es uno de los productos mayormente cultivados en sistemas hidropónicos por los agricultores puertorriqueños, al igual que el cilantrillo. Desde el punto de vista económico, la lechuga es el producto vegetal más importante para el mercado de productos frescos en los Estados Unidos. Se estima que 2 billones de cabezas de lechugas se cosechan anualmente. En Estados Unidos el estado que más cultiva lechugas es California (70%). Italia, España, Francia, Netherlands y Reino Unido son los mayores productores en Europa. La lechuga no puede tolerar temperaturas

extremas, por lo que su producción en Europa solo ocurre en verano. Otros lugares que cultivan lechuga son: Canadá, Sur América, México, Sur África, Japón, China y el sur este de Australia (Khachatourians, et al., 2002).

La lechuga contiene cantidades moderadas de fósforo (P), hierro (Fe), sodio (Na), potasio (K), cobre (Cu), ácido ascórbico y vitamina A. Este cultivo está clasificado número 26 en términos de contribución dietaria entre las frutas y vegetales. En cuanto a consumo, se clasifica cuarta después del tomate, naranjas y papa en Estados Unidos. Entre otros usos de la lechuga se encuentra la utilización de sus hojas para hacer cigarrillos libres de nicotina en China, en Egipto se extrae aceite comestible de algunas semillas de lechuga y algunas especies salvajes como *L. virosa* son una fuente de lactucin y jacquinelin, los cuales tienen propiedades sedantes y analgésicas (Khachatourians, et al., 2002).

La lechuga es un vegetal de hoja el cual junto a otro gran número de frutas y vegetales es un producto agrícola fresco clasificado como RAC, según contemplado en el Código de Regulaciones Federales Título 21, Parte 112.1. El cultivo de este producto debe cumplir con los estándares para el cultivo, recolección, embalaje y almacenamiento seguros de frutas y verduras cultivadas para consumo humano establecidos en el 21CFR Parte 112 (CFR, 2017b). Esta regulación es un avance importante para que los vegetales de hoja y otros productos sean seguros para consumo. Los vegetales de hoja son un componente esencial de una dieta saludable; sin embargo, se han asociado con brotes de alto perfil que causan enfermedades graves (Herman, et al., 2015).

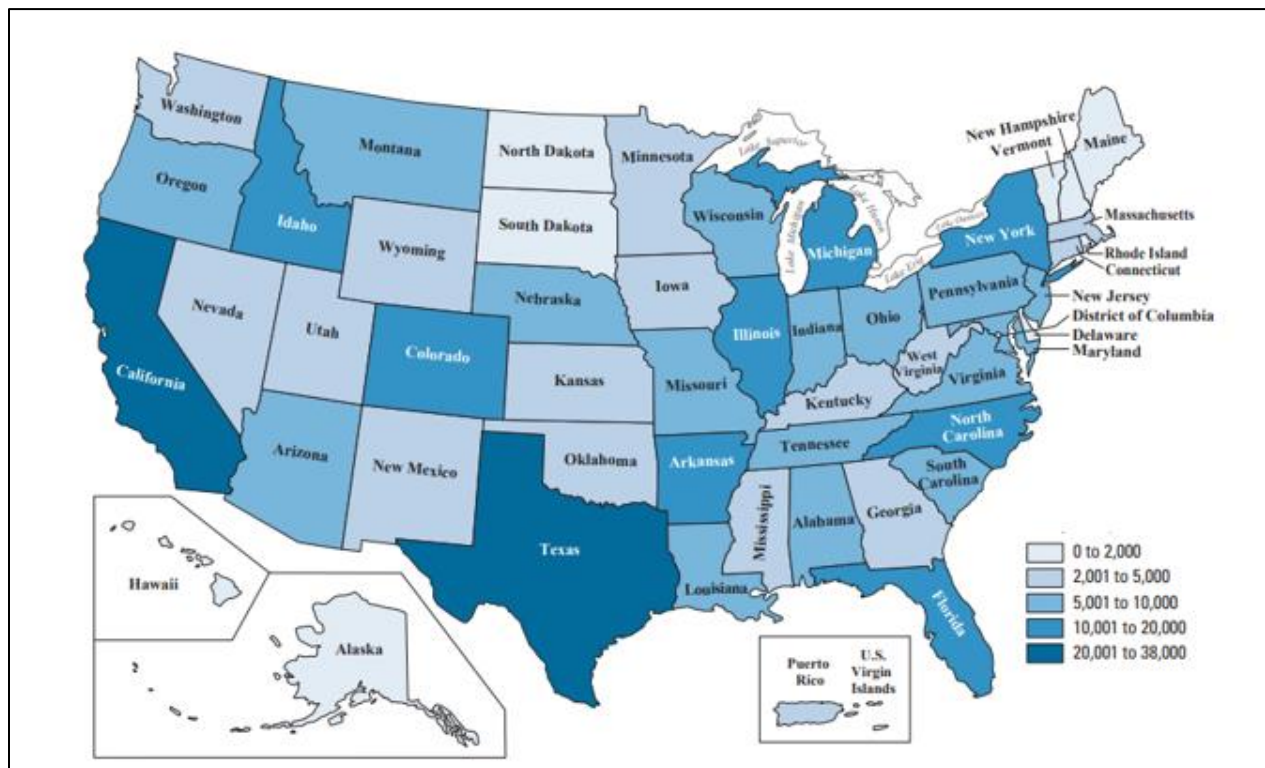
### **Fuentes de contaminación de alimentos y calidad de agua agrícola**

La contaminación de los alimentos puede ocurrir en cualquier momento, ya sea antes o después de la cosecha. Los factores que pueden estar asociados previo a la cosecha son: suelo, heces, agua de irrigación, fungicidas, insecticidas, insectos, estiércol inadecuado, animales salvajes o domésticos y mano de obra. Los factores que influyen a la contaminación después de la cosecha son: mano de obra, maquinaria de cosecha, envases de transporte, insectos, agua de enjuague, hielo, vehículos de transporte y equipo de procesamiento (Olaimat y Holley, 2012).

El agua agrícola se compone del agua utilizada para el cultivo de frutas y vegetales, así como para la crianza de ganado. Estos productos componen la mayor parte de nuestra dieta. La

calidad del agua agrícola se puede ver afectada por sitios industriales, granjas de animales, corrales y comederos. Una pobre calidad en el agua agrícola puede afectar la calidad de los cultivos y causar enfermedades a aquellos que la consumen (CDC, 2016).

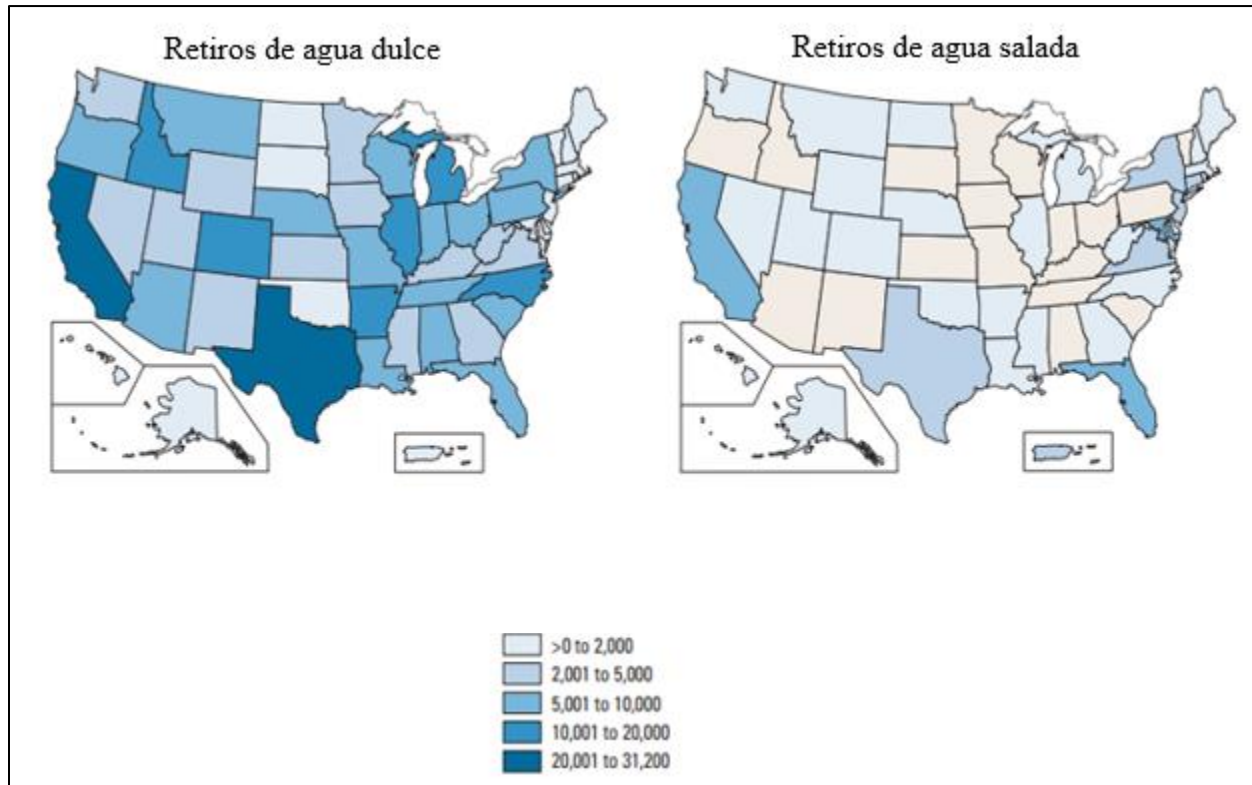
De acuerdo al Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS, por sus siglas en inglés) para el 2010 la cantidad de agua estimada utilizada por día en Estados Unidos fue de 355,000 millones de galones por día (Mgal/d). En la **Figura 1** se puede observar cómo se distribuye esta cantidad de agua por estado. El 86% (306,000 Mgal/d) del total de agua provino de fuentes de agua dulce y el 14% (48,300 Mgal/d) provino de fuentes de agua salada (Ver **Figura 2**) (Maupin, et al., 2014).



**Figura 1.** Cantidad estimada de millones de galones de agua (Mgal/día) extraídos por día para el año 2010 en los diferentes estados y territorios de los Estados Unidos (Maupin, et al., 2014).

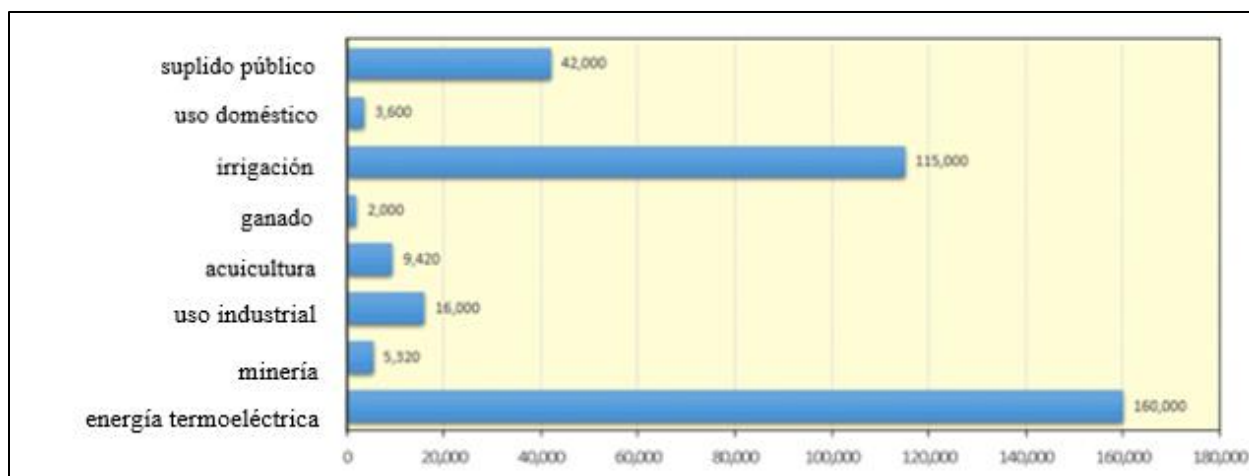
Este estimado está basado en las siguientes categorías de uso: suplido público, ganado, uso doméstico, irrigación, acuicultura, uso industrial, minería y energía termoeléctrica (Ver **Figura 3**) (USGS, 2017). La energía termoeléctrica, la irrigación y el suplido público componen el 90% del uso de agua total nacional. Las categorías restantes (uso industrial, acuicultura, minería, uso

doméstico y ganado) componen solo el 10% del uso de agua estimado en el reporte del 2010 del Servicio Geológico de los Estados Unidos (Maupin, et al., 2014).



**Figura 2.** Cantidad estimada de millones de galones de agua dulce y agua salada extraídos por día (Mgal/día) para el año 2010 en los diferentes estados y territorios de los Estados Unidos (Maupin, et al., 2014).

El agua agrícola se estima que es la fuente de contaminación más importante de alimentos y causante de enfermedades transmitidas por alimentos. Las fuentes de agua utilizadas como agua agrícola son diversas (U.S. FDA, 2018b) y pueden incluir agua de pozo, ríos, estanques, corrientes de agua, agua municipal y agua residual (Allende, et al., 2017). El agua agrícola se puede obtener de diversas fuentes de agua superficial, agua subterránea o agua de lluvia. El agua agrícola superficial puede provenir de ríos, zanjas de irrigación, corrientes de agua, canales, estanques, reservas y lagos. El agua agrícola subterránea puede provenir de pozos. El agua de sistemas municipales también puede ser utilizada para propósitos agrícolas (CDC, 2016).



**Figura 3.** Cantidad estimada de millones de galones de agua (Mgal/día) extraídos por día por categoría de uso (suplado público, uso doméstico, irrigación, ganado, acuicultura, uso industrial, minería y energía termoeléctrica) para el año 2010 en los diferentes estados y territorios de los Estados Unidos (USGS, 2017).

En el agua se pueden encontrar constituyentes orgánicos e inorgánicos que pueden afectar las plantas de manera adversa. Agua superficial escapada de tierras agrícolas puede contener residuos de fertilizantes, herbicidas y pesticidas que pueden afectar los suministros de agua. El agua de lluvia también puede contener sustancias suspendidas en la atmósfera, las cuales deben ser removidas del agua si esta va a ser utilizada tanto como para irrigar o para preparar la solución nutriente del cultivo. La recomendación es que se utilice agua pura, pero algunos elementos como el calcio (Ca) y magnesio (Mg) encontrados en el agua resultan beneficiosos para el cultivo y algunas de las sustancias encontradas en el agua no causan daño al desarrollo de la planta. Técnicas como osmosis reversa para remover sustancias orgánicas e inorgánicas, filtros de carbón activado para eliminar materia orgánica e intercambio de iones para disminuir materia inorgánica pueden ser utilizados para remover sustancias del agua (Benton-Jones, 2012).

El agua agrícola también se puede contaminar de diversas maneras que potencialmente pueden propagar bacterias, virus y parásitos tanto a las plantas como a animales. Las frutas y vegetales frescos pueden entrar en contacto con el agua contaminada durante el cultivo, cosecha y procesamiento lo cual puede causar enfermedades en los consumidores. Los puntos en los cuales potencialmente el agua contaminada puede afectar el proceso de producción incluyen: la

aplicación de químicos, irrigación, higiene de los trabajadores y durante el procesamiento del alimento (CDC, 2016).

Para efectos de esta investigación, la preocupación mayor en cuanto a la calidad del agua son los parámetros establecidos en cuanto a la cantidad de bacterias que se pueden encontrar en el agua agrícola (agua de pozo y agua potable) utilizada para el cultivo de *Latuca sativa L.* Los parámetros están establecidos por La Administración de Alimentos y Medicamentos (U.S. FDA, por sus siglas en inglés) en La Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA, por sus siglas en inglés), efectiva el 26 de enero de 2016 para el cultivo de productos de consumo crudo (U.S. FDA, 2018b).

La FDA, luego de hacer una revisión de literatura científica, ha determinado que *E. coli* será el microorganismo indicador de contaminación fecal, ya que consistentemente su presencia es indicativa de presencia de heces. La evaluación de la calidad del agua agrícola es importante en términos de contaminación fecal, ya que a medida que aumenta la contaminación fecal aumenta la posibilidad de la presencia de patógenos. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) ha establecido unos criterios basados en la presencia de *E. coli* y esto está sustentado por estudios epidemiológicos que demuestran que las personas se enferman luego de tomar agua recreacional contaminada con heces. Este criterio, información técnica, recomendaciones y guías de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) fueron utilizadas por la FDA para tener en cuenta las circunstancias que pueden afectar el cultivo de productos (Assar, s.f.).

Una revisión acerca de los factores que influyen la inocuidad microbiana de hortalizas frescas establece que la calidad del agua de riego y el tipo de sistema de irrigación puede afectar la inocuidad de los productos frescos. En un estudio para medir el efecto de tipo de irrigación se observó que un 90% de plantas de lechuga irrigadas en la superficie de la hoja con agua que contenía 7 log UFC/mL de *E. coli* O157:H7 estaban contaminadas, mientras que las que fueron regadas en el suelo con la misma concentración de *E. coli* O157:H7, solo el 19% resultaron contaminadas (Olaimat y Holley, 2012). En otro estudio sobre la calidad del agua obtenida de un río en Sur África para regar productos frescos, se encontró que el número de coliformes totales era de 6 log y el de *E. coli* era de 5.5 MPN/100ml (Gemmell y Schmidt, 2012). En otro estudio en Australia se encontró que las muestras de agua de un estanque dieron positivo para *C. jejuni*

(25%), *Salmonella* (3%), y *E. coli* O157 (28%). En Nigeria se aisló *E. coli* O157 de un 2.1% del agua de ríos utilizados para regar productos frescos. En Estados Unidos se aisló *Salmonella* del 79.2% de las muestras de agua superficial, encontrando mayores concentraciones del microorganismo en verano (Haley, et al., 2009). En Canadá se aisló *E. coli* O157:H7 en un 1.7% de muestras de un río y *Salmonella* de un 10.3% de muestras del canal de riego de agua (Gannon, et al., 2004).

El riego de alimentos con agua contaminada puede causar la contaminación del cultivo ya sea aplicando directamente el agua a la planta, así como aplicando el agua a la superficie donde crece el alimento (Solomon, et. al, 2002). En el estudio conducido por Solomon, et al. (2002) se observó que la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en plantas de lechuga a las cuales se les ha aplicado de manera foliar soluciones inoculadas con este patógeno han presentado mayores resultados positivos (29 de 32 plantas), que las plantas a las cuales solo se les ha inoculado la superficie donde crecen (6 de 32 plantas). Estos resultados sugieren que independientemente del método de irrigación utilizado, el cultivo se puede contaminar y que la utilización de agua contaminada se debe evitar. Aunque la contaminación sea baja, como los resultados obtenidos para el agua utilizada en la superficie, esto representa un riesgo para la salud humana ya que la dosis infecciosa de *E. coli* O157:H7 es menor de 1000 células. Basado en estos resultados se recomienda que cuando la calidad microbiológica del agua sea cuestionable esta se debe utilizar solamente para irrigar la superficie donde crece la planta, pero que idealmente no se debería utilizar esta agua para esos propósitos. Las plantas también presentaron resultados positivos luego de 20 días de la aplicación, lo cual ya se ha evidenciado en otros estudios que indican la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en la superficie de las lechugas (Solomon, et. al, 2002). Esto se puede justificar, ya que cepas patogénicas de *E. coli*, cepas comensales y un amplio grupo de *E. coli* ambiental tienen regiones en el genoma que codifican genes asociados a la adherencia, invasión, colonización y funciones de transporte que las ayudan a sobrevivir en ambientes como el agua y la tierra. También tienen proteínas RNA polimerasa sigma S (RpoS) que las ayudan a adaptarse y tolerar ambientes de bajo pH y de alta osmolaridad. También se ha reportado que *E. coli* O157:H7 ha sobrevivido y crecido en agua estéril y con concentraciones bajas de carbono (Gutiérrez-Rodríguez, et. al, 2012). En una investigación realizada en cultivos hidropónicos por Gutiérrez-Rodríguez, et al. (2012) si *E. coli* coloniza un sistema hidropónico esta es capaz de contaminar el sistema en ausencia de un tratamiento de desinfección. La disponibilidad de

nutrientes, ya sea de los exudados de las raíces de las plantas y del tanque de recirculación, pueden ser utilizados como fuentes de carbono por *E. coli* y *E. coli* O157:H7 para su crecimiento. Algunos nutrientes como sacarosa, sorbitol y ácidos orgánicos se encuentran en los exudados de las raíces y pueden explicar la sobrevivencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 en las soluciones de hidropónicos (Gutiérrez-Rodríguez, et. al, 2012). En una investigación realizada por Moyne, et al. (2013) se observó que niveles bajos de *E. coli* O157:H7 persisten en lechugas y que su sobrevivencia entre plantas depende de factores como su localización en la hoja, la microbiota endógena de la planta y la localización de la planta en el campo (Moyne, et al., 2013).

La inocuidad de alimentos y agua es la preocupación mayor a nivel internacional. De los grupos de alimentos con mayor frecuencia asociados a causar enfermedades entéricas en humanos son las frutas y vegetales crudos. El consumo de productos agrícolas frescos contaminados ha provocado brotes causados por bacterias, así como parásitos y virus. La contaminación de productos antes de la cosecha se puede dar por el agua de irrigación, lodo de aguas residuales, agua proveniente de la crianza de animales, estiércol, composta y animales domésticos o salvajes. La prevención de contaminación en actividades antes de la cosecha es necesaria para prevenir las enfermedades causadas por el consumo de alimentos crudos, debido a que no se puede depender o confiar en los tratamientos luego de la cosecha con agentes antimicrobiales para eliminar patógenos. También un mejor entendimiento del comportamiento de los patógenos en el ambiente antes de la cosecha puede ayudar en el desarrollo de estrategias e intervenciones para proveer alimentos inocuos (Beuchat, 2006). Los lavados pos cosecha de frutas y vegetales con agua potable o con tratamientos antimicrobiales como cloro, dióxido de cloro, ozono, peróxido y ácido peroxiacético son comúnmente utilizados para reducir la carga microbiana (Steele y Odumeru, 2004). Estudios han encontrado que en lechugas inoculadas con niveles bajos de *E. coli* O157:H7, lavadas con una solución clorada de 200 ppm por 1 o 5 minutos de exposición y refrigeradas a 4°C, esta bacteria puede sobrevivir. Es por esto que se debe prevenir y minimizar el riesgo de contaminación en vez de tratar el alimento con una solución clorada, la cual tiene una efectividad limitada, debido a que microorganismos patogénicos localizados en el contorno natural de la superficie de la planta, aperturas y heridas causadas durante la poda o cosecha se pueden escapar del efecto antimicrobial (Beuchat, 1999). Además de esto se ha encontrado que el cloro pierde su actividad antimicrobial cuando interactúa con materia orgánica, como el tejido de la planta (Solomon, et. al, 2002).

## **Patogénesis de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, capaz de crecer aeróbica y anaeróbicamente a una temperatura de 37°C y puede ser no mótil o mótil con flagelo peritrico. Este microorganismo puede ser un residente inofensivo del tracto gastrointestinal de humanos y animales, pero también tiene la capacidad patogénica de causar diarreas y enfermedades fuera del tracto gastrointestinal como en el tracto urinario, la sangre y el sistema nervioso central (Croxen, et al., 2013). Los tipos de *E. coli* que pueden causar diarrea pueden ser transmitidos por agua, alimentos o a través del contacto con animales o personas contaminadas. Este microorganismo también es utilizado como indicador de contaminación en agua (CDC, 2017c).

*Escherichia coli* es un microorganismo que debido a la pérdida y ganancia de genes se ha vuelto diverso y patogénico dando paso al desarrollo de nuevas cepas más virulentas. El tamaño del genoma de esta bacteria puede diferir entre cepas comensales y patogénicas por millones de pares de bases. Estas diferencias son las que proveen a las distintas cepas mayor virulencia y genes de adaptación. Esta información genética puede ser transferida entre cepas de *Escherichia coli* debido a la utilización de mecanismos como: conjugación, transformación y transducción mediante elementos genéticos móviles como transposones, inserción de secuencias, plásmidos y bacteriófagos. Las toxinas producidas por *Escherichia coli* O157:H7 (*stx 1* y *stx 2*), son toxinas encontradas en los fagos de *Shigella dysenteriae* y que se cree fueron transferidas a cepas de *Escherichia coli*, mediante la utilización de los mecanismos antes mencionados (Yamamoto, et al., 2017).

En un estudio con 18 fagos encontrados en *Escherichia coli* O157:H7, una de las cepas más patogénicas, se encontró que dos de ellos cargan los genes de la toxina de shiga (*stx 1* y *stx 2*) y pueden infectar otras cepas de *E. coli* y volverlas más virulentas (Croxen, et al., 2013). Algunas cepas de *E. coli* pueden causar enfermedades en los humanos debido a la producción de esta toxina, la cual afecta las células del intestino y puede pasar al torrente sanguíneo y afectar otros órganos como los riñones y el cerebro (Kintz, et al. 2017). Estas cepas se les llama “Shiga toxin *Escherichia coli*” o STEC. También pueden ser llamadas *E. coli* verocitotóxica (VTEC, por sus siglas en inglés) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés). La STEC comúnmente identificada en Estados Unidos es la *E. coli* O157:H7 (CDC, 2017c).

Además de las STEC O157 hay otros serogrupos que pueden causar enfermedades las cuales se les llama las “no-O157 STEC” o “Big six”. Dentro de este grupo se encuentran los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, los cuales contienen los genes que codifican para las toxinas de shiga (*stx* 1 y *stx*2). La diferencia entre ambas es que las STEC no-O157 son menos probables de causar enfermedades tan severas como las STEC O157, pero se ha encontrado que algunos serogrupos no- O157 tienen la misma capacidad virulenta que las O157 (CDC, 2017c). Cepas de STEC son altamente resistente a estrés fisicoquímicos como acidez y sequía, además de que pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo en la tierra, estiércol y agua (Beutin, et al., 2007). Otra característica de las STEC no-O157 encontrados en alimentos es que no poseen una característica bioquímica que las diferencie de las *E. coli* cuando crecen en un medio de cultivo. Esto representa una gran preocupación, ya que las colonias que se clasifiquen como *E. coli* utilizando el método de cultivo en placa podrían ser parte de estos serogrupos no-O157 (Kalchayanand, et al., 2013).

La mayoría de las de las infecciones causadas por las STEC más patogénicas pertenecen a los serogrupos O157, O26, O111, O103 Y O145, los cuales albergan los genes *stx* y *eae* que son altamente virulentos (Douëllou, et al., 2017). El gen *eae* se encarga de mediar la adhesión y colonización de la bacteria en las células eucariotas del hospedero (Amani, et al., 2010).

Las STEC son parte de la microbiota de animales rumiantes como las vacas, ovejas, chivos, venados y alces en los cuales no producen síntomas, mientras que en los humanos pueden causar enfermedades severas. Son patógenos asociados a alimentos que pueden causar secuelas como: diarrea sanguinolenta y acuosa, colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico (SHU) y la muerte (Kintz, et al., 2017). Alrededor de 5-10% de las personas infectadas con STEC desarrollan el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), el cual puede desencadenar en el fallo de los riñones. La mayoría de las personas se recuperan en pocas semanas del síndrome, pero otras pueden padecerlo de por vida o morir. Todavía no existe un tratamiento específico (Thorpe, 2004).

En 1993 *E. coli* O157:H7 fue declarado como adulterante en carne molida cruda en el Federal Meat Inspection Act (FMIA) y se estableció un programa de monitoreo en plantas inspeccionadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) y tiendas minoritarias por el Food Safety Inspection Service (FSIS) (FSIS, 1999).

## Internalización de patógenos

Estudios evidencian que microorganismos patógenos pueden internalizarse a través de una variedad de tejidos en vegetales de hoja, frutas y nueces a través de aberturas naturales en la planta como las sub-estomas en las hojas, lenticelas, raíces laterales emergentes y sitios afectados por daño biológico o físico (Deering, et al., 2012a). En un estudio realizado por Berger, et al. (2010) se observó dos patrones en la distribución de células de *E. coli* entero agregativa (EAEC, por sus siglas en inglés) en hojas de lechuga: (i) adherencia difusa a la epidermis y (ii) adhesión localizada a las células de guarda de las estomas (Ver [Figura 4](#)). Otros estudios en los cuales se ha utilizado células mutantes específicas, se ha encontrado que la unión a la epidermis es mediada por los pili o fimbrias de adherencia agregativa (AAF, por sus siglas en inglés), mientras que la agregación a la estoma esta mediada por el flagelo. Los pili AAF son conocidos, ya que promueven la colonización del microorganismo en el intestino de los humanos (Berger, et al. 2010).



**Figura 4.** Micrografía electrónica de barrido que muestra la unión de EAEC (cepa 1917) a las células de guarda de la estoma de la hoja y las bacterias alcanzando la sub estoma (Berger, et al. 2010).

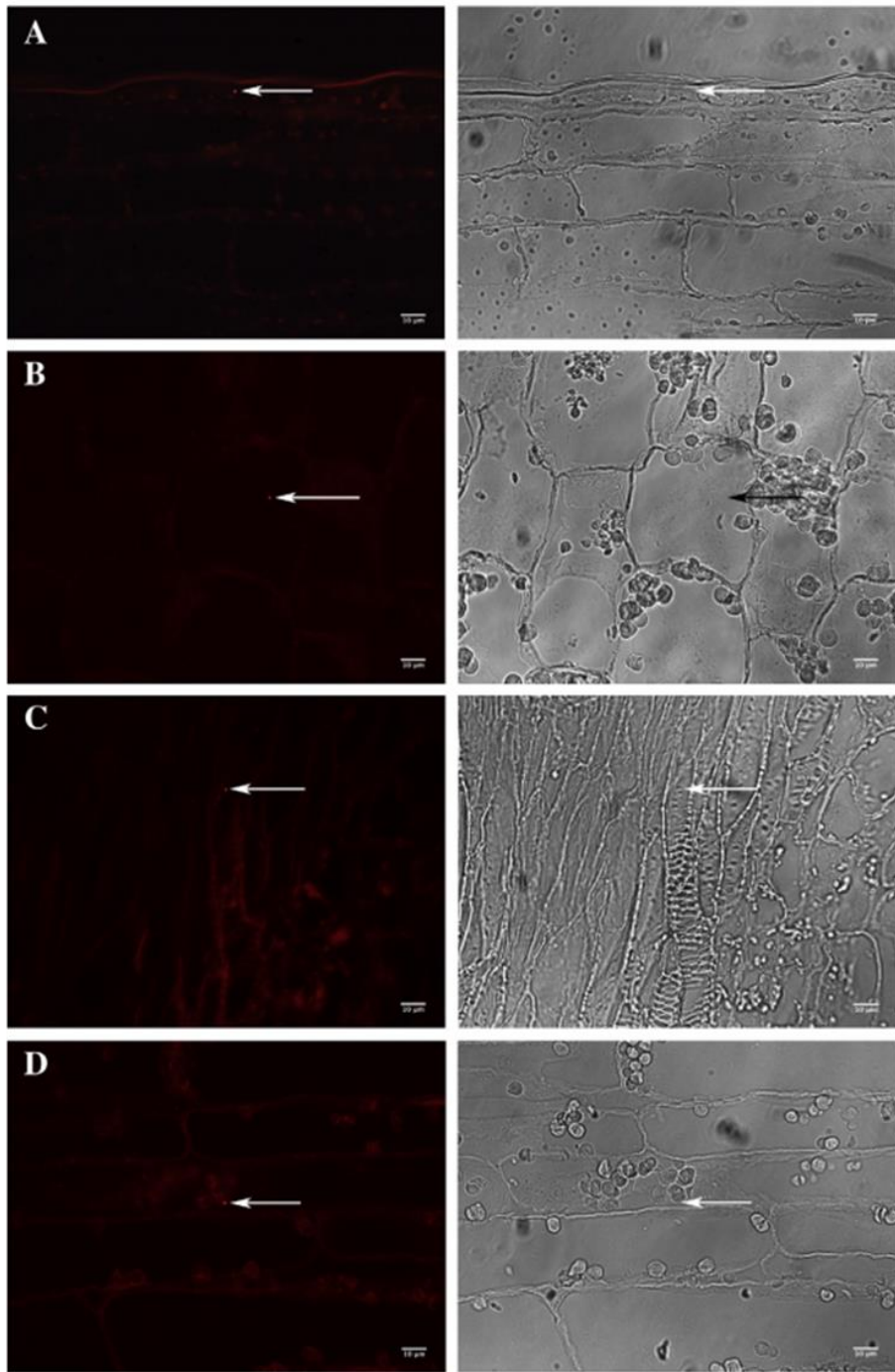
Otras rutas de entrada incluyen el agua utilizada para mojar las semillas, irrigar las plantas o para lavar los cultivos después de cosecha. También se ha observado que factores como el tipo de planta, cepa o serovar de la bacteria, ruta de contaminación y edad de la planta pueden influenciar la internalización (Deering, et al., 2012a). Condiciones que promuevan la penetración

de patógenos en los tejidos de la planta afectan negativamente la efectividad de tratamientos de descontaminación (Takeuchi, et al., 2001).

En un estudio realizado por Erickson, et al. (2010b) se encontró que hojas de lechuga irrigadas con *E. coli* O157:H7 a una concentración de  $10^8$  UFC/mL presentaron internalización hasta 14 días luego de la irrigación en el lado abaxial de la hoja. En otro estudio, este también encontró que en hojas de lechuga contaminadas con un inóculo de 6.4 log UFC de *E. coli* O157:H7 ocurría internalización del patógeno (Erickson, et al., 2010a). En un estudio realizado por Takeuchi, et al. (2001), se sumergieron lechugas en soluciones de *E. coli* O157:H7 a temperaturas de 4, 10, 22 o 37°C y concentraciones de oxígeno de 21 y 2.7%. La mayor concentración de células se adhirió a tejidos dañados en todas las temperaturas analizadas a 21% de oxígeno. A temperaturas de 4°C, *E. coli* O157:H7, demostró mayor penetración (101  $\mu\text{m}$  por debajo de los tejidos cortados) vs. las otras temperaturas.

En otra investigación se inocularon lechugas con células de *E. coli* O157:H7 a concentraciones de  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  UFC/mL y se encontró que estas se adherieron preferiblemente en los bordes cortados de las hojas a todos los niveles de inoculación. En adición se observó que, a mayor tiempo de exposición, mayor adherencia tanto en la superficie como en los bordes cortados de las hojas. También se observó una mayor penetración de las células a un promedio de  $73.5 \pm 16.0$   $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie de tejidos cortados a 4°C vs. a temperaturas de 7, 25, o 37°C. Las lechugas fueron sometidas a un tratamiento con cloro de 200ppm durante 5 minutos y se observó que, aunque el lavado redujo la carga microbiana (una reducción de 0.7 log en la superficie y 1.0 log en los bordes contados), las células se mantuvieron adheridas a concentraciones de 7.9 log UFC/cm<sup>2</sup> en la superficie y 8.1 log UFC/cm<sup>2</sup> en los bordes cortados. Se observaron células en las estomas y a través de los tejidos de la lechuga, lo cual indica que estas estructuras le sirven de barrera protectora contra el tratamiento antimicrobial como el cloro (Takeuchi y Frank, 2000). También se ha encontrado que *E. coli* O157:H7 se puede adaptar a una variedad de condiciones y condiciones y que tiene la capacidad de adherirse, colonizar y formar biopelículas en una serie de superficies en el área de procesamiento, así como superficies de espinacas, lechugas, col China, apio, albaca y perejil (Tomita y Sawai, 2017).

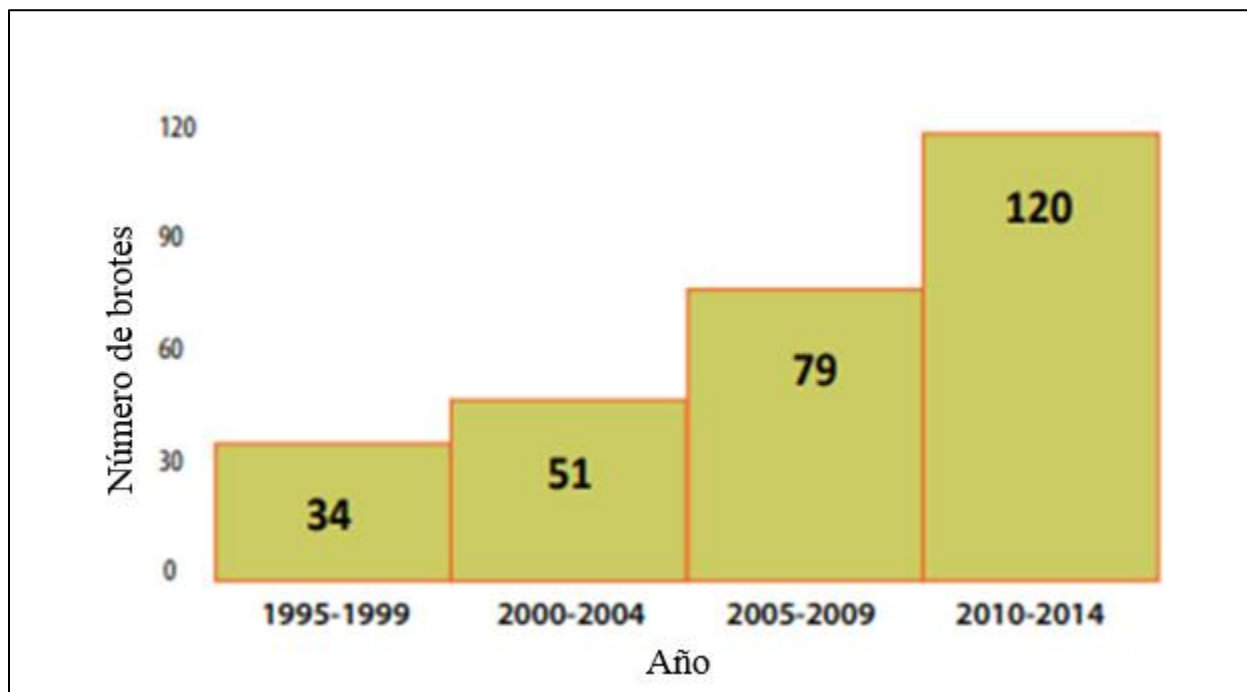
Estudios también han demostrado la colonización endófitas de *Salmonella* spp. en plantas. La internalización de *Salmonella* a través de las raíces de plantas como *Arabidopsis thaliana*, debido a las grietas en la epidermis y corteza que ocurren naturalmente cuando crecen las raíces laterales así lo evidencian. Además, se observó la colonización completa de la planta durante la inoculación de la raíz, indicando la habilidad de la bacteria para migrar a través de la planta. Serovares de *Salmonella* han sido observados en tejidos de lechugas, frijol y cebada. En un estudio realizado por Deering, et al. (2012b) se observó la internalización de *Salmonella* en tejidos de maní como la epidermis, corteza, tejido vascular y médula (Figura 5). La presencia de este microorganismo en el tejido vascular sugiere la posibilidad de la bacteria de moverse y diseminarse a través de toda la planta (Deering, et al., 2012b).



**Figura 5.** Micrografía fluorescente y de campo claro de maní contaminado con *Salmonella typhimurium* en la epidermis (A), corteza (B), tejido vascular (C) y médula (D) (Deering, et al., 2012b).

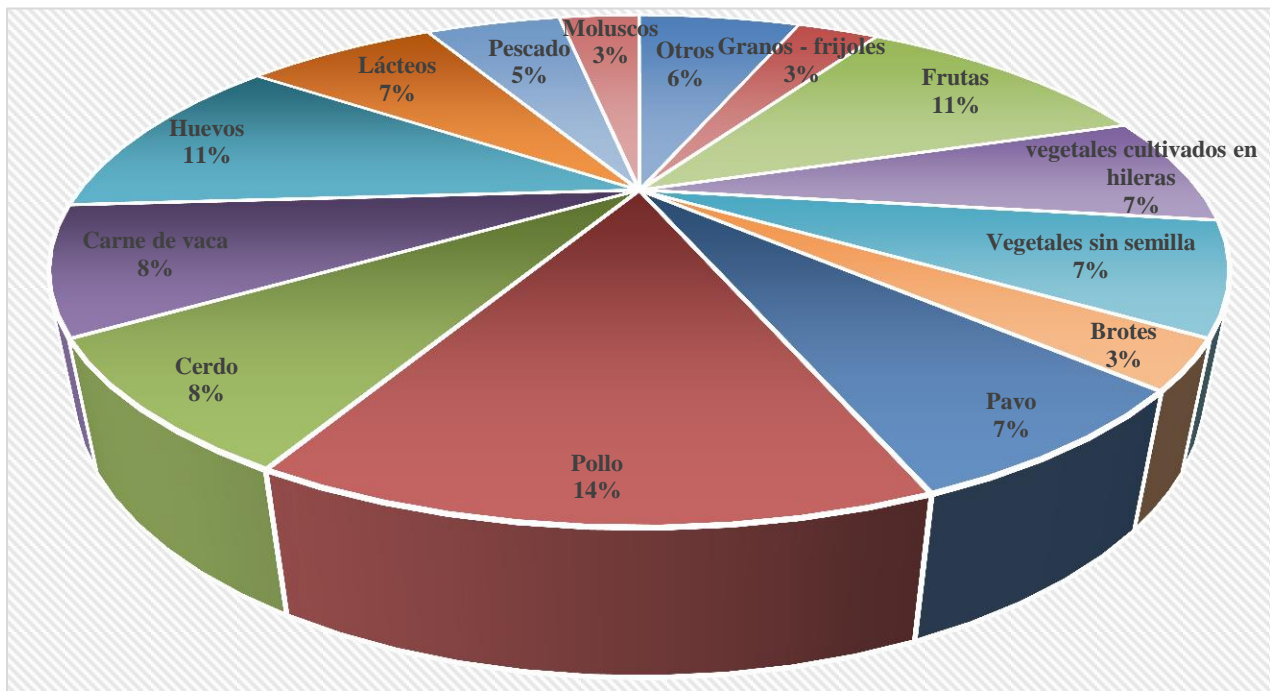
## Brotos Asociados a shiga toxin *Escherichia coli* (STEC) en vegetales de hoja

Cuando 2 o más personas se enferman al ingerir el mismo alimento o bebida contaminada se cataloga como un brote causado por una enfermedad transmitida por alimentos (CDC, 2017a). Actualmente muchos brotes a nivel nacional relacionados a enfermedades transmitidas por alimentos se han podido identificar debido a las mejoras en el monitoreo de estos. En la [Figura 6](#) se puede observar cómo ha aumentado la cantidad de brotes reportados desde 1995 a 2014. Factores como los cambios de los patrones en la producción globalizada de alimentos han provocado que los alimentos sean distribuidos en lugares más distantes. Esto, combinado con la integración y la consolidación de la agricultura y producción de alimentos, puede causar que los alimentos se contaminen rápidamente y se desarrolle un brote en las áreas geográficas donde se distribuye el producto (CDC, 2017b).



**Figura 6.** Cantidad de brotes asociados a enfermedades transmitidas por alimentos reportados desde el año 1995 a 2014 en los Estados Unidos (CDC and Food Safety, 2016).

En la Figura 7 se puede observar cómo se distribuye la cantidad de brotes por alimento durante los años 2009 y 2014. Como se observa en esta Figura los vegetales de hoja son frecuentemente implicados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. En un análisis basado en data obtenida de brotes durante los años de 1998 a 2012 se estima que estos son la mayor causa de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos (Ver Tabla 1).



**Figura 7.** Distribución de brotes asociados a tipos de alimentos desde el año 2009 a 2014 en los Estados Unidos (CDC and Food Safety, 2016).

**Tabla 1. Comparación del orden jerárquico y el porcentaje de enfermedades atribuidas a productos alimentarios al ajustar el algoritmo de atribución para tener en cuenta la variación entre el número de enfermedades relacionadas con brotes desde el año 1998 a 2008 en los Estados Unidos (Painter, et al., 2013).**

Enfermedades atribuidas como función de las enfermedades asociadas a brotes incluidas en el modelo										
	Todos los brotes y todas las enfermedades*		Brotes pequeños, 2-19 enfermedades por brote**		Brotes medianos, 10-100 enfermedades por brote***		Brotes grandes $\geq 20$ enfermedades por brote****		Todos los brotes, una enfermedad por brote*****	
	Rango	%	Rango	%	Rango	%	Rango	%	Rango	%
Vegetales de hoja	1	22.3	1	20.5	1	23.4	1	22.7	1	22.3
Lácteos	2	13.8	3	11.5	4	9.4	2	14.2	3	11.2
Frutas- Nueces	3	11.7	6	7.0	2	12.3	3	11.9	4	8.6
Aves de corral	4	9.8	2	14.4	3	11.1	4	9.1	2	13.3
Vid	5	7.9	9	5.3	8	6.2	5	8.1	10	4.9
Carne de vaca	6	6.6	4	8.3	5	7.2	7	6.0	5	8.5
Huevos	7	6.0	8	5.5	6	6.9	6	6.1	8	5.3
Cerdo	8	5.4	7	6.6	7	6.7	8	5.5	7	6.3
Granos-Frijoles	9	4.5	5	7.9	9	4.7	11	3.6	6	6.6
Vegetales de raíz	10	3.6	11	3.2	10	4.5	10	3.6	11	3.4
Moluscos	11	3.0	10	3.5	13	1.3	13	1.9	9	4.0
Pescado	12	2.7	12	2.3	12	1.9	12	2.5	12	2.5
Indeterminado	13	1.1	13	1.8	11	2.4	9	3.7	13	1.1
Aceites -Azúcares	14	0.7	14	0.8	14	0.9	14	0.6	15	0.7
Crustáceos	15	0.5	15	0.7	15	0.6	16	0.4	14	0.7
Brotes	16	0.3	17	0.2	16	0.5	15	0.4	16	0.3
Animales de caza	17	0.1	16	0.5	17	0.1	17	0.0	17	0.3
Hongos	18	0.1	18	0.2	18	0.0	18	0.0	18	0.1

\*4,589 brotes; 120,321 enfermedades  
\*\*3,126 brotes; 21,701 enfermedades  
\*\*\*2,244 brotes; 80,368 enfermedades  
\*\*\*\*1,463 brotes; 98,620 enfermedades  
\*\*\*\*\*4,589 brotes

En un análisis de data relacionada a vegetales de hoja reportada por el CDC durante los años 1973 y 2012, se encontró que 606 brotes habían sido asociados a estos. Estos datos fueron reportados por 44 estados de los Estados Unidos, y Puerto Rico. De los 272 (69%) brotes, a los cuales se les pudo confirmar la etiología del microorganismo, el agente más común fue norovirus, seguido por STEC y *Salmonella* spp. (Ver Tabla 2). Los serogrupos de STEC que causaron brotes fueron O157 (45 brotes), O145 (2 brotes) y O121 (1 brote) (Herman, et al., 2015).

**Tabla 2. Etiología de los microorganismos implicados en brotes, enfermedades, hospitalizaciones y muertes asociados a vegetales de hoja en los Estados Unidos desde el año 1973 a 2012 (Herman, et al., 2015).**

Etiología*	Brotes			Enfermedades			Hospitalizaciones		
	Etiología confirmada	Etiología sospechada	Total (%)	Etiología confirmada	Etiología sospechada	Total (%)	Etiología confirmada	Etiología sospechada	Total (%)
Norovirus	149	111	260 (66)	5780	2202	7982 (57)	58	26	84 (9)
<i>E. coli</i> , Productoras de la toxina de shiga	48	1	49 (12)	1627	7	1634 (12)	447	3	450 (46)
O157	45	1	46 (12)	1577	7	1584 (11)	427	3	430 (44)
O145	2	0	2 (1)	47	0	47 (0)	20	0	20 (2)
O121	1	0	1 (0)	3	0	3 (0)	0	0	0 (0)
<i>Salmonella</i>	29	3	32 (8)	1436	11	1447 (10)	82	1	83 (8)
Enteritidis	7	0	7 (2)	205	0	205 (1)	23	0	23 (2)
Typhimurium	6	0	6 (2)	318	0	318 (2)	14	0	14 (1)
Javiana	3	0	3 (1)	49	0	49 (0)	12	0	12 (1)
Newport	3	0	3 (1)	119	0	119 (1)	1	0	1 (0)
Heidelberg	2	0	2 (1)	43	0	43 (0)	4	0	4 (0)
Baeldon	1	0	1 (0)	264	0	264 (2)	12	0	12 (1)
Braenderup	1	0	1 (0)	19	0	19 (0)	0	0	0 (0)
Hartford	1	0	1 (0)	29	0	29 (0)	3	0	3 (0)
Infantis	1	0	1 (0)	35	0	35 (0)	0	0	0 (0)
Miami	1	0	1 (0)	9	0	9 (0)	3	0	3 (0)
Montevideo	1	0	1 (0)	320	0	320 (3)	8	0	8 (1)
Paratyphi B	1	0	1 (0)	10	0	10 (0)	0	0	0 (0)
Thompson	1	0	1 (0)	16	0	16 (0)	2	0	2 (0)
Unknown	0	3	3 (1)	0	11	11 (0)	0	1	1 (0)
Hepatitis A	14	0	14 (4)	1328	0	1328 (10)	218	0	218 (25)
<i>Shigella</i>	14	0	14 (4)	814	0	814 (6)	119	0	119 (16)
<i>Campylobacter</i>	8	2	10 (3)	378	22	400 (3)	8	0	8 (1)
<i>Staphylococcus</i>	0	3	3 (1)	0	58	58 (0)	0	0	0 (0)
Chemical or toxin**	3	0	3 (1)	51	0	51 (0)	9	0	9 (1)
<i>Cyclospora</i>	3	1	4 (1)	114	8	122 (1)	3	0	3 (0)
<i>Bacillus cereus</i>	1	2	3 (1)	8	18	26 (0)	0	0	0 (0)
<i>E. coli</i> , enterotoxigénica	0	1	1 (0)	0	76	76 (1)	0	1	1 (0)
<i>Cryptosporidium</i>	1	0	1 (0)	54	0	54 (0)	2	0	2 (0)
<i>Clostridium</i> perfringens	1	0	1 (0)	33	0	33 (0)	0	0	0 (0)
Sapovirus	1	0	1 (0)	21	0	21 (0)	1	0	1 (0)
Etiología conocida	272	124	396 (65)	11,644	2402	14,046 (70)	947	31	978 (95)
Múltiple	-	-	3 (0)	-	-	60 (0)	-	-	0 (0)
Desconocida	-	-	207 (34)	-	-	5897 (29)	-	-	52 (5)
<b>Total</b>	<b>272</b>	<b>124</b>	<b>606 (100)</b>	<b>11,644</b>	<b>2402</b>	<b>20,003 (100)</b>	<b>947</b>	<b>31</b>	<b>1,030 (100)</b>

\* Las guías clínicas y de laboratorio para confirmar la etiología de un brote de una enfermedad transmitida por los alimentos son específicas para cada agente bacteriano, químico / toxina, parasitario y viral. Las etiologías sospechosas son aquellas que no cumplen con las guías de confirmación (disponibles en [http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/confirming\\_diagnosis.html](http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/confirming_diagnosis.html)).

\*\* Jimson weed (un brote, seis enfermedades), methomyl (un brote, 31 enfermedades), aldicarb (un brote, 14 enfermedades).

En datos más recientes reportados por el CDC, asociados a vegetales de hoja y serogrupos de STEC, se encontró que para octubre del año 2013 se reportó un brote asociado a ensaladas listas para consumo bajo la marca “Field Fresh Chopped Salad with Grilled Chicken” and “Mexicali Salad with Chili Lime Chicken” producidas por la empresa “Glass Onion

Catering” en California y ventas en las localidades “Trader Joe’s grocery store”. El microorganismo implicado en este brote fue *E. coli* O157:H7. Se reportaron un total de 33 personas infectadas en 4 estados de los Estados Unidos. El 32% de las personas infectadas fueron hospitalizadas, 2 desarrollaron el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y no se reportaron muertes (CDC, 2013). En octubre 18 y noviembre 12 del año 2012 se reportó un brote asociado a espinacas orgánicas y “spring mix blend” pre- empacadas y producidas por “State Garden” en Chelsea, Massachusetts. Se reportaron 33 personas infectadas en 5 estados de los Estados Unidos, de las cuales 13 fueron hospitalizadas, 2 desarrollaron el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y no se reportaron muertes. El microorganismo identificado como causante del mismo fue *E. coli* O157:H7 (CDC, 2012). Entre octubre 9 y noviembre 7 del año 2011 se reportó un brote donde 58 personas de 9 estados de los Estados Unidos fueron infectadas con *E. coli* O157:H7 luego de consumir lechuga romana. Los datos muestran que 33 personas fueron hospitalizadas, 3 desarrollaron el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y no se reportaron muertes. El producto era servido por 9 tiendas de la cadena de tiendas de comestibles “Chain A” en su “salad bar”. El distribuidor de la lechuga romana de esta cadena era una facilidad procesadora de lechuga operada por un distribuidor independiente, por lo que se infiere que las lechugas estaban contaminadas antes de llegar a la facilidad (CDC, 2011). En mayo 20 del 2010 se reportó un brote al CDC de un total de 26 personas y 7 casos probables en 5 estados de los Estados Unidos infectadas con *E. coli* O145 luego de consumir lechuga romana contaminada. Los datos reflejan que 12 personas fueron hospitalizadas, tres desarrollaron el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y no se reportaron muertes. La lechuga era distribuida por una sola facilidad procesadora (CDC, 2010). En octubre 6 de 2006 se reportó al CDC un brote asociado a espinacas frescas contaminadas con *E. coli* O157:H7. El brote afectó a 199 personas de 26 estados de los Estados Unidos. El 51% (102) de las personas fueron hospitalizadas, 16% (31) desarrolló el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y tres personas murieron. Las espinacas eran distribuidas por una compañía bajo diferentes marcas procesadas por “Natural Selection Foods” (CDC, 2006).

### **Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA, por sus siglas en inglés)**

La Ley FSMA fue firmada por el presidente Obama el 4 de enero de 2011, luego de haberse reportado incidentes relacionados a enfermedades por alimentos (Allende, et. al, 2017). La Ley promueve la implementación de varias normas como: La Norma de inocuidad de

productos agrícolas frescos, Controles preventivos para alimentos de consumo humano, Programas de verificación de proveedores extranjeros (FSVP, por sus siglas en inglés), Transporte higiénico de alimentos para consumo humano o animal, Adulteración intencionada de los alimentos, Controles preventivos para alimentos de consumo animal, Organismos de certificación/acreditación de auditores de terceras partes y el Programa de Importadores Calificados Voluntarios (VQIP, por sus siglas en inglés) (U.S. FDA, 2018a).

Esta Ley le da autoridad a la FDA de inspeccionar y asegurar su cumplimiento para que el suministro de alimentos en Estados Unidos sea seguro cambiando el enfoque de que, en vez de responder a la contaminación, más bien prevenirla (Allende, et. al, 2017). Esta Ley utiliza base científica para establecer unos estándares mínimos para el cultivo, recolección, embalaje y almacenamiento seguros de frutas y verduras cultivadas para consumo humano como parte de la Norma de Inocuidad de Productos Agrícolas Frescos. En la Norma se incluye una evaluación de riesgos del agua agrícola utilizada durante el cultivo, cosecha y pos-cosecha de frutas y vegetales, lo cual es relevante para la producción agrícola. En la producción agrícola la calidad de agua es un factor de riesgo clave para la inocuidad de productos agrícolas frescos. En la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos se define el agua agrícola como el agua que tiene contacto directo con el vegetal en cualquier paso de su producción y establece dos criterios microbiológicos para la calidad del agua dependiendo del uso del agua agrícola (Allende, et. al, 2017). Estos criterios están basados en la presencia de *Escherichia coli*, el cual puede indicar la presencia de contaminación fecal (FDA, 2018b).

Las fechas de cumplimiento para la calidad del agua agrícola establecen un período de 8 años (26 de enero de 2024) para granjas que tienen ventas entre 25,000 y 250,000 dólares, 7 años (26 de enero de 2023) para las que tienen ventas entre 250,000 y 500,000 dólares y un período de 6 años (26 de enero de 2022) para todas las demás a partir del 26 de enero de 2016 (FDA, 2018b; Kux, 2017). Las granjas que tienen ventas por debajo de los 25,000 dólares no les aplican. La Norma aplica tanto a productos domésticos como importados (Kux, 2015).

La Norma también contempla medidas o requerimientos basados en la presencia de animales domésticos y salvajes en la granja, el adiestramiento, salud e higiene de los empleados y el equipo, herramientas e instalaciones utilizadas en las granjas. La Norma requiere que los agricultores no cosechen productos que han sido contaminados por animales domésticos o

salvajes. También requiere que los empleados utilicen prácticas higiénicas como el lavado de manos, que estos notifiquen a sus supervisores si están enfermos y que los supervisores y empleados de campo tengan una combinación entre educación, adiestramiento y experiencia para llevar a cabo las tareas requeridas. Por último, las estructuras como los invernaderos, cámaras de germinación, baños y áreas de lavado de manos deben estar sanitizadas y en condiciones para evitar la contaminación del producto (U.S. FDA, 2018b).

La Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos aplica a productos como frutas y vegetales de consumo crudo. A productos que rara vez se consumen crudos, productos de consumo personal, consumidos en la granja o productos que no son mercancía agrícola no les aplica. Tampoco aplica a productos que se procesan comercialmente y reducen la presencia de microorganismos de importancia para la salud pública. En esta Norma se establecen procesos, prácticas y procedimientos que minimizan el riesgo de la presencia de peligros biológicos en los productos y provee seguridad de que el producto no ha sido adulterado con este tipo de peligros (Kux, 2015).

Esta Norma se estima que tenga un costo aproximado de 37 millones de dólares anuales, lo que representa aproximadamente 1,058 dólares anuales para cada granja. También podría reducir en un 60% el riesgo de contaminación o un 20% en las enfermedades relacionadas a productos frescos y 477 millones de dólares en los costos de enfermedades transmitidas por alimentos (Assar, s.f.).

### **Estándares mínimos para el cultivo, recolección, embalaje y almacenamiento seguros de frutas y verduras cultivadas para consumo humano**

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) estableció, efectivo el 26 de enero de 2016, los estándares para el cultivo, recolección, embalaje y almacenamiento seguros de frutas y verduras cultivadas para consumo humano, como parte de la implementación de La Ley de modernización de la inocuidad de los alimentos - Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos (FSMA – PSR, por sus siglas en inglés). En esta Norma se establecen los estándares mínimos basados en evidencia científica para el cultivo, recolección, embalaje y almacenamiento seguros de frutas y verduras cultivadas para consumo humano (U.S. FDA, 2018b). Estos estándares están fundamentados en las Buenas prácticas agrícolas (GAP's,

por sus siglas en inglés). La Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos se divide en diferentes partes que incluyen: estándares para el agua agrícola que se utiliza durante la producción y actividades pos cosecha; adiestramiento, higiene y salud de los trabajadores; enmiendas biológicas del suelo (composta y estiércol); animales domesticados y salvajes; y equipo, herramientas, facilidades y sanitización y producción de brotes (Institute for Food Safety, 2018). Los estándares establecidos en la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos están contemplados en el Título 21 del Código de regulaciones federales Parte 112 (21CFR Parte 112) (CFR, 2017a).

El Título 21 del Código de Regulaciones Federales, Sub-parte E (21CFR Parte 112), establece que toda el agua agrícola debe ser segura y de una calidad sanitaria adecuada para su uso. En esta parte se establecen los criterios microbiológicos dependiendo del uso del agua agrícola, las medidas a tomar cuando el agua no cumple con los requisitos microbiológicos, tratamiento del agua, la frecuencia de muestreo del agua, quién debe hacer el análisis de agua, las medidas a tomar para el agua utilizada para actividades de cosecha, pos-cosecha y empaque de productos agrícolas frescos y los registros que se deben mantener (CFR, 2017a).

Los criterios microbiológicos del agua agrícola se clasifican de acuerdo a su uso. El agua utilizada para irrigar brotes, agua que de alguna manera entre en contacto directo con el producto agrícola fresco durante o después de la cosecha (agua de lavado, agua de enfriamiento o agua para prevenir la deshidratación de los productos), agua que va a entrar en contacto con superficies de contacto con el alimento, agua para hacer hielo y agua utilizada para el lavado de manos no debe contener niveles detectables de *E. coli* en 100 mililitros de agua agrícola. Tampoco se debe utilizar agua superficial no tratada para los propósitos antes mencionados. En el agua de uso agrícola que se aplica directamente sobre el cultivo de productos (a excepción de los brotes) (CFR, 2017a), como los cultivos hidropónicos, se establece una media geométrica (GM, por sus siglas en inglés) de 126 UFC/100 mL de agua y una desviación estándar (STV, por sus siglas en inglés) de 410 UFC/100 mL de agua (CFR, 2017a). El valor de STV es el nivel de variabilidad que puede tener el agua cuando hay eventos como lluvia o crecida de río que pueden lavar los residuos en los ríos o canales (U.S. FDA, 2018b).

Si se determina o cree que el agua agrícola no es segura o de una calidad sanitaria y/o no cumple con los criterios microbiológicos establecidos, se debe discontinuar inmediatamente su

uso. Antes de que se vuelva a utilizar la fuente de agua y/o el sistema de distribución nuevamente se debe: 1) re inspeccionar el sistema de agua agrícola afectado, identificar las condiciones que puedan causar que se introduzcan peligros en el alimento o superficies de contacto con el alimento, hacer los cambios necesarios y tomar las medidas adecuadas para determinar si los cambios fueron efectivos y aplicados de la manera adecuada para cumplir con los criterios microbiológicos establecidos en la sección 21CFR Parte 112.44 y 2) tratar el agua de acuerdo a los requerimientos de la sección 21CFR Parte 112.43 (CFR, 2017a).

La Norma también establece que si se determina o cree que el agua agrícola no es segura o de una calidad sanitaria y/o no cumple con los criterios microbiológicos establecidos, tan pronto sea práctico se debe discontinuar su uso, pero no más tardar del próximo año a menos que: 1) se aplique un intervalo de tiempo, no mayor de cuatro días, entre la última irrigación y la cosecha, para que los microorganismos potencialmente peligrosos mueran en el campo y 2) se aplique un intervalo de tiempo, no mayor de cuatro días, para que los microorganismos potencialmente peligrosos mueran entre la cosecha y el final del almacenamiento, o para eliminarlos durante las actividades comerciales, tales como el lavado, para alcanzar los criterios microbiológicos adecuados (CFR, 2017a).

Para el tratamiento del agua se establece que cualquier método utilizado debe ser efectivo de tal manera que el agua cumpla con los criterios microbiológicos establecidos en la sección 21CFR Parte 112.44. Algunos tratamientos pueden incluir tratamiento físico, pesticidas antimicrobiales registrados por la EPA u otro método que sea efectivo. También establece que se debe monitorear el tratamiento del agua para asegurar que consistentemente cumple con los criterios microbiológicos establecidos para su calidad sanitaria en la sección 21CFR Parte 112.44 (CFR, 2017a).

La frecuencia de muestreo se basa en la fuente de donde se obtiene el agua. El agua que proviene de sistemas públicos de suministro de agua, según definido en el “Safe Drinking Water Act” (SDWA), y de los que se tenga resultado o certificado de cumplimiento, no requiere ser analizada. Tampoco se requiere que el agua sea analizada si se trata siguiendo los requisitos establecidos de la sección 21CFR Parte 112.43. A excepción de lo antes mencionado, al agua que está sujeta a los requisitos de la sección 21CFR Parte 112.44 se le debe crear un perfil de calidad del agua en términos microbiológicos. Al agua superficial no tratada se le debe tomar un mínimo

de 20 muestras en un periodo de dos años, pero no mayor de 4 años. A el agua subterránea no tratada se le debe tomar un mínimo de cuatro muestras durante la temporada de cultivo o durante un periodo de un año. Luego de crear el perfil microbiológico, este debe ser actualizado anualmente tomando cinco muestras para agua superficial no tratada y una muestra para el agua subterránea no tratada. Las muestras deben ser representativas del uso del agua y deben ser tomadas lo más cercano al momento de cosecha. El perfil debe ser actualizado anualmente o cuando haya razón para creer que el perfil ya no es representativo de la calidad del agua en términos microbiológicos (CFR, 2017a).

La fuente o fuentes de agua pueden ser analizadas por el dueño de la granja, una persona o entidad en su representación o un tercero que colecte la data obtenida del análisis del agua agrícola. Las muestras deben ser colectadas asépticamente y siguiendo los procedimientos de la sección 21CFR Parte 112.49 (CFR, 2017a).

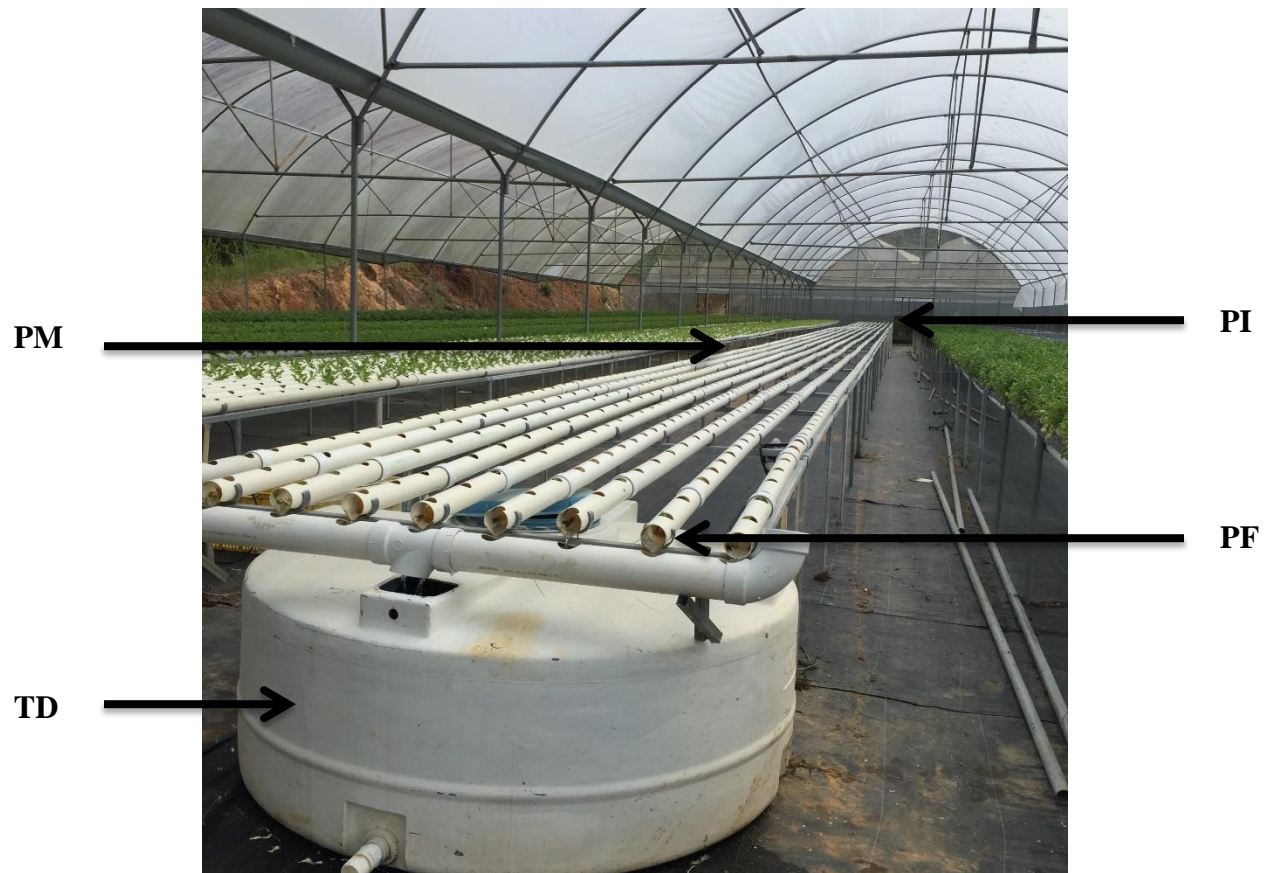
Las medidas a tomar para el agua utilizada en actividades de cosecha, pos-cosecha y empaque de productos agrícolas frescos incluyen: 1) establecer un itinerario para cambiar el agua que se mantiene recirculando, 2) inspeccionar visualmente el agua utilizada en actividades como cosecha, empaque y almacenamiento de producto y 3) mantener y monitorear la temperatura del agua para prevenir la infiltración de microorganismos en productos agrícolas frescos (CFR, 2017a).

El mantenimiento de registros es otro requisito para evidenciar el cumplimiento del agua agrícola con los estándares microbiológicos. Se deben mantener registros de los resultados de inspección de los sistemas de agua, resultados de análisis de muestras de agua, métodos analíticos utilizados, documentación del monitoreo del agua tratada y documentación anual de resultados o certificados de cumplimiento para el agua proveniente de sistemas públicos, entre otros requisitos (CFR, 2017a).

## Materiales y Métodos

### Área de estudio general:

Se seleccionaron granjas que desarrollan cultivos de diferentes variedades de *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos. Las variedades de lechuga incluyen tropicana, mézclum y romana. Las granjas seleccionadas tienen un suministro de agua de pozo o agua potable. Se recolectaron muestras de agua del punto de origen del agua [pozo (P) o grifo (G)], tanque de almacenamiento (TA), tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) del sistema hidropónico (Figura 8).



**Figura 8.** Fotografía del área de muestreo donde se encuentran los puntos de muestreo: tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF).

### **Técnica de recogido de muestras:**

Se colectaron tres muestras de 100mL de agua de cada punto de muestreo utilizando botellas (Pyrex) de 250mL. Las muestras se transportaron a una temperatura de 4 a 5 ° C para luego ser analizadas en el laboratorio de microbiología ubicado en el edificio Ramírez de Arellano del Recinto Universitario de Mayagüez en un período entre 4 a 10 horas luego del muestreo.

### **Técnicas de análisis de laboratorio:**

Las muestras de agua fueron analizadas por el método de filtración por membrana de acuerdo al “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater published by the American Public Health Association” (Rice, et al., 2012). Las muestras para los puntos de muestreo del pozo (P), grifo (G) y tanque de almacenamiento (TA) fueron filtradas en volúmenes de 100mL. Para las muestras del tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) se filtró 1mL de cada muestra de 100mL tomada por punto de muestreo debido a la alta cantidad de carga microbiana. A las muestras de agua de 1mL se le añadió 20mL de agua peptonada al 1.5% para llevar a cabo la filtración. Los volúmenes de agua se filtraron utilizando un embudo de filtración colocado en un “MANIFOLD FILTER FUNNEL 6-PLACES” conectado a una línea de vacío. Cada embudo contenía una membrana de celulosa de 0.45 µm, la cual luego de ser filtrada el agua, se colocó en un plato petri de 9 × 50mm que contenía el medio de cultivo m-Endo Agar LES, que es selectivo y diferencial para la aislación de colonias de coliformes como *Escherichia coli*. Las placas petri se incubaron aeróbicamente de forma invertida a una temperatura de 35 ± 0.5°C durante 22 – 24 horas. Después se transfirieron un máximo de 10 colonias, color verde metálico, presuntivas de *E. coli* al medio m-FC Agar, el cual es selectivo y diferencial para la aislación de coliformes termo tolerantes, para su confirmación. Luego se transfirieron a MacConkey sorbitol (SMAC, por sus siglas en inglés) Agar para identificar la presencia de *E. coli* O157:H7. Las placas con el medio m-FC Agar se incubaron a 44.5 ± 0.2°C por 24 ± 2 horas de forma invertida. Las placas de MacConkey sorbitol Agar se incubaron a 35°C por 24 horas. Durante cada muestreo se filtraron tres muestras con agua peptonada como control.

**Conteo de colonias:**

Se utilizó un “*Quebec Colony Couter*” para contar las colonias de bacterias de forma rápida y precisa. Se contabilizó las colonias típicas de *E. coli* en el medio m-Endo Agar LES, las cuales presentaron un color verde con una superficie brillante metálica. Las colonias típicas de *E. coli* observadas en el medio m-FC Agar presentaron varios tonos de azul oscuro. Finalmente, las colonias contabilizadas en el medio de cultivo MacConkey sorbitol fueron rosas y transparentes o cremosas.

**Fórmula general:**

$$\frac{\text{colonias de coliformes contadas} \times 100}{\text{mL de muestra filtrada}} = \text{No. UFC}/100\text{mL}$$

**Análisis estadístico:**

Las muestras de agua de pozo se analizaron utilizando un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA) con arreglo de parcelas divididas. El bloque está representado por la granja, la parcela principal son los puntos de muestreo y la sub-parcela son los tiempos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un  $\alpha = 0.01$ , al número de colonias obtenido en cada uno de los puntos de muestreo analizados a diferentes tiempos para determinar las diferencias significativas para cada fuente de variación.

Las muestras de agua potable proveniente de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados fueron analizadas de manera independiente, ya que sólo se obtuvo una granja que utiliza este suministro. Se utilizó un DBCA con arreglo factorial de dos factores (puntos de muestreo, tiempo). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un  $\alpha = 0.01$ , al número de colonias obtenido en cada uno de los puntos de muestreo analizados a diferentes tiempos para determinar las diferencias significativas para cada fuente de variación. Estos datos son resultados preliminares, ya que no hay réplicas.

Los datos fueron transformados de la escala de unidades formadoras de colonias (UFC) a la escala logarítmica ( $\text{Log}_{10}$ ) para cumplir con el supuesto de homocedasticidad. También se realizó la prueba de Shapiro –Wilks para verificar el cumplimiento con el supuesto de Normalidad de los datos.

## Resultados y Discusión

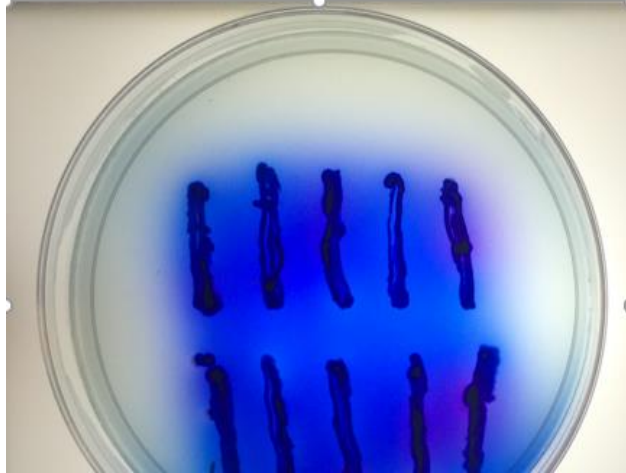
En esta discusión se pretende analizar la cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* contabilizadas en cuatro granjas que siembran *Latuca sativa L.* en hidropónicos. Además de esto se pretende establecer si las granjas están en cumplimiento con la Ley de modernización de la inocuidad de los alimentos - Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos, en donde se establece que el agua agrícola, no tratada, que se utilice para el cultivo de productos (a excepción de los brotes), como la lechuga (CFR, 2017a), debe cumplir con un límite de 126 UFC de colonias de *Escherichia coli* en 100 mL de agua ó 2.10 log UFC de *Escherichia coli* en 100mL de agua, con una desviación estándar de 410 UFC/100 mL de agua ó 2.61 log UFC/100mL de agua, para el 10% de las muestras analizadas (U.S. FDA, 2018b). Según la Organización mundial de la salud (OMS/WHO, por sus siglas en inglés), el microorganismo *E. coli* define la seguridad microbiana del agua para el consumo humano. La presencia de este microorganismo se considera evidencia de contaminación fecal y puede causar enfermedades severas o que comprometan la vida de las personas (Mojir, et al., 2016).

Las muestras de agua tomadas de los diferentes puntos de muestreo en cada una de las granjas fueron analizadas para la detección de colonias de *Escherichia coli*. Inicialmente el agua fue filtrada para detectar la presencia de colonias presuntivas de *E. coli* (color verde metálico) (Figura 9) en el medio de cultivo m-Endo Agar LES. Luego se seleccionaron colonias presuntivas de *E. coli* (un máximo de diez por punto de muestreo analizado) y se transfirieron al medio de cultivo m-FC agar para su confirmación. Las colonias aisladas crecieron en el medio de cultivo m-FC agar de color azul oscuro (Figura 10) a una temperatura de  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ , lo cual es típico de *E. coli* en este tipo de medio de cultivo debido a la fermentación de lactosa a esta temperatura (Schraft y Watterworth, 2005). *E. coli* es generalmente  $\beta$ - galactosidasa positivo, enzima que permite la hidrólisis de lactosa en sus monosacáridos: glucosa y galactosa (Tomohiko – Fujisawa, et al., 2000). Luego las colonias, ya aisladas en el medio m-FC agar se transfirieron al medio de cultivo MacConkey sorbitol para detectar la presencia de la cepa patogénica *E. coli* O157:H7. MacConkey sorbitol es un medio que se puede utilizar para la aislación de *E. coli* O157:H7 (Tomohiko – Fujisawa, et al., 2000). Las colonias aisladas que presentaron un color rosado (Figura 11) se clasifican como *E. coli* debido a la utilización del sorbitol para la producción de ácido. Las colonias del serotipo O157:H7 presentan un color

transparente (Figura 12) en este tipo de medio de cultivo, ya que estas no utilizan el sorbitol para la producción de ácido (Fujisawa, et al., 2002). Durante esta parte de la investigación se observaron colonias rosadas y otras colonias que eran de diversos tonos entre rosa y crema. Estas colonias fueron clasificadas como *Escherichia coli* en esta parte de la investigación. Luego, cuando participé de un internado en la estación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Beltsville, Maryland observé que las colonias de *Escherichia coli* O157:H7 podían presentar un color crema con un halo rosado. Al regresar de este internado decidí realizar un muestreo aleatorio en las granjas para verificar la presencia de *E. coli* O157:H7. Debido a conflictos de comunicación con los agricultores sólo se tomaron muestras de las granjas 1 y 3. Se aislaron 30 colonias de cada una de las granjas utilizando el mismo procedimiento utilizado en la primera parte del experimento. Inicialmente se filtraron las muestras de agua, se colocó la membrana en el medio de cultivo m-Endo Agar LES y se seleccionaron 30 colonias color verde metálico al azar, las cuales son presuntivas de *E. coli*. Luego se inocularon las colonias en el medio de cultivo m-FC agar para su confirmación. Después se realizó un estriado en placa utilizando el medio de cultivo MacConkey sorbitol para detectar la presencia de *E. coli* O157:H7.



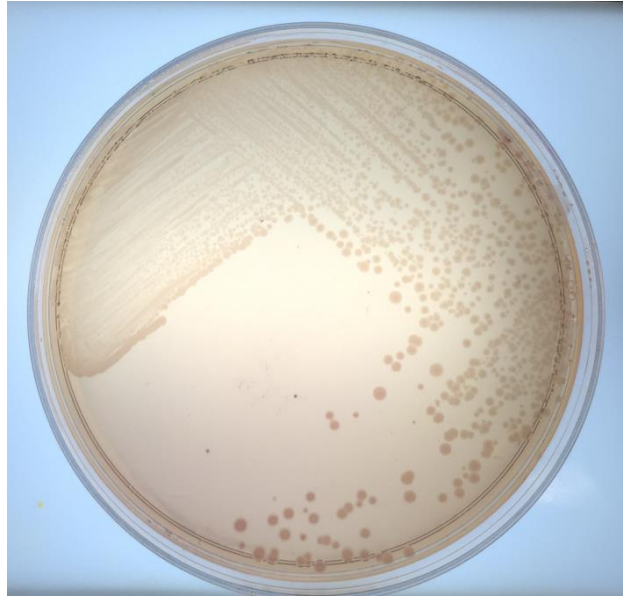
**Figura 9.** Foto de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (color verde metálico) en el medio de cultivo m-Endo Agar LES.



**Figura 10.** Foto de colonias de *Escherichia coli* en el medio de cultivo m-FC agar.



**Figura 11.** Foto de colonias de *Escherichia coli* en el medio de cultivo MacConkey sorbitol agar.



**Figura 12.** Foto de colonias de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728) en el medio de cultivo MacConkey sorbitol agar.

Existen muchos métodos para la identificación de cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* como “screening tests”, pruebas bioquímicas, métodos comerciales de identificación validados y métodos moleculares (Rice, et al., 2012). En esta investigación se utilizó el método de filtración por membrana y medios de cultivos como m-Endo Agar LES para la aislación de coliformes y m-FC para la confirmación de colonias de *E. coli*.

La técnica de filtración (MF, por sus siglas en inglés) por membrana es reproducible, se puede utilizar para muestras de grandes volúmenes y usualmente obtiene resultados más rápidos que la técnica de “multiple-tube fermentation”. Esta técnica es útil para monitorear agua potable y una variedad de agua natural. Según una comparación estadística se demostró que la técnica de filtración por membrana es más precisa que la de “multiple-tube fermentation” (Rice, et al., 2012). La técnica de filtración por membrana es recomendada en los métodos clasificados como equivalentes por la FDA, al igual que la técnica de número más probable (MPN, por sus siglas en inglés) para el muestreo de agua agrícola (U.S. FDA, 2017). El medio de cultivo m-Endo Agar LES también es recomendado para la aislación de coliformes por la FDA para el muestreo de agua agrícola (Stoeckel, et al., 2018).

El medio de cultivo m-Endo Agar LES es un medio recomendado para la enumeración de coliformes por filtración por membrana. Los coliformes son organismos indicadores utilizados para evaluar la efectividad de tratamientos de agua y desinfección y para monitorear aguas residuales y agua. Este medio es recomendado por la “American Public Health Association (APHA)” en el “Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater and Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” para la enumeración de coliformes en agua, aguas residuales y alimentos. *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* son coliformes que pueden crecer en este medio de cultivo y producen el mismo tipo de colonia (rosadas con brillo metálico) (Fisher Scientific, 2010).

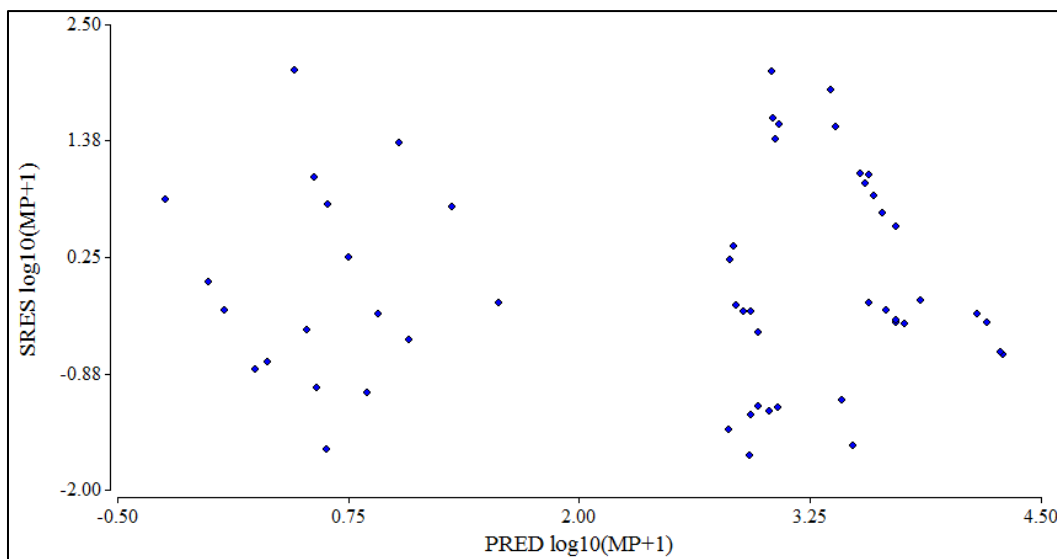
El medio de cultivo m-FC permite detectar coliformes termotolerantes, de los cuales el 95% de éstos son *Escherichia coli*, por lo que es prácticamente innecesario confirmar la presencia específica de *E. coli* (Bartram y Balance, 1996). Es por esto que se procedió a utilizar el medio de cultivo m-FC para determinar coliformes termotolerantes, donde *Escherichia coli* es el que más predomina (Park, et al., 2011) y *Enterobacter aerogenes* tiene un leve o ningún crecimiento (Hardy Diagnostics, s.f.). Luego de aislar y contabilizar las colonias presuntivas de *E. coli* en el medio de cultivo m-Endo Agar LES y transferirlas (un máximo de 10 colonias por punto de muestreo) al medio m-FC se observó que consistentemente las colonias verdes metálico (Figura 9) obtenidas en el medio de cultivo m-Endo Agar LES eran positivas en el medio m-FC (Figura 10).

En la Tabla 3 se presenta el análisis de varianza de la cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* aisladas en el medio de cultivo m-Endo Agar LES y de las cuales se seleccionó un máximo de 10 colonias por punto de muestreo y se confirmó que eran *E. coli* en el medio de cultivo m-FC. En esta tabla (Tabla 3) se analizan las diferentes fuentes de variación y las interacciones entre las fuentes de variación en las granjas que siembran *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo no tratada. El nivel de significancia o valor p es 0.01, donde cualquier valor menor a 0.01 es indicativo de que hay una diferencia significativa en la fuente de variación analizada. Para verificar la validez del análisis de varianza y que las conclusiones sean válidas, se verificó el supuesto de homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) y el supuesto de normalidad (prueba de Shapiro – Wilks). Según se observa en la Figura 13 no hay una estructura de embudo lo que nos permite establecer que hay

homogeneidad de varianzas. En la Tabla 4 se puede observar que el valor p es mayor que 0.01, lo que se interpreta como que los errores son normales.

**Tabla 3.** Análisis de varianza para las fuentes de variación (granja, puntos de muestreo, tiempo, y puntos de muestreo por tiempo) en las granjas (1, 2 y 3) que siembran *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un  $\alpha = 0.01$ .

Fuente de Variación	p - valor
Granja	0.2476
Puntos de muestreo	< 0.0001
Tiempo	0.0090
Puntos de muestreo*tiempo	0.9245



**Figura 13.** Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas (homocedasticidad).

**Tabla 4. Resultados de la prueba de Shapiro – Wilks para verificar el supuesto de Normalidad.**

Variable	n	Media	D.E.	W*	P (una cola)
RDUO Rendimiento	54	0.00	1.01	0.93	0.0190

Para la fuente de variación: granja, se observa un valor p de 0.2476 (Tabla 3), lo cual nos indica que no hay diferencia significativa entre la cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* contabilizadas en las tres granjas analizadas (1, 2 y 3). En la Tabla 5 se observa esta fuente de variación analizada detalladamente. En las granjas 1, 2 y 3, las colonias contabilizadas no son estadísticamente diferentes con promedios (medias) de 2.38 log UFC/100mL (Granja 1), 2.71 log UFC/100mL (Granja 2) y 2.29 log UFC/100mL (Granja 3). Para observar una diferencia significativa entre granjas, los promedios (medias) de colonias contabilizadas deben tener una diferencia entre éstos mayor al valor de DMS (diferencia mínima significativa) de 0.79. Basado en éstos resultados se puede establecer que las granjas no están en cumplimiento con los estándares microbiológicos establecidos en la Ley FSMA, ya que los promedios de colonias presuntivas de *Escherichia coli* están por encima del límite de 2.10 log UFC/100mL de agua. La cantidad de colonias en la granja 1 se excede por 0.28 log UFC/100mL, en la granja 2 se excede por 0.61 log UFC/100mL y en la granja 3 se excede por 0.19 log UFC/100mL. Esto sugiere que las medidas sanitarias en las tres granjas no son las mejores y que se deben establecer estrategias para disminuir o eliminar la presencia de colonias de *Escherichia coli* en el agua de cultivo. Algunas medidas que se pueden establecer son: esterilización por calor, inyección de ozono, exposición a radiación ultravioleta (UV-C), filtración por membrana, ultrasonido (US) o químicos como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio y dióxido de cloro (Benton-Jones,2012; Allende y Monaghan, 2015). Los agricultores también deben implementar y validar un programa de limpieza y sanitización en el sistema hidropónico [tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF)], ya que como se observa en la Tabla 6, éstos son los puntos donde las medias están por encima de los parámetros establecidos en la Ley FSMA. También este proceso se debe realizar previo al inicio de cada ciclo de cultivo, ya que como se observa en la Tabla 7 las medias de colonias son altas (2.75 log UFC/100mL) en el tiempo de 0 – 5 días. Se debe validar con la frecuencia que se debe limpiar y sanitizar el

sistema durante el ciclo para prevenir que los conteos de microorganismos se salgan de parámetros. Otra de las estrategias que se debe evaluar es cubrir las partes del sistema donde el agua se expone al ambiente. Por ejemplo, se debe cubrir el hueco del tanque de distribución para evitar la entrada de animales (lagartijos, aves, insectos), los cuales pueden ser portadores de microorganismos y heces que contaminan el sistema hidropónico. Otra de las medidas que se debe considerar es hacer modificaciones al sistema de tal forma que cada tubo que transporta el agua conecte con el tubo subsiguiente evitando la exposición del agua al ambiente.

**Tabla 5.** Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) contabilizadas en las granjas (1, 2 y 3) que siembran *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un  $\alpha = 0.01$ .

Granja	Medias	Diferencia	DMS
3	2.29	A	0.79
1	2.38	A	
2	2.71	A	

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

\*DMS – diferencia mínima significativa

**Tabla 6.** Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: pozo (P), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) para las granjas (1, 2 y 3) que siembran *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un  $\alpha = 0.01$ .

Punto de Muestreo	Medias	Diferencia	DMS
TA	0.55	A	1.11
P	0.71	A	
PF	3.35	B	
TD	3.39	B	
PM	3.39	B	
PI	3.40	B	

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

\*DMS – diferencia mínima significativa

**Tabla 7. Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) para el tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en las granjas (1, 2 y 3), que siembran *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua de pozo con un  $\alpha = 0.01$ .**

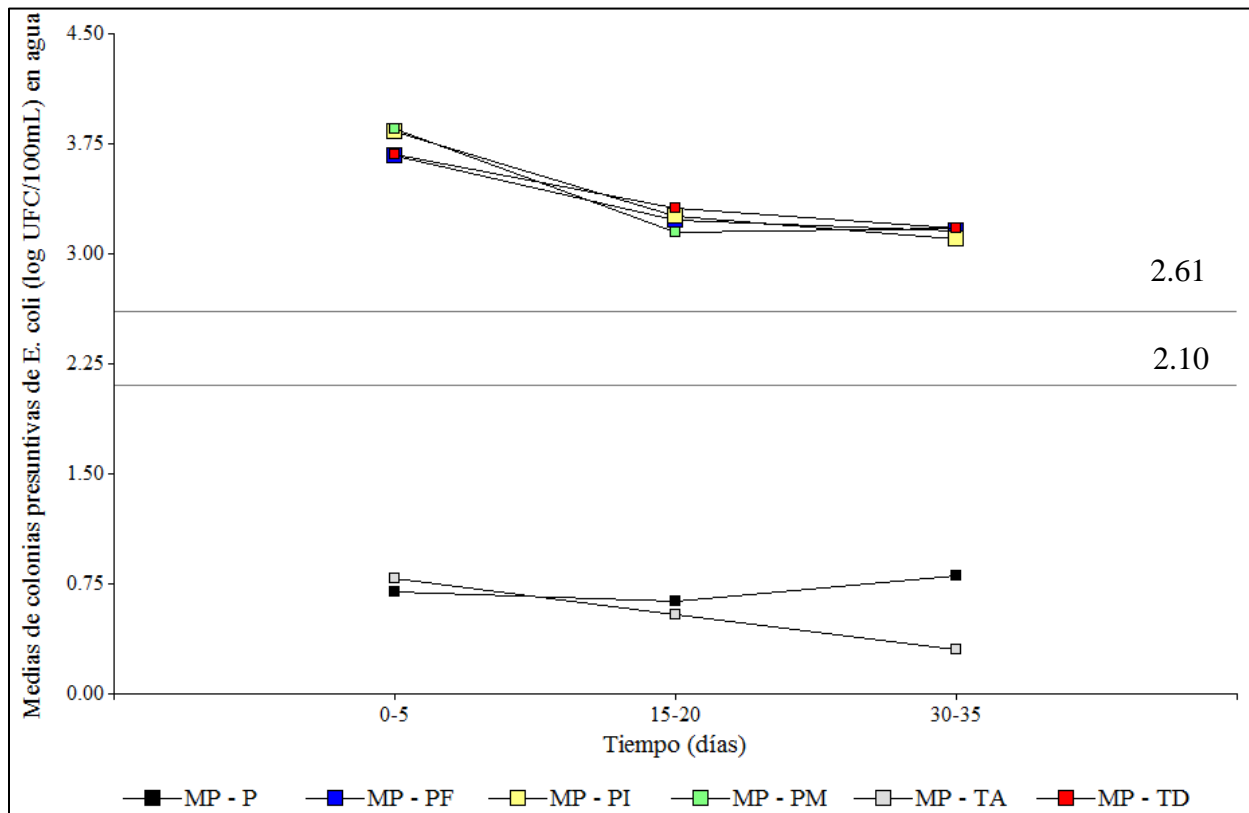
Tiempo (días)	Medias	Diferencia	DMS
0-5	2.75	B	0.41
15-20	2.35	A B	
30-35	2.29	A	

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

\*DMS – diferencia mínima significativa

Para la fuente de variación: puntos de muestreo (Tabla 3), se observa diferencia significativa en la cantidad de colonias presuntivas de *E. coli*, ya que el valor p es  $< 0.0001$ . Este dato es analizado ampliamente en la Tabla 6 donde se observa que para los puntos del pozo (P) y tanque de almacenamiento (TA), en las tres granjas analizadas, la cantidad de colonias no son estadísticamente diferentes, ya que tienen letras iguales (A). Para los puntos de muestreo tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) las granjas no son estadísticamente diferentes, ya que tienen letras iguales (B), según la Tabla 6. Para esta fuente de variación la diferencia mínima significativa (DMS) debe ser de 1.11 log UFC/100mL de agua. Debido al DMS los puntos de muestreo pozo (P) y tanque de almacenamiento (TA) son significativamente diferentes de los puntos de muestreo tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF). En ésta fuente de variación también se puede observar que las granjas 1, 2 y 3 para los puntos de muestreo: pozo (P) y tanque de almacenamiento (TA) están en cumplimiento con la Ley FSMA, ya que la cantidad de colonias contabilizadas (Ver Tabla 6) es menor a 2.10 log UFC/100mL de agua. En la Figura 14 se puede observar como las medidas promedio del pozo (P) y el tanque de almacenamiento (TA) tomadas en los diferentes tiempos durante el periodo de cultivo se encuentran por debajo del límite establecido por la Ley de FSMA de 2.10 log UFC/100mL de agua para el microorganismo *Escherichia coli*. Estos datos permiten establecer que los pozos utilizados en cada una de las granjas tienen una buena calidad de agua para el cultivo de *Latuca sativa L.*, ya que la cantidad de colonias de *E. coli* está por debajo del límite establecido en la Ley FSMA. Esta agua no puede ser utilizada para el lavado de manos durante y después de la cosecha, en superficies de contacto

con el alimento, como agua de contacto directo con el producto o como agua para hielo, ya que para estos propósitos según establecido en la Ley FSMA el límite es cero colonias de *E. coli*. (U.S. FDA, 2018b). Esta agua tampoco se puede utilizar para ingerir, ya que tiene conteos de *Escherichia coli* y para ser considerada agua potable el conteo debe ser cero (Eccles, et al., 2017). También se puede establecer que el almacenamiento del agua (TA) está siendo llevado a cabo de forma sanitaria, ya que los conteos de *E. coli* están por debajo de los límites establecidos por la Ley FSMA.



**Figura 14.** Representación gráfica de la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: pozo (MP-P), tanque de almacenamiento (MP-TA), tanque de distribución (MP-TD), punto inicial (MP-PI), punto me medio (MP-PM), y punto final (MP-PF), para las granjas 1, 2 y 3 a través del tiempo de siembra de *Latuca sativa L.* en un sistema hidropónico, cuyo suministro es agua de pozo.

Para los puntos de muestreo: tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) las granjas no están en cumplimiento con la Ley FSMA, ya que los valores (Ver [Tabla 6](#)) exceden el límite de 2.10 log UFC/100mL de agua. En la [Figura 14](#) se puede observar cómo la cantidad de colonias a través de los diferentes tiempos del cultivo

monitoreados, se mantienen por encima del límite de la Ley FSMA (2.10 log UFC/100mL de agua). Estos datos indican que el agua que se mantiene circulando a través del sistema no está siendo tratada para disminuir su carga microbiana. Se podría especular que animales tales como lagartijos, aves e insectos podrían ser portadores de microorganismos y contaminar el agua. Otra de las razones para la contaminación podría ser que las colonias que fueron detectadas en el agua del pozo y el tanque de almacenamiento una vez pasan al sistema, donde se mantienen circulando encuentran un ambiente adecuado para su proliferación. Cabe destacar que al agua se le añaden una serie de nutrientes como: N, K, P, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Cl, Co, B y S (Benton-Jones, 2012), los cuales junto al carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) que se encuentra en el ambiente sirven como nutrientes para los microorganismos, así como la planta. Las condiciones de pH también son óptimas para el desarrollo de microorganismos como *E. coli*, ya que la solución nutriente se mantiene a un pH entre 5.0 y 6.0. *E. coli* se puede replicar en un rango de pH entre 4.4 y 9.0, siendo entre 6.0 y 7.0 el pH óptimo, por lo que su crecimiento poblacional se puede dar en este tipo de ambientes (Todar, 2006).

Para el efecto de tiempo (Tabla 3) se observa diferencia significativa entre los tiempos de cultivo analizados, ya que se obtuvo un valor p de 0.0090. En la Tabla 7 se puede observar esta fuente de variación analizada más en detalle. Para el tiempo de 0-5 días se observa una cantidad de colonias significativamente diferente que para el tiempo de 30-35 días. El tiempo 0-5 días no es significativamente diferente del tiempo 15-20 días y el tiempo 15-20 días no es significativamente diferente del tiempo 30-35 días. Los promedios encontrados son de 2.75 log UFC/100mL de agua para 0-5 días, 2.35 log UFC/100mL de agua para 15-20 días y 2.29 para 30-35 días. La diferencia mínima significativa debe ser de 0.41 log UFC/100mL de agua para observar una diferencia entre los tres tiempos analizados. De acuerdo a estos resultados la mayor cantidad de colonias se encuentra al inicio (0-5 días) del periodo de cultivo de la lechuga. Esto puede ser indicativo de una pobre higiene del sistema hidropónico, plántulas de lechuga contaminadas previo a la siembra o un suministro de agua contaminado. Un suministro de agua contaminado (pozo y tanque de almacenamiento), un pH adecuado y una solución nutriente al inicio del cultivo proveen las condiciones ambientales adecuadas para el crecimiento poblacional de *E. coli*. Para el tiempo de 30-35 días se observa una reducción de colonias de *E. coli* (0.46 log UFC/100mL de agua) en el agua analizada con respecto a las medias obtenidas para el tiempo 0-

5 días. Esto podría ser indicativo de la disminución de nutrientes en el sistema hidropónico, cambios en temperatura, la adherencia de patógenos a las raíces y las hojas de la planta, así como a la internalización de estos patógenos. Es importante investigar las razones para la disminución de colonias de *E. coli* a través del tiempo. Aunque hay una reducción en la cantidad de *E. coli* para el tiempo 30-35 (Tabla 3), los conteos todavía exceden el límite establecido en la Ley FSMA. El Código de regulaciones federales establece que en caso de que el agua no cumpla con los requisitos microbiológicos se puede aplicar un intervalo de tiempo entre la última irrigación y el momento de la cosecha. Según la regulación los microorganismos pueden reducir 0.5 log por día. Este proceso no puede ser mayor a 4 días (CFR, 2017a). Este comportamiento puede ser una explicación a la disminución de microorganismos que ocurre a través del tiempo en el agua durante el estudio. Esto representa una preocupación, ya que, aunque el agua esté en cumplimiento, debido a este intervalo de tiempo establecido, esto no necesariamente quiere decir que los microorganismos que se puedan haber internado en el producto o adherido a la raíz o cualquier otra parte de la planta también han muerto. Se deben hacer más investigaciones que relacionen la mortandad de microorganismos en el agua vs. la mortandad de microorganismos en la planta. También se debe verificar la incidencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 en las hojas y raíces de la planta. Estudios han evidenciado que patógenos como *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir hasta 20 días en la superficie de la planta (Solomon, et al., 2002).

Para la interacción entre los de puntos de muestreo con el tiempo, no se observa diferencia significativa, ya que el valor p es de 0.9245 (Tabla 3). Esto significa que cada punto de muestreo mantuvo un promedio de colonias similar a través del periodo de cultivo. En la Tabla 8 se puede observar más en detalle el análisis de ésta fuente de variación. Según los datos de la Tabla 8, los puntos de muestreo en el tiempo analizado que tengan letras iguales (A o B) no son estadísticamente diferentes. Según se observa en la Tabla 8 para el tiempo 0-5 días los puntos de muestreo tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) no son diferentes a los mismos puntos para los tiempos 15-20 y 30-35 días. Esto se puede explicar, ya que el agua se mantiene en constante circulación entre el tanque de distribución (TD) y los puntos: inicio, medio y final del sistema, por lo que las bacterias se mantienen en constante circulación, manteniendo un promedio de colonias similar a través del sistema. También en la Tabla 8 se observa que para los puntos del pozo (P) y tanque de

almacenamiento (TA) la cantidad de colonias de *E. coli* se mantiene igual para los diferentes tiempos analizados. Este dato sugiere que los pozos y los tanques de almacenamiento no son la causa de la contaminación del sistema hidropónico y no están siendo contaminados. Estos puntos mantienen una calidad sanitaria adecuada.

**Tabla 8.** Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) de la interacción entre puntos de muestreo: pozo (P), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) por tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en las granjas que siembran *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos (1, 2 y 3) y cuyo suministro es agua de pozo con un  $\alpha = 0.01$ .

Punto de Muestreo	Tiempo (días)	Medias	Diferencia	DMS
TA	30-35	0.30	A	1.02
TA	15-20	0.54	A	
P	15-20	0.63	A	
P	0-5	0.69	A	
TA	0-5	0.79	A	
P	30-35	0.80	A	
PI	30-35	3.10	B	
PM	15-20	3.14	B	
PF	30-35	3.15	B	
PM	30-35	3.17	B	
TD	30-35	3.18	B	
PF	15-20	3.23	B	
PI	15.20	3.25	B	
TD	15-20	3.31	B	
PF	0-5	3.66	B	
TD	0-5	3.67	B	
PI	0-5	3.83	B	
PM	0-5	3.85	B	

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

\*DMS – diferencia mínima significativa

En la [Tabla 9](#) se presenta el análisis de varianza realizado al promedio de colonias presuntivas de *E. coli* contabilizadas en la granja 4, cuyo suministro es agua potable de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados (AAA) de Puerto Rico. Se hizo el análisis para evaluar de manera preliminar el efecto de puntos de muestreo, tiempo y la interacción de puntos de muestreo por tiempo. Estos resultados son preliminares, debido a que no se encontraron más granjas con este suministro de agua. Aunque en el Código de regulaciones federales se establece que el agua que proviene de un suministro público y del cual se pueden obtener resultados que evidencien que el agua está en cumplimiento no deben ser analizadas (CFR, 2017a), para efectos de esta investigación el agua fue analizada. Esta decisión es debido a que el agua, aunque es proveniente de una fuente segura, luego es almacenada y utilizada en un sistema hidropónico donde el agua se mantiene recirculando y puede contaminarse. Los resultados obtenidos proveen evidencia científica sobre las medidas sanitarias para el almacenamiento del agua llevadas a cabo en la granja y sobre la calidad del agua mientras esta se mantiene recirculando en el sistema hidropónico.

**Tabla 9. Análisis de varianza para las fuentes de variación (puntos de muestreo, tiempo, y puntos de muestreo por tiempo) en la granja 4, que siembra *Latuca sativa L.* en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua potable con un  $\alpha = 0.01$ .**

Fuente de Variación	p - valor
Puntos de muestreo	< 0.0001
Tiempo	0.1665
Puntos de muestreo*tiempo	0.9950

En la [Tabla 9](#) se puede observar que hay efecto de puntos de muestreo ya que el valor p es < 0.0001. Este efecto se puede analizar mejor en la [Tabla 10](#). Según se observa los puntos de muestreo del grifo (G) y tanque de almacenamiento (TA) son significativamente diferentes de los puntos de muestreo: tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF). En la [Tabla 10](#) se puede observar que los puntos que tengan letras iguales (A ó B) no son significativamente diferentes. En la [Tabla 10](#) también se puede observar que los puntos de muestreo grifo (G) y tanque de almacenamiento (TA) tienen conteos de 0.00 log UFC/ 100mL de agua. Estos datos indican que el agua obtenida de los puntos de muestreo antes mencionados (G y TA) cumple con los estándares de calidad tanto para cultivo y otras actividades como el lavado

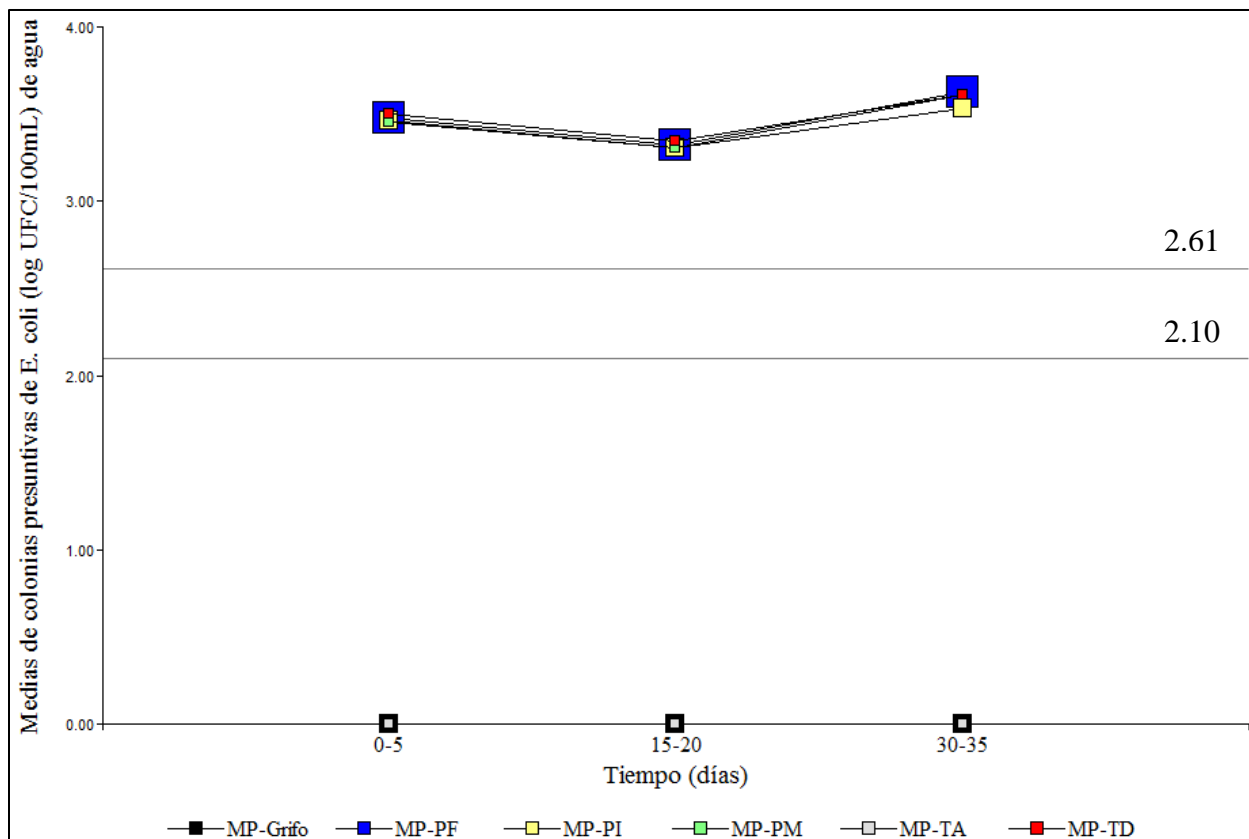
de manos durante y después de la cosecha, agua utilizada en superficies de contacto con el alimento, agua de contacto directo con el producto y agua para hielo (U.S. FDA, 2018b). Para los puntos de muestreo: tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) (Figura 15) se puede observar cómo los niveles detectados de *E. coli* exceden el límite de colonias establecido en la Ley FSMA (2.10 log UFC de *E. coli*/100mL de agua). Estos resultados sugieren que el agua que se mantiene circulando en el sistema hidropónico, aunque proviene de una fuente segura, debe ser tratada una vez es utilizada en el sistema hidropónico para reducir la carga microbiana y estar en cumplimiento con la Ley FSMA. Algunas medidas que se pueden establecer son: esterilización por calor, inyección de ozono, exposición a radiación ultravioleta (UV-C), filtración por membrana, ultrasonido (US) o químicos como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio y dióxido de cloro (Benton-Jones,2012; Allende y Monaghan, 2015). En la Figura 15 también se puede observar cómo los puntos del tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) exceden el límite establecido en la Ley FSMA a través del tiempo de cultivo.

**Tabla 10.** Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: grifo (G), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) para la granja 4 que siembra *Latuca sativa L.* en un sistema hidropónico y cuyo suministro es agua potable con un  $\alpha = 0.01$ .

Punto de Muestreo	Medias	Diferencia	DMS
Grifo	0.00	A	0.36
TA	0.00	A	
PI	3.43	B	
PM	3.46	B	
PF	3.47	B	
TD	3.49	B	

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

\*DMS – diferencia mínima significativa



**Figura 15.** Representación gráfica de la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) en los puntos de muestreo: grifo (G), tanque de almacenamiento (TA), tanque de distribución (TD) punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) para la granja 4 a través del tiempo de siembra de *Latuca sativa L.* en un sistema hidropónico, cuyo suministro de agua es agua potable.

Para el efecto tiempo se puede observar en la [Tabla 9](#) que no hay diferencia significativa debido a que el valor p es de 0.1665. Este efecto se puede analizar mejor en la [Tabla 11](#), ya que se observa que los tres tiempos analizados tienen letras iguales (A), lo cual indica que no hubo cambios significativos en la cantidad de colonias a través del tiempo de cultivo.

**Tabla 11.** Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) para el tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en la granja 4, que siembra *Latuca sativa L.* en un sistema hidropónico y cuyo suministro es agua potable con un  $\alpha = 0.01$ .

Tiempo (días)	Medias	Diferencia	DMS
15-20	2.21	A	0.26
0-5	2.32	A	
30-35	2.40	A	

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

\*DMS – diferencia mínima significativa

Para la interacción entre los de puntos de muestreo con el tiempo, no se observa diferencia significativa, ya que el valor p es de 0.9950 (Tabla 9). Esto significa que cada punto de muestreo mantuvo un promedio de colonias similar a través del periodo de cultivo. En la Tabla 12 se puede observar más en detalle el análisis de ésta fuente de variación. Según los datos de la Tabla 12, los puntos de muestreo en el tiempo analizado que tengan letras iguales (A o B) no son estadísticamente diferentes. Como se observa en la Tabla 12 para el tiempo 0-5 días los puntos de muestreo tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) no son diferentes a los mismos puntos para los tiempos 15-20 y 30-35 días. Esto se puede explicar, ya que el agua se mantiene en constante circulación entre el tanque de distribución (TD) y los puntos: inicio, medio y final del sistema, por lo que las bacterias se mantienen en constante circulación, manteniendo un promedio de colonias similar a través del sistema. También en la Tabla 12 se observa que para los puntos del grifo (G) y tanque de almacenamiento (TA) la cantidad de colonias de *E. coli* se mantiene igual para los diferentes tiempos analizados. Este dato sugiere que el grifo y tanque de almacenamiento no son la causa de la contaminación en el sistema hidropónico y no están siendo contaminados. Estos puntos mantienen una calidad sanitaria adecuada.

**Tabla 12.** Análisis de varianza para la cantidad promedio de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (log UFC/100mL de agua) de la interacción entre puntos de muestreo: grifo (G), tanque de almacenamiento (TA), punto final (PF), punto medio (PM), tanque de distribución (TD) y punto inicial (PI) por tiempo de cultivo (0-5, 15-20, 30-35 días) en la granja 4, que siembra *Latuca sativa* L. en sistemas hidropónicos y cuyo suministro es agua potable con un  $\alpha = 0.01$ .

Punto de Muestreo	Tiempo (días)	Medias	Diferencia	DMS
TA	0-5	0.00	A	0.63
Grifo	0-5	0.00	A	
TA	30-35	0.00	A	
TA	15-20	0.00	A	
Grifo	30-35	0.00	A	
Grifo	15-20	0.00	A	
PM	15-20	3.30	B	
PI	15-20	3.31	B	
PF	15-20	3.32	B	
TD	15-20	3.34	B	
PM	0-5	3.46	B	
PI	0-5	3.46	B	
PF	0-5	3.47	B	
TD	0-5	3.50	B	
PI	30-35	3.53	B	
PM	30-35	3.61	B	
TD	30-35	3.61	B	
PF	30-35	3.63	B	

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.01$ )

\*DMS – diferencia mínima significativa

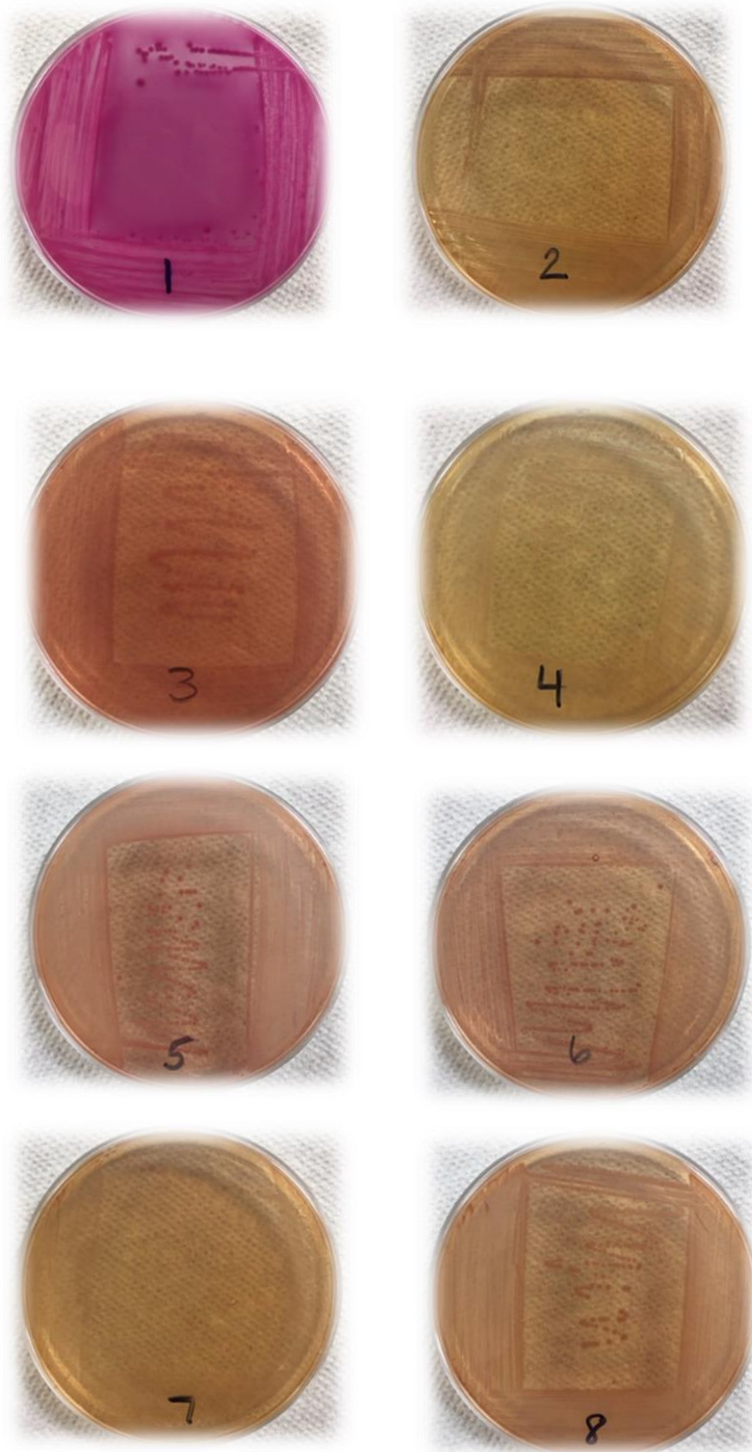
Los datos preliminares de la granja 4 en comparación con los resultados de las granjas cuyo suministro era agua de pozo (1, 2, 3) permiten establecer que el problema de contaminación está directamente relacionado con la circulación de la solución nutriente a través del sistema hidropónico sin llevar a cabo estrategias para tratar el agua. La utilización de cultivos

hidropónicos e invernaderos se asume que es más segura desde el punto de vista microbiológico en comparación con la producción en un sistema abierto, debido a que el agua de irrigación no entra en contacto con el alimento y también debido a la desinfección del agua de circulación. Sin embargo, antes de utilizar agua de poca calidad se deben hacer estudios sobre la contaminación de la raíz e internalización de patógenos. En cultivos hidropónicos que utilizan agua tratada con UV se ha observado conteos de *E. coli* spp. aceptables en las hojas cosechadas, aunque en las raíces los niveles eran altos (Allende y Monaghan, 2015).

La internalización de patógenos y la adherencia de microorganismos a las raíces y hojas es un riesgo que se presenta cuando las plantas son sembradas en suelos contaminados y a través de la difusión del agua por los tejidos de las plantas (Rossbach, et al., 2017). Debido a este riesgo es necesario establecer un control de los microorganismos presentes en el agua utilizada para el cultivo de *Latuca sativa* L. Como se observa en los resultados, la cantidad de colonias de *E. coli* encontradas excede los niveles establecidos por la Ley FSMA. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patogénicas, existen otras como la *E. coli* O157:H7 que sí lo son (Yamamoto, et al., 2017) y pueden causar enfermedades transmitidas por alimento (ETA).

En un muestreo subsiguiente aleatorio se aislaron 30 colonias representativas de *E. coli* de la granja 1 y 30 colonias de la granja 3 utilizando inicialmente el medio de cultivo m-Endo Agar LES y luego m-FC. Las colonias luego fueron transferidas al medio de cultivo MacConkey sorbitol para detectar la presencia de *E. coli* O157:H7, el cual es un serotipo patogénico de *E. coli*. Este medio de cultivo permitió identificar por color la posible presencia de este microorganismo en el agua utilizada para el cultivo de lechuga. Luego de este análisis se observó que algunas colonias no fermentaban el sorbitol, lo cual es una característica del serotipo *E. coli* O157:H7. Para la granja 3 se observó que el 23% de las 30 colonias aisladas no fermentaron el sorbitol, mientras que para la granja 1 sólo el 20% no fermentó.

En la Figura 16 se observan colonias aisladas de la granja 3, donde se sugiere la presencia de *E. coli* O157:H7. Las placas 2, 4 y 7 (Figura 16) sugieren la presencia de este microorganismo, ya que no se observa fermentación del sorbitol. En las placas 3, 5, 6 y 8 (Figura 16) se observa una fermentación leve del sorbitol. En la placa 1 (Figura 16) se observa una fermentación completa del sorbitol, lo cual sugiere que no es una colonia de *E. coli* O157:H7, si no de *E. coli*.

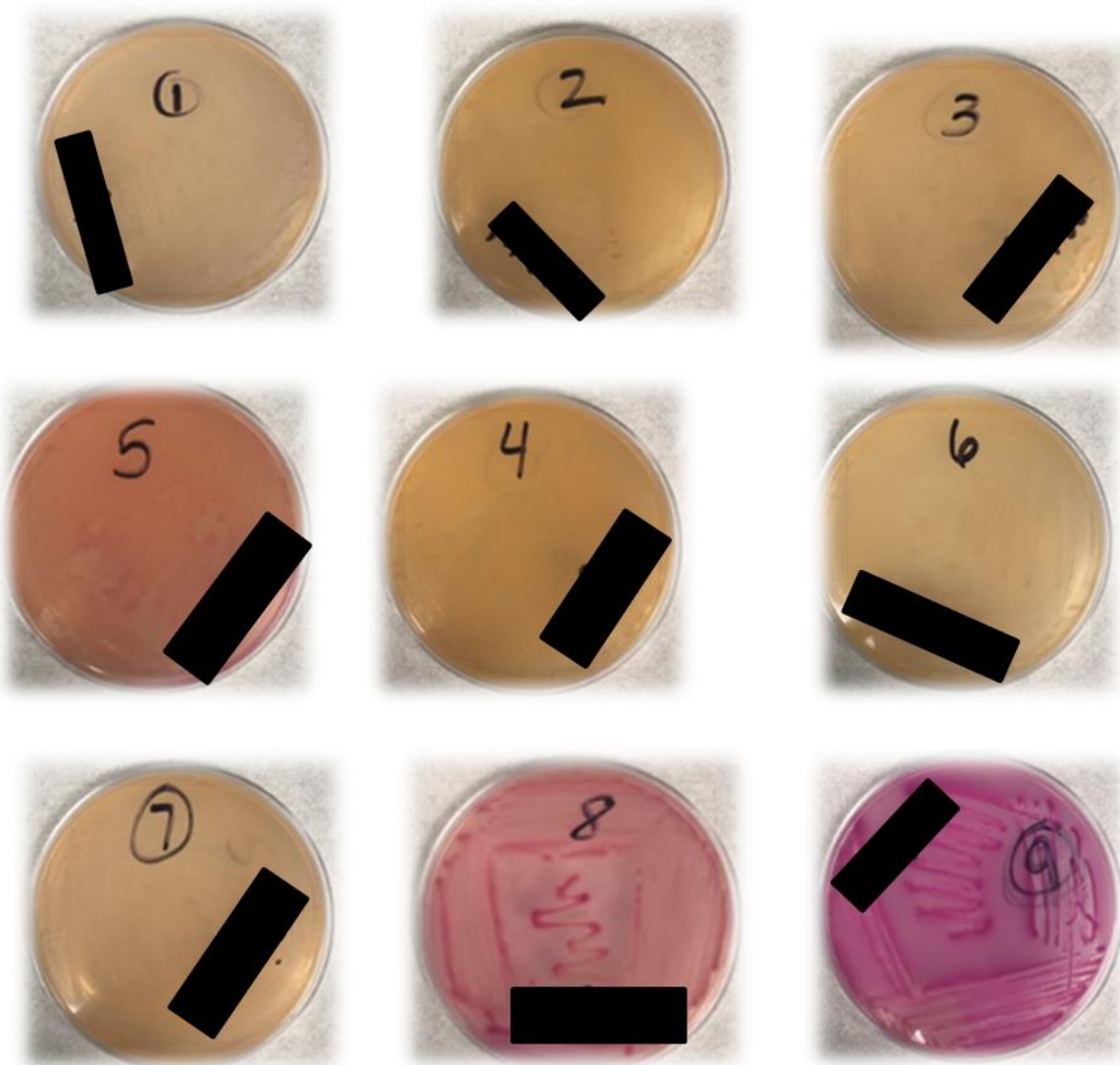


**Figura 16.** Colonias aisladas de la granja 3 en el medio de cultivo MacConkey sorbitol. Colonia de *E. coli* (Placa 1) y colonias presuntivas de *E. coli* O157:H7 (Placas 2, 3, 4, 5, 6, 7,8).

En la Figura 17 se observan colonias aisladas de la granja 1 en la cual también se sugiere la presencia de *E. coli* O157:H7. En las placas 1, 2, 3, 4, 6, y 7 (Figura 17) no se observa fermentación del sorbitol lo cual es característico de colonias *E. coli* O157:H7 en este tipo de medio de cultivo. Las placas 5 y 8 (Figura 17) presentan una fermentación parcial del sorbitol. La placa 9 (Figura 17) presenta una fermentación completa del sorbitol, lo cual sugiere que no es una colonia de *E. coli* O157:H7, si no de *E. coli*.

Casi todas las *E. coli* O157:H7 no fermentan el D-sorbitol o lo hacen parcialmente. El medio MacConkey sorbitol fue desarrollado para tomar ventaja de esta característica e identificar colonias de *E. coli* O157:H7. También se sugiere que luego de esta identificación las colonias positivas para *E. coli* O157:H7 sean analizadas utilizando la prueba de aglutinación látex. Las colonias positivas para *E. coli* O157:H7 deberían presentar aglutinación (CDC, 1994).

También se debe confirmar bioquímicamente que la colonia es de *E. coli*. Luego de estos análisis se puede someter un resultado preliminar que presume la presencia de *E. coli* O157:H7. Otros análisis a los que se puede someter el microorganismo incluyen la identificación del antígeno flagelar H7, producción de toxinas (*stx 1* y *stx 2*) y análisis para identificar la presencia de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Si la colonia es positiva para el antígeno no se requiere hacer la prueba de la toxina, ya que todas estas presentan las toxinas. Aislados que no sean motiles o que sean negativos para el antígeno flagelar H7 deben ser analizados para la producción de las toxinas. Para la prueba de  $\beta$ -glucuronidasa se debe utilizar un medio de cultivo que contenga 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG). En esta prueba las colonias de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O157 no mótil son MUG negativo, ya que carecen de la enzima. La utilización de la prueba de MUG, en conjunto con SMAC y aglutinación de látex son pruebas útiles para la detección de cepas toxígenas de O157 (CDC, 1994).



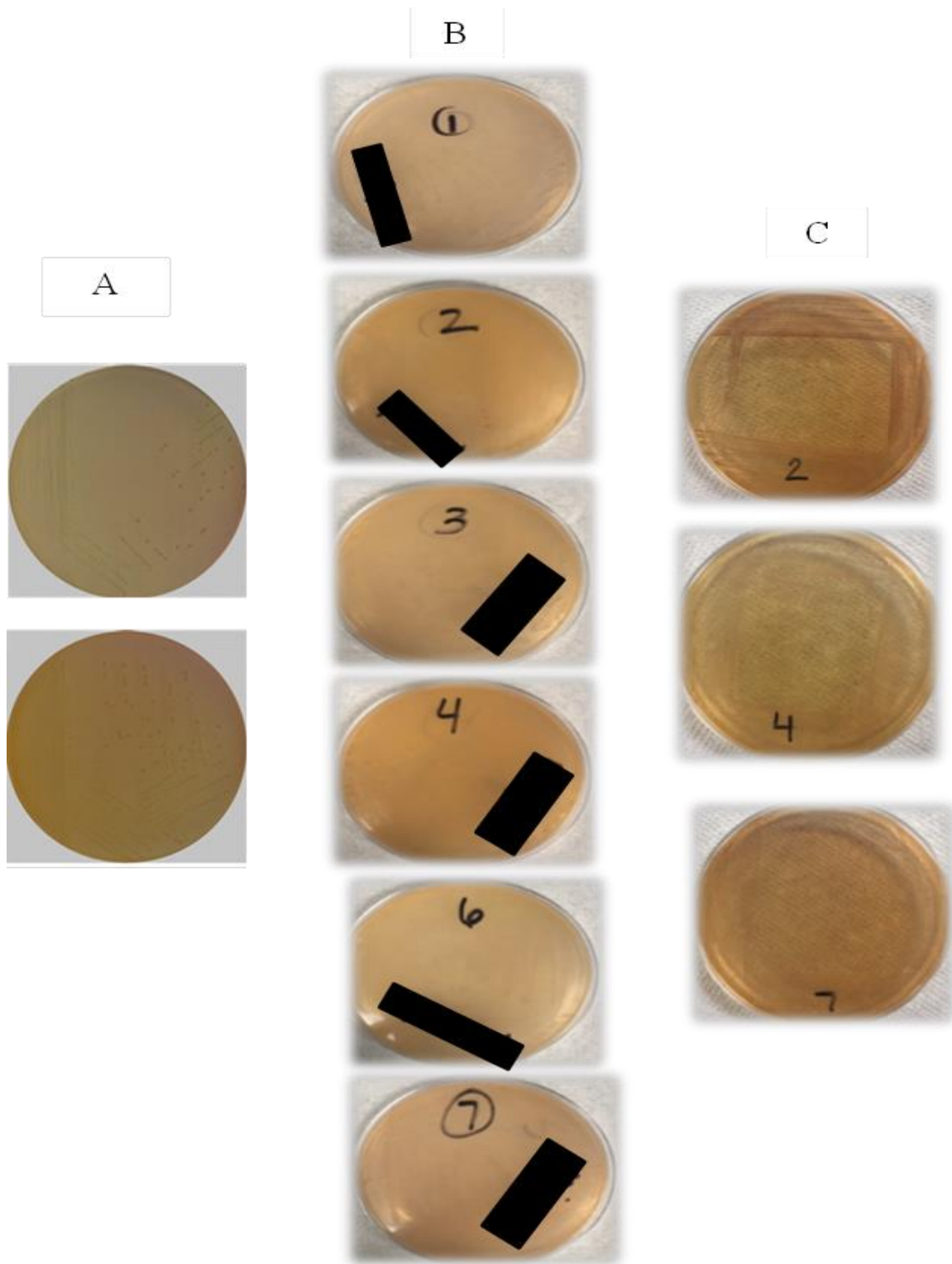
**Figura 17.** Colonias aisladas de la granja 1 en el medio de cultivo MacConkey sorbitol. Colonia de *E. coli* (Placa 9) y colonias presuntivas de *E. coli* O157:H7 (Placas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

En la [Figura 18](#), se puede observar una comparación de las colonias presuntivas de *E. coli* O157:H7 obtenidas en esta investigación y colonias de *E. coli* O157:H7 analizadas por Park, et al. (2011) utilizando el medio de cultivo MacConkey sorbitol. Esta comparación sugiere que las colonias obtenidas en estas granjas podrían ser *E. coli* O157:H7. Estos resultados son preliminares en la detección de *E. coli* O157:H7, ya que se requiere realizar otros análisis como

la prueba de aglutinación por látex, presencia de flagelo H7 o la utilización de técnicas moleculares para la detección de los genes *stx1* y *stx2*. Para estudios posteriores se sugiere que se lleve a cabo la detección de toxinas por métodos moleculares para confirmar la presencia de este patógeno en el agua del cultivo de lechugas. Ensayos de “Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR)” se han llevado a cabo para la detección de los genes asociados a *E. coli* O157:H7 como *stx 1* y *stx 2*, los cuales son responsables de producir la verotoxina 1 (VT1) y verotoxina 2 (VT2). Estos genes juegan un papel importante en el desarrollo del Síndrome urémico hemolítico (SHU), colitis hemorrágica (HC), fallo renal y la muerte a causa de estas enfermedades.

También este método se puede emplear para determinar otros factores de virulencia asociados a los siguientes genes: *eae A*, *hly A*, *espP*, *wzyO157*, *chu*, y *ehx*. La alta sensibilidad, especificidad y la rapidez de los métodos basados en la reacción de polimerasa en cadena (PCR) hacen este método atractivo para la detección de *E. coli* o *E. coli* O157:H7 en muestras de agua (Tanushree - Saxena, et al., 2015).

La posible presencia de *E. coli* O157:H7 en las muestras de agua analizadas representa una preocupación para la salud pública, ya que como se observa en la [Figura 19](#) el tipo de empaque de este alimento podría proporcionar las condiciones adecuadas para la contaminación del producto. Los patógenos que se encuentran adheridos a la raíz y en el agua podrían transportarse al alimento mediante las actividades de cosecha y empaque del producto. Es por esto que es importante confirmar la presencia de este patógeno en las muestras de agua analizadas. También se deben implementar estrategias para evitar el contacto del agua con la parte comestible de la lechuga. Algunas estrategias podrían ser adiestrar al personal para que eviten que el agua entre en contacto con el producto durante la cosecha y desarrollar un tipo de empaque que evite que el agua acumulada en la raíz pueda contaminar el alimento. *E. coli* O157:H7 es un patógeno, el cual ha sido responsable de brotes por el consumo de alimentos contaminados, causando enfermedades severas y la muerte (CDC, 2017c). La dosis infecciosa es menor de 1000 células, por lo que es necesario prevenir el riesgo de consumir alimentos que puedan estar contaminados con este microorganismo (Solomon, et al., 2002).



**Figura 18.** Comparación de colonias de *E. coli* O157:H7 en resultados obtenidos por Park, et al. (2011) en el medio de cultivo MacConkey sorbitol (1) y resultados obtenidos en esta investigación de colonias presuntivas de *E. coli* O157:H7 en el mismo medio de cultivo para la granja 1 (B) y granja 3 (C).



**Figura 19.** Fotografía de lechugas empacadas.

## Conclusión

Luego de realizar un análisis de varianza (ANOVA) a la cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* aisladas de las muestras del agua utilizada para el cultivo de *Lactuca sativa* L. en hidropónicos, cuyo suministro de agua es de pozo, se puede establecer que los puntos de muestreo; tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) no se encuentran en cumplimiento con los estándares microbiológicos de *E. coli* establecidos en la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos para el agua que se aplica directamente sobre el cultivo de productos (a excepción de los brotes). Para los puntos del pozo (P) y tanque de almacenamiento (TA), el agua se encuentra en cumplimiento y puede ser utilizada para el cultivo de productos (a excepción de los brotes), pero no puede ser utilizada en otras actividades de cosecha y pos cosecha. También se puede establecer que la cantidad de colonias de *E. coli* disminuye a través del tiempo de cultivo, ya que se obtuvieron medias de 2.75 log UFC/100mL de agua para 0-5 días de cultivo y 2.29 log UFC/100mL para 30-35 días del cultivo.

Los resultados preliminares para el agua agrícola, cuyo suministro era agua potable de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados (AAA) de Puerto Rico, sugieren que los puntos de muestreo: tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) no se encuentran en cumplimiento con los estándares establecidos en la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos, para el agua que se aplica directamente sobre el cultivo de productos (a excepción de los brotes). Para los puntos muestreados del grifo (G) y tanque de almacenamiento (TA) el agua se encuentra en cumplimiento con la Ley FSMA y puede ser utilizada para el cultivo de productos (a excepción de los brotes), para irrigar brotes, agua que de alguna manera entre en contacto directo con el producto agrícola fresco durante o después de la cosecha (agua de lavado, agua de enfriamiento o agua para prevenir la deshidratación de los productos), agua que va a entrar en contacto con superficies de contacto con el alimento, agua para hacer hielo y agua utilizada para el lavado de manos, ya que según los resultados obtenidos no se detectaron colonias de *E. coli*.

Los resultados preliminares del agua de cultivo proveniente de la AAA y los resultados del agua de cultivo proveniente del pozo, permiten establecer que la contaminación radica en el sistema hidropónico (TD, PI, PM, PF).

Según los resultados obtenidos se sugiere la presencia del patógeno *E. coli* O157:H7, en las granjas 1 y 3, debido a que se detectaron colonias presuntivas de este microorganismo en el medio de cultivo MacConkey sorbitol.

Por último, según los datos obtenidos, la utilización del método de filtración por membrana en conjunto con medios de cultivo como m-Endo Agar LES y m-FC son efectivos para la contabilización de coliformes fecales como *E. coli* en el agua de los cultivos hidropónicos. La utilización del medio de cultivo MacConkey sorbitol permite aislar colonias presuntivas de *E. coli* O157:H7, pero se requiere confirmar la presencia de este patógeno con métodos moleculares, ya que los resultados son inconsistentes con las colonias típicas en este tipo de medio de cultivo.

## Recomendaciones

- Se recomienda implementar y validar un programa de limpieza y sanitización del sistema hidropónico para eliminar microorganismos causantes de enfermedades.
- Se deben establecer medidas para tratar el agua de circulación en el sistema hidropónico como: esterilización por calor, inyección de ozono, exposición a radiación ultravioleta (UV-C), filtración por membrana, ultrasonido (US) o químicos como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio y dióxido de cloro para mantener los conteos microbiológicos según establecidos en la Norma de inocuidad de productos agrícolas frescos.
- Se recomienda hacer ciertos cambios en el sistema hidropónico para evitar que el agua esté expuesta al ambiente. Algunas estrategias podrían ser: tapar el hueco del tanque de distribución para evitar la entrada de animales y que los tubos conecten unos con otros de tal forma que se evite que el agua se exponga al ambiente.
- Se deben establecer estrategias para el cultivo y cosecha de las lechugas en hidropónicos que eviten que el agua entre en contacto con el alimento, debido a la posible presencia de microorganismos patógenos en el agua de cultivo. Por ejemplo, desarrollar un empaque que evite que el agua acumulada en la raíz contamine el alimento al momento de cosecha, cosechar la lechuga sin la raíz y modificar el sistema hidropónico para que la parte comestible de la lechuga no entre en ningún momento en contacto con el agua de cultivo. También se recomienda adiestrar al personal para que durante actividades de cosecha eviten que el agua de cultivo entre en contacto con el alimento.
- Se recomienda utilizar el método 9222 B recomendado por la FDA para la contabilización de *E. coli* en el agua analizada, ya que este método permite contabilizar con exactitud la cantidad de colonias de *E. coli* utilizando la técnica de filtración por membrana.
- Se recomienda hacer un conteo de los coliformes totales, fecales, *E. coli* y *E. coli* O157:H7, ya que, aunque en esta investigación se contabilizaron las colonias presuntivas de *E. coli*, se observó que había la presencia de otros coliformes y microorganismos no fermentadores de lactosa en el medio de cultivo m-Endo Agar LES.

- Se recomienda confirmar la presencia de *E. coli* O157:H7 utilizando el método de reacción de polimerasa en cadena (PCR) para confirmar o descartar la presencia de este patógeno en el agua utilizada para el cultivo de *Latuca sativa* L.

## Literatura Citada

Allende, A. and Monaghan, J. (2015). Irrigation Water Quality for Leafy Crops: A Perspective of Risks and Potential Solutions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 7457-7477.

Allende, A., Datta, A.R., Smith, W.A., Adonis, R., MacKay, A. and Adell, A.D. (2017). Implications of new legislation (US FSMA) and guidelines (EC) on the establishment of management systems for agricultural water: Review Article. *Food Microbiology*. DOI: 10.1016/j.fm.2017.10.002

Amani, J., Hatef, A., Rafati, S. and Latif, S. (2010). Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of Escherichia coli O157: H7. *Vaccine*, 28(42), 6923–6929.

Assar, S. (Sin fecha). *How Did FDA Establish Requirements for Water Quality and Testing of Irrigation Water?* [archivo PDF]. Recuperado de <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/FSMA/UCM473335.pdf>

Bartram, J. and Balance, R. (1996). Microbiological Analysis [archivo PDF]. Recuperado de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/wqmchap10.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/wqmchap10.pdf)

Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P. and Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*. 12 (9), 2385-2397.

Beuchat, L.R. (1999). Survival of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in Bovine Feces Applied to Lettuce and the Effectiveness of Chlorinated Water as a Disinfectant. *Journal of Food Protection*, 62 (8), 845-849.

Beuchat, L.R. (2006). Vectors and conditions for pre-harvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal*, 108(1), 38-53.

Benton-Jones, J. (2012). Plant Nutrition and Soil Fertility Manual, Second Edition. CRC Press. (pp.189-208).

Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K. and Albrecht, N. (2007). Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes. *Applied Environmental Microbiology*, 73(15), 4769-4775.

Bourquin, L.D. (2009). Good Agricultural Practices – Summary of Guidance on Irrigation Water Quality [archivo PDF]. Recuperado de <http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/155309.pdf>

CDC and Food Safety. (2016). [archivo PDF]. Recuperado de <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/cdc-and-food-safety.pdf>

Callejón, R.M., Rodríguez - Naranjo, M. I., Ubeda, C., Hornedo - Ortega, R., Garcia-Parrilla, M. and Troncoso, A. (2015). Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne pathogens and disease*. 12 (1). 32-8.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (1994). *E. coli* O157:H7: Procedure for Isolation and Identification from Stool Specimens. Recuperado de <https://wonder.cdc.gov/wonder/prevguid/p0000445/p0000445.asp>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2006). Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Fresh Spinach (FINAL UPDATE). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2010). Multistate Outbreak of Human *E. coli* O145 Infections Linked to Shredded Romaine Lettuce from a Single Processing Facility (FINAL UPDATE). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/2010/shredded-romaine-5-21-10.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2011). Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce (FINAL UPDATE). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/2011/romaine-lettuce-3-23-12.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2012). Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Organic Spinach and Spring Mix Blend (Final Update). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/2012/O157H7-11-12/index.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2013). Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ready-to-Eat Salads (Final Update). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2015). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2015: Annual Report

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2016). Agricultural water. Recuperado de <https://www.cdc.gov/healthywater/other/agricultural/index.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2016). Water contamination. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/healthywater/other/agricultural/contamination.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2017a). Foodborne Outbreaks. Recuperado de <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2017b). Multistate and Nationwide Foodborne Outbreak Investigations: A Step-by-Step Guide. Recuperado de <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/investigating-outbreaks/investigations/index.html>

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention (2017c). *E. coli* (*Escherichia coli*). Recuperado de <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>

[CFR] Code of Federal Regulations. (2017a). Title 21, Part 112. Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption. Recuperado de

<<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=112&showFR=1&subpartNode=21:2.0.1.1.12.5>>.

[CFR] Code of Federal Regulations. (2017b). Title 21, Part 112. Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption. Recuperado de <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=112.1>>.

[CFR] Code of Federal Regulations. (2017c). Title 21, Part 112. Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption. Recuperado de <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=112.2>>.

[CFR] Code of Federal Regulations. (2017d). Title 21, Part 112. Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption. Recuperado de <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=112.3>>.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. and Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880.

Deering, A. J., Mauer, L. J. and Pruitt, R. E. (2012a). Internalization of E. coli O157: H7 and Salmonella spp. in plants: A review. *FRIN*, 45(2), 567–575.

Deering, A. J., Pruitt, R. E., Mauer, L. J. and Reuhs, B. L. (2012b). Examination of the internalization of Salmonella serovar Typhimurium in peanut, *Arachis hypogaea*, using immunocytochemical techniques. *FRIN*, 45(2), 1037–1043.

Douëllou, T., Delannoy, S., Ganet, S., Fach, P., Loukiadis, E. and Montel, M. (2017). Molecular characterization of O157: H7, O26: H11 and O103: H2 Shiga toxin- producing Escherichia coli isolated from dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 253, 59–65.

Eccles, K. M., Checkley, S., Sjogren, D., Barkema, H. W. and Bertazzon, S. (2017). Lessons learned from the 2013 Calgary flood: Assessing risk of drinking water well contamination. *Applied Geography*, 80, 78–85.

Erickson M.C., Liao J., Payton A.S., Riley D.G., Webb C.C., Davey L.E., Kimbrel S., Ma L. and Zhang G., Flitcroft I. (2010a). Preharvest internalization of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce leaves, as affected by insect and physical damage. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1809–1816.

Erickson, M. C., Webb, C. C., Diaz-Perez, J. C., Phatak, S. C., Silvoy, J. J., Davey, L., Payton, A.S., Liao, J., Ma, L. and Doyle, M.P. (2010b). Surface and internalized *Escherichia coli* O157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection*, 73(6), 1023–1029.

Fisher Scientific. (2010). m ENDO AGAR LES [archivo PDF]. Recuperado de <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU453942.pdf>

Food Safety and Inspection Service. (1999). FSIS Policy on Non-Intact Raw Beef Products Contaminated with *E. coli* O157:H7. Recuperado de <https://www.fsis.usda.gov/Oa/background/O157policy.htm>

Fujisawa, T., Sata, S., Aikawa, K., Takahashi, T., Yamai, S. and Shimada, T. (2002). Evaluation of sorbitol-salicin MacConkey medium containing cefixime and tellurite (CT-SSMAC medium) for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from raw vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 161-163.

Gannon, V.P., Graham, T.A., Read, S., Ziebell, K., Muckel, A., Mori, J., Thomas, J., Selinger, B., Townshend, I. and Byrne, J. (2004). Bacterial pathogens in rural water supplies in Southern Alberta, Canada. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 67(20-22) 1643 - 1653.

Gemmell, M.E. and Schmidt, S. (2012). Microbiological assessment of river water used for the irrigation of fresh produce in a Sobantu, South Africa: *Food Research International*, 47(2), 300-305.

Gutiérrez-Rodríguez, E., Gundersen, A., Sbodio A.O. and Suslow, T.V. (2012). Variable agronomic practices, cultivar, strain source and initial contamination dose differentially affect survival of *Escherichia coli* on spinach. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 109-118.

Haley, B. J., Cole, D.J. and Lipp, E.K. (2009). Distribution, Diversity, and Seasonality of Waterborne Salmonellae in a Rural Watershed. *Applied Environmental Microbiology*, 75(5), 1248 - 1255.

Hardy Diagnostics. (s.f.). M-FC Agar with 1% Rosolic Acid. Recuperado de [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/mFCAgarwith1\\_RosolicAcid.html](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/mFCAgarwith1_RosolicAcid.html)

Hamad, S.H. (2012). Factors Affecting the Growth of Microorganisms in Food. *Progress in Food Preservation*. 405 – 427.

Herman, K.M., Hall, A. J. and Gould, L. H. (2015). Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973–2012. *Epidemiology and Infection*, 143(14), 3011–3021.

Hernández-Domínguez, C., Hernández-Anguiano, A. M., Cháidez-Quiroz, C., Rendón-Sánchez, G. and Suslow, T. (2008). Detection of Salmonella and Fecal Coliforms in Water for Agricultural use destined to melon “Cantaloupe”. *Agricultura Técnica en México*, 34, 75-84.

Institute for Food Safety at Cornell University. (2018). Produce Safety. Recuperado de <https://instituteforfoodsafety.cornell.edu/fsma/produce-safety>

Johnson, R. (2016). The U.S. Trade Situation for Fruit and Vegetable Products. [archivo PDF]. Recuperado de <https://fas.org/sgp/crs/misc/RL34468.pdf>

Kalchayanand, N., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Wells, J.E. and Wheeler, T.L. (2013). Chromogenic agar medium for detection and isolation of Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from fresh beef and cattle feces. *Journal of Food Protection*, 76(2), 192-199.

Khachatourians, G. C., Hui, Y. H., Scorza, R. and Nip, W. K. (Eds.). (2002). Transgenic plants and crops. CRC Press.

Kintz, E., Brainard, J., Hooper, L. and Hunter, P. (2017). International Journal of Hygiene and Transmission pathways for sporadic Shiga-toxin producing E. coli infections: A

systematic review and meta-analysis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(1), 57–67.

Kux, L. (2017). Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption. *Federal Register The Daily Journal of the United States Government*. Recuperado de

<https://www.federalregister.gov/documents/2017/09/13/201719434/standards-for-the-growing-harvesting-packing-and-holding-of-produce-for-human-consumption-extension>

Kux, L. (2015). Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption. *Federal Register The Daily Journal of the United States Government*. Recuperado de

<https://www.federalregister.gov/documents/2015/11/27/2015-28159/standards-for-the-growing-harvesting-packing-and-holding-of-produce-for-human-consumption>

Lucera, A., Costa, C., Conte, A. and Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3, 287.

Maupin, M.A., Kenny, J.F., Hutson, S.S., Lovelace, J.K., Barber, N.L. and Linsey, K.S. (2014). Estimated use of water in the United States in 2010 [archivo PDF]. Recuperado de <https://pubs.usgs.gov/circ/1405/pdf/circ1405.pdf>

Mojir, P., Jiang, K., Haghghat, G., Hassanpourfard, M., Etayash, H., Naicker, S. and Thundat, T. (2016). The detection of *Escherichia coli* (E. coli) with the pH sensitive hydrogel nanofiber-light addressable potentiometric sensor (NF-LAPS). *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 226, 176–183.

Mootian G., Wu, W.H. and Matthews, K.R. (2009). Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 from Soil, Water, and Manure Contaminated with Low Numbers of the Pathogen to Lettuce Plants. *Journal of Food Protection*, 72(11), 2308-2312.

Moyne, A.L, Harris, L.J. and Marco, M.L. (2013) Assessments of Total and Viable *Escherichia coli* O157:H7 on Field and Laboratory Grown Lettuce. PLOS ONE 8(7): e70643. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070643>

Olaimat, A.N. and Holley, R.A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32(1), 1-19.

Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J....Griffin, P. M. (2013). Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 407-415. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1903.111866>.

Park, S.-H., Ryu, S. and Kang, D.-H. (2011). Improved Selective and Differential Medium for Isolation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 405–408.

Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso J. and Ivanek, R. (2012). Risk Factors for Microbial Contamination in Fruits and Vegetables at the Preharvest Level: A Systematic Review. *Journal of Food Protection*, 75(11), 2055–2081.

Rice E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D. and Clesceri, L.S. editors (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (22ND ed.). Washington, D.C.: American Public Health Association.

Rosbach, J. D., Fink, R. C., Sadowsky, M. J., Tong, C. and Diez-gonzalez, F. (2017). Factors influencing the Salmonella internalization into seedpods and whole plants of *Arachis hypogaea* (L.). *Food Microbiology*, 66, 184–189.

Schraft, H. and Watterworth, L.A. (2005). Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M™ Petrifilm™ plates with standard plating procedures. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3), 335-342.

Solomon, E.B., Potenski, C.J. and Matthews, K.R. (2002). Effect of Irrigation Method on Transmission to and Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce. *Journal of Food Protection*, 6 (4), 673-676.

Steele, M. and Odumeru, J. (2004). Irrigation Water as Source of Foodborne Pathogens on Fruit and Vegetables. *Journal of Food Protection*, 6 (12), 2839–2849

Stoeckel D., Fisk C., Pahl D., Wall G., Woods K. and Bihn, E.A. (2018). The Water Analysis Method Requirement in the FSMA Produce Safety Rule [archivo PDF]. Recuperado de <https://producesafetyalliance.cornell.edu/sites/producesafetyalliance.cornell.edu/files/shared/documents/Water-Analysis-2017.pdf>

Takeuchi, K. and Frank, J.F. (2000). Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *Journal of Food Protection*, 63(4), 434–440.

Takeuchi, K., Hassan, A.N. and Frank, J.F. (2001). Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. *Journal of Food Protection*, 64(11), 1820–1823.

Tanushree - Saxena, T., Kaushik, P. and Mohan, M.K. (2015). Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82, 249–264.

Thorpe, C.M. (2004). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(9), 1298–1303.

Todar, K. (2006). “Online Textbook of Bacteriology”. University of Wisconsin, Department of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/>

Tomita, K. and Sawai, J. (2017). Preincubation of *Escherichia coli* ATCC 25922 with NaCl Increases Its Attachment to Lettuce Surfaces Compared with Other Chemicals. *Biocontrol Science*, 22(3), 137-143.

Tomohiko - Fujisawa, T., Sata, S., Aikawa, K., Takahashi, T., Yamai, S. and Shimada, T. (2000). Modification of Sorbitol MacConkey Medium Containing Cefixime and Tellurite for Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Radish Sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3117-3118.

U.S. Food & Drug Administration. (2017). Equivalent Testing Methodology for Agricultural Water. Recuperado de

<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm575251.htm>

U.S. Food & Drug Administration. (2018a). FDA Food Safety Modernization Act (FSMA).

Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/>

U.S. Food & Drug Administration. (2018b). FSMA Final Rule on Produce Safety.

Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm334114.htm>

United States Geological Survey (USGS). (2017). Total water use in the United States, 2010.

Recuperado de <https://water.usgs.gov/edu/wateruse-total.html>

Yamamoto, B. B., Luz, D., Abreu, P. A. E., Gotti, T. B., Vasconcellos, S. A., Piazza, R. M. F. and Horton, D. S. P. Q. (2017). Antibodies to Shiga toxins in Brazilian cattle. *Toxicon*, 133, 58–62.

## Apéndices

### Resultados Estadísticos

**Análisis de varianza para la cantidad de colonias presuntivas de *E. coli* contabilizadas en las granjas 1, 2 y 3 cuyo suministro era agua de pozo.**

#### Analysis of variance

Variable	N	R <sup>2</sup>	Adj R <sup>2</sup>	CV
log10(MP+1)	54	0.96	0.90	18.07

#### Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value	(Error)
Model.	101.58	29	3.50	17.70	<0.0001	
Granja	1.79	2	0.90	1.61	0.2476	(Granja*Puntos)
Puntos	91.12	5	18.22	32.75	<0.0001	(Granja*Puntos)
Granja*Puntos	5.56	10	0.56	2.81	0.0185	
Tiempo	2.29	2	1.14	5.78	0.0090	
Puntos*Tiempo	0.83	10	0.08	0.42	0.9245	
Error	4.75	24	0.20			
Total	106.33	53				

#### Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=0.78798

Error: 0.5564 df: 10

Granja	Means	n	S.E.	
C	2.29	18	0.18	A
A	2.38	18	0.18	A
B	2.71	18	0.18	A

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.01)

#### Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=1.11437

Error: 0.5564 df: 10

Puntos	Means	n	S.E.	
TA	0.55	9	0.25	A
P	0.71	9	0.25	A
PF	3.35	9	0.25	B
TD	3.39	9	0.25	B
PM	3.39	9	0.25	B
PI	3.40	9	0.25	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.01)

Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=1.01597

Error: 0.1979 df: 24

Granja	Puntos	Means	n	S.E.	
C	TA	0.00	3	0.26	A
B	TA	0.32	3	0.26	A B
B	P	0.54	3	0.26	A B
A	P	0.66	3	0.26	A B
C	P	0.93	3	0.26	A B
A	TA	1.32	3	0.26	B
A	PF	3.04	3	0.26	C
A	PM	3.06	3	0.26	C
A	TD	3.10	3	0.26	C
A	PI	3.11	3	0.26	C
C	TD	3.14	3	0.26	C
C	PF	3.17	3	0.26	C
C	PI	3.22	3	0.26	C
C	PM	3.30	3	0.26	C
B	PM	3.82	3	0.26	C
B	PF	3.83	3	0.26	C
B	PI	3.86	3	0.26	C
B	TD	3.92	3	0.26	C

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.01$ )

Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=0.41477

Error: 0.1979 df: 24

Tiempo	Means	n	S.E.	
30-35	2.29	18	0.10	A
15-20	2.35	18	0.10	A B
0-5	2.75	18	0.10	B

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.01$ )

Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=1.01597

Error: 0.1979 df: 24

Puntos	Tiempo	Means	n	S.E.	
TA	30-35	0.30	3	0.26	A
TA	15-20	0.54	3	0.26	A
P	15-20	0.63	3	0.26	A
P	0-5	0.69	3	0.26	A
TA	0-5	0.79	3	0.26	A
P	30-35	0.80	3	0.26	A
PI	30-35	3.10	3	0.26	B
PM	15-20	3.14	3	0.26	B
PF	30-35	3.15	3	0.26	B
PM	30-35	3.17	3	0.26	B
TD	30-35	3.18	3	0.26	B
PF	15-20	3.23	3	0.26	B
PI	15-20	3.25	3	0.26	B
TD	15-20	3.31	3	0.26	B
PF	0-5	3.66	3	0.26	B
TD	0-5	3.67	3	0.26	B
PI	0-5	3.83	3	0.26	B
PM	0-5	3.85	3	0.26	B

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.01$ )

**Análisis de varianza para la cantidad de colonias presuntivas de *E. coli* contabilizadas en la granja 4 cuyo suministro es agua potable de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados.**

Variable	N	R <sup>2</sup>	Adj R <sup>2</sup>	CV
MP	54	0.98	0.97	12.28

**Analysis of variance table (Partial SS)**

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	144.34	17	8.49	105.62	<0.0001
Punto de Muestreo	143.87	5	28.77	357.95	<0.0001
Tiempo	0.30	2	0.15	1.89	0.1665
Punto de Muestreo*Tiempo	0.16	10	0.02	0.20	0.9950
Error	2.89	36	0.08		
Total	147.23	53			

**Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=0.36347**

Error: 0.0804 df: 36

Punto de Muestreo	Means	n	S.E.
Grifo	0.00	9	0.09 A
TA	0.00	9	0.09 A
PI	3.43	9	0.09 B
PM	3.46	9	0.09 B
PF	3.47	9	0.09 B
TD	3.49	9	0.09 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.01)

**Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=0.25701**

Error: 0.0804 df: 36

Tiempo	Means	n	S.E.
15-20	2.21	18	0.07 A
0-5	2.32	18	0.07 A
30-35	2.40	18	0.07 A

Means with a common letter are not significantly different (p > 0.01)

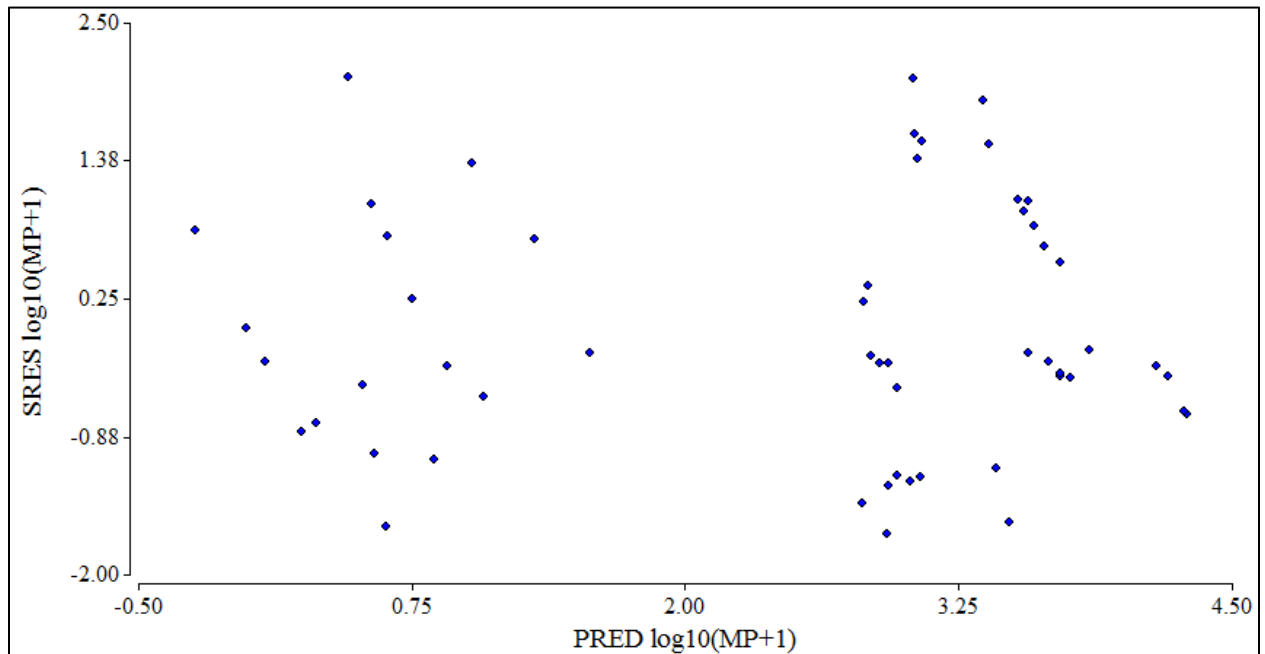
Test:Fisher LSD Alpha:=0.01 LSD:=0.62955

Error: 0.0804 df: 36

Punto de Muestreo	Tiempo	Means	n	S.E.	
TA	0-5	0.00	3	0.16	A
Grifo	0-5	0.00	3	0.16	A
TA	30-35	0.00	3	0.16	A
TA	15-20	0.00	3	0.16	A
Grifo	30-35	0.00	3	0.16	A
Grifo	15-20	0.00	3	0.16	A
PM	15-20	3.30	3	0.16	B
PI	15-20	3.31	3	0.16	B
PF	15-20	3.32	3	0.16	B
TD	15-20	3.34	3	0.16	B
PM	0-5	3.46	3	0.16	B
PI	0-5	3.46	3	0.16	B
PF	0-5	3.47	3	0.16	B
TD	0-5	3.50	3	0.16	B
PI	30-35	3.53	3	0.16	B
PM	30-35	3.61	3	0.16	B
TD	30-35	3.61	3	0.16	B
PF	30-35	3.63	3	0.16	B

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.01$ )

### Prueba para el supuesto de homocedasticidad



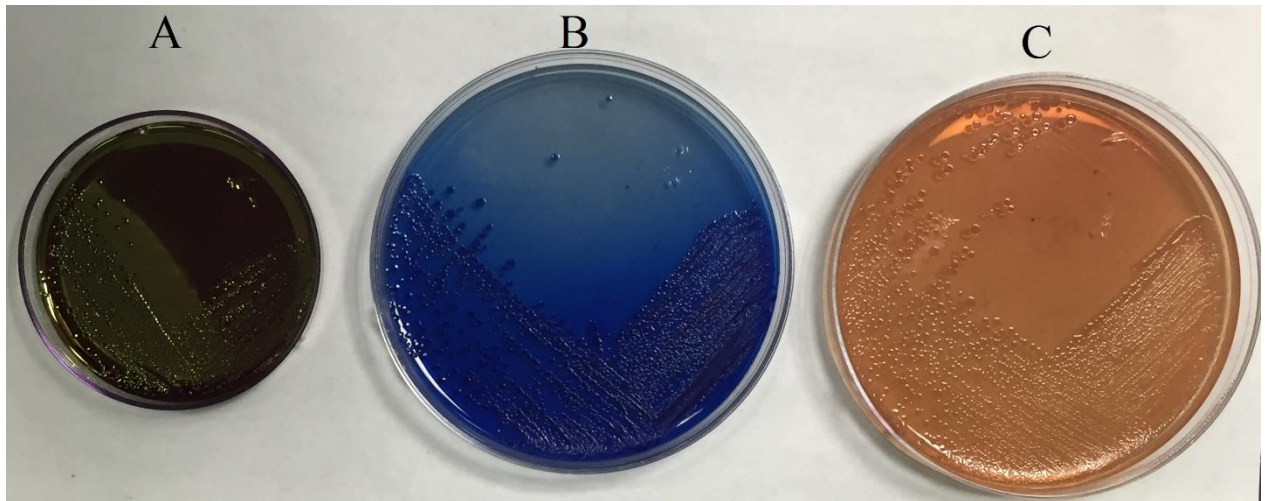
## Prueba para el supuesto de Normalidad

Shapiro-Wilks (modified)

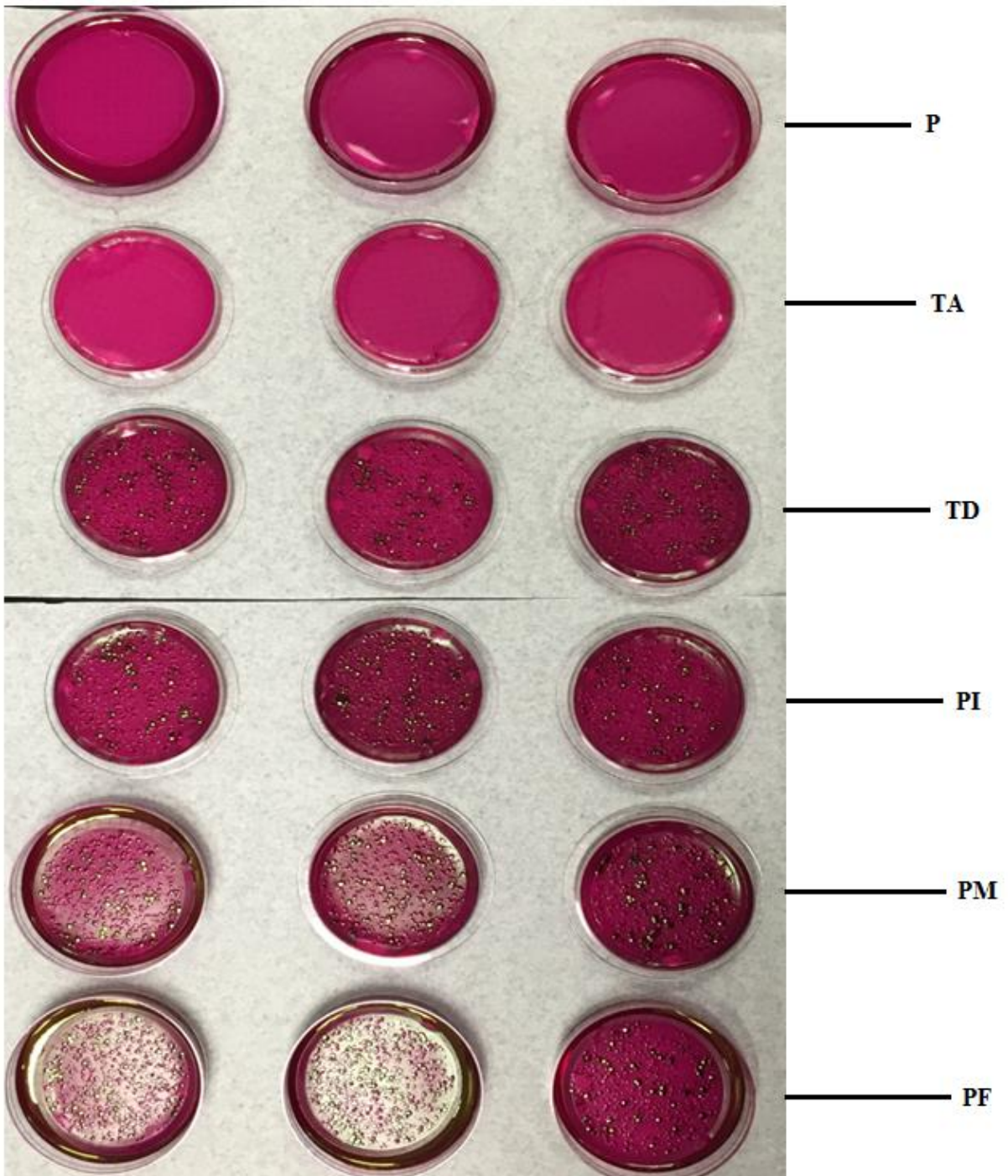
Variable	n	Mean	S.D.	W*	p(one tail)
SRES log10(MP+1)	54	0.00	1.01	0.93	0.0190

**Fotos de colonias de bacterias.**

Fotografía de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728) en los medios de cultivo m-Endo Agar LES (A), m-FC agar (B) y MacConkey sorbitol agar (C).



Fotos de colonias presuntivas de *Escherichia coli* (color verde metálico) aisladas de los puntos de muestreo pozo (P), tanque de almacenamiento (TA), tanque de distribución (TD), punto inicial (PI), punto medio (PM) y punto final (PF) de la granja 3, en el medio de cultivo m-Endo Agar LES.



Datos de la cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* para cada granja analizada.

**Tabla 13.** Cantidad promedio de colonias presuntivas de *E. coli* contabilizadas durante el tiempo de cultivo (0-5 días, 15-20 días, 30-35 días) para las granjas 1, 2 y 3.

Granja	Punto de Muestreo	Tiempo	MP CFU	Log 10 (CFU+1)
1	P	0-5	6.33	0.87
1	P	15-20	0.89	0.28
1	P	30-35	5.67	0.82
1	PF	0-5	8233.33	3.92
1	PF	15-20	266.67	2.43
1	PF	30-35	611.11	2.79
1	PI	0-5	6755.56	3.83
1	PI	15-20	411.11	2.62
1	PI	30-35	766.67	2.89
1	PM	0-5	6788.89	3.83
1	PM	15-20	244.44	2.39
1	PM	30-35	877.78	2.94
1	TD	0-5	6844.44	3.84
1	TD	15-20	455.56	2.66
1	TD	30-35	644.44	2.81
1	TA	0-5	31.22	1.51
1	TA	15-20	33.22	1.53
1	TA	30-35	7.22	0.91
2	P	0-5	1.44	0.39
2	P	15-20	10.78	1.07
2	P	30-35	0.44	0.16
2	PF	0-5	11533.33	4.06
2	PF	15-20	3966.67	3.60
2	PF	30-35	6977.78	3.84
2	PI	0-5	12266.67	4.09
2	PI	15-20	4088.89	3.61
2	PI	30-35	7511.11	3.88

2	PM	0-5	12088.89	4.08
2	PM	15-20	3266.67	3.51
2	PM	30-35	7055.56	3.85
2	TD	0-5	12455.56	4.10
2	TD	15-20	6311.11	3.80
2	TD	30-35	7511.11	3.88
2	TA	0-5	6.33	0.87
2	TA	15-20	0.22	0.09
2	TA	30-35	0.00	0.00
3	P	0-5	5.67	0.82
3	P	15-20	2.44	0.54
3	P	30-35	25.78	1.43
3	PF	0-5	1033.33	3.01
3	PF	15-20	4466.67	3.65
3	PF	30-35	677.78	2.83
3	PI	0-5	3800.00	3.58
3	PI	15-20	3444.44	3.54
3	PI	30-35	355.56	2.55
3	PM	0-5	4400.00	3.64
3	PM	15-20	3333.33	3.52
3	PM	30-35	522.22	2.72
3	TD	0-5	1222.22	3.09
3	TD	15-20	2988.89	3.48
3	TD	30-35	700.00	2.85
3	TA	0-5	0.00	0.00
3	TA	15-20	0.00	0.00
3	TA	30-35	0.00	0.00

**Tabla 14.** Cantidad promedio de colonias presuntivas de *E. coli* contabilizadas durante el tiempo de cultivo (0-5 días, 15-20 días, 30-35 días) para la granja 4.

Granja	Punto de Muestreo	Tiempo	MP CFU	Log 10 (CFU+1)
4	G	0-5	0.00	0.00
4	G	0-5	0.00	0.00
4	G	0-5	0.00	0.00
4	TA	0-5	0.00	0.00
4	TA	0-5	0.00	0.00
4	TA	0-5	0.00	0.00
4	TD	0-5	2300.00	3.36
4	TD	0-5	2700.00	3.43
4	TD	0-5	5166.70	3.71
4	PI	0-5	1966.70	3.29
4	PI	0-5	2566.70	3.41
4	PI	0-5	4733.30	3.68
4	PM	0-5	1633.30	3.21
4	PM	0-5	3000.00	3.48
4	PM	0-5	4733.30	3.68
4	PF	0-5	1733.30	3.24
4	PF	0-5	2766.70	3.44
4	PF	0-5	5533.30	3.74
4	G	15-20	0.00	0.00
4	G	15-20	0.00	0.00
4	G	15-20	0.00	0.00
4	TA	15-20	0.00	0.00
4	TA	15-20	0.00	0.00
4	TA	15-20	0.00	0.00
4	TD	15-20	1600.00	3.20
4	TD	15-20	6533.30	3.82
4	TD	15-20	1033.30	3.01

4	PI	15-20	1133.30	3.05
4	PI	15-20	9333.30	3.97
4	PI	15-20	800.00	2.90
4	PM	15-20	1566.70	3.20
4	PM	15-20	9733.30	3.99
4	PM	15-20	533.33	2.73
4	PF	15-20	1133.30	3.05
4	PF	15-20	9333.30	3.97
4	PF	15-20	866.67	2.94
4	G	30-35	0.00	0.00
4	G	30-35	0.00	0.00
4	G	30-35	0.00	0.00
4	TA	30-35	0.00	0.00
4	TA	30-35	0.00	0.00
4	TA	30-35	0.00	0.00
4	TD	30-35	3866.70	3.59
4	TD	30-35	4633.30	3.67
4	TD	30-35	3866.70	3.59
4	PI	30-35	3300.00	3.52
4	PI	30-35	3100.00	3.49
4	PI	30-35	3800.00	3.58
4	PM	30-35	3633.30	3.56
4	PM	30-35	5066.70	3.70
4	PM	30-35	3600.00	3.56
4	PF	30-35	3400.00	3.53
4	PF	30-35	5533.30	3.74
4	PF	30-35	4033.30	3.61

**Tabla 15. Cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* aisladas de la granja 1.**

(Granja 1, Agua de Pozo)(Lechuga Tropicana)									(Granja 1, Agua de Pozo)(Lechuga Mesclum)									(Granja 1, Agua de Pozo)(Lechuga Romana)											
Banco #1									Banco #2									Banco #3											
Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConke y sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConke y sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConke y sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConke y sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConk ey sorbitol
TD	10			0			0			TD	9			0			10			TD	175			13			8		
TD	20	10 rosa	10 azul	0	0 rosa	0 azul	0	3 rosa	3 azul	TD	10	10 rosa	10 azul	2	4 rosa	4 azul	8	10 rosa	10 azul	TD	190	10 rosa	10 azul	7	10 rosa	10 azul	11	10 rosa	10 azul
TD	7			0			3			TD	12			2			8			TD	183			17			10		
PI	18			2			0			PI	13			2			14			PI	172			8			11		
PI	16	10 rosa	10 azul	0	2 rosa	2 azul	0	0 rosa	0 azul	PI	6	10 rosa	10 azul	3	6 rosa	6 azul	15	10 rosa	10 azul	PI	179	10 rosa	10 azul	9	10 rosa	10 azul	8	10 rosa	10 azul
PI	9			0			0			PI	10			1			12			PI	185			12			9		
PM	9			1			5			PM	8			0			10			PM	190			9			12		
PM	15	10 rosa	10 azul	0	1 rosa	1 azul	5	10 rosa	10 azul	PM	6	10 rosa	10 azul	0	1 rosa	1 azul	9	10 rosa	10 azul	PM	186	10 rosa	10 azul	5	10 rosa	10 azul	9	10 rosa	10 azul
PM	2			0			0			PM	6			1			15			PM	189			6			14		
PF	41			0			0			PF	11			0			11			PF	196			10			9		
PF	45	10 rosa	10 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	PF	7	10 rosa	10 azul	0	1 rosa	1 azul	6	10 rosa	10 azul	PF	190	10 rosa	10 azul	10	10 rosa	10 azul	10	10 rosa	10 azul
PF	47			0			0			PF	8			1			8			PF	196			3			11		
TA	8			60			4			TA	55			36			7			TA	36			7			7		
TA	0	9 rosa	9 azul	58	10 rosa	10 azul	5	10 rosa	10 azul	TA	51	10 rosa	10 azul	43	10 rosa	10 azul	4	10 rosa	10 azul	TA	43	10 rosa	10 azul	4	10 rosa	10 azul	17	10 rosa	10 azul
TA	1			55			7			TA	55			32			4			TA	32			4			10		
P	22			2			20			P	0			0			0			P	0			0			1		
P	19	10 rosa	10 azul	4	8 rosa	8 azul	17	10 rosa	10 azul	P	2	4 rosa	4 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	P	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	4 rosa	4 azul
P	12			2			10			P	2			0			0			P	0			0			3		
CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0		
CONTRC	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	CONTRC	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	CONTRC	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0		

**Tabla 16. Cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* aisladas de la granja 2.**

(Granja 2, Agua de Pozo)(Lechuga Tropicana)									(Granja 2, Agua de Pozo)(Lechuga Tropicana)									(Granja 2, Agua de Pozo)(Lechuga Tropicana)											
Banco #1									Banco #2									Banco #3											
Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConke y sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConke y sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConke y sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConke y sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConke y sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConke y sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConke y sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConke y sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConke y sorbitol
TD	197	10 rosa	10 azul	101	10 rosa	10 azul	14	10 rosa	10 azul	TD	68	10 rosa	10 azul	45	10 rosa	10 azul	19	10 rosa	10 azul	TD	110	10 rosa	10 azul	10	10 rosa	10 azul	189	10 rosa	10 azul
TD	206			104			29			48	18			104			8			175									
TD	201			198			30			43	25			97			11			177									
PI	176	10 rosa	10 azul	81	10 rosa	10 azul	19	10 rosa	10 azul	PI	59	10 rosa	10 azul	28	10 rosa	10 azul	20	10 rosa	10 azul	PI	125	10 rosa	10 azul	21	10 rosa	10 azul	155	10 rosa	10 azul
PI	192			77			41			21	21			124			23			184									
PI	200			82			21			15	19			104			20			196									
PM	200	10 rosa	10 azul	50	10 rosa	10 azul	18	10 rosa	10 azul	PM	68	10 rosa	10 azul	35	10 rosa	10 azul	13	10 rosa	10 azul	PM	100	10 rosa	10 azul	4	10 rosa	10 azul	174	10 rosa	10 azul
PM	188			53			16			39	17			99			10			181									
PM	196			58			17			33	16			101			12			183									
PF	180	10 rosa	10 azul	68	10 rosa	10 azul	18	10 rosa	10 azul	PF	49	10 rosa	10 azul	43	10 rosa	10 azul	11	10 rosa	10 azul	PF	94	10 rosa	10 azul	10	10 rosa	10 azul	166	10 rosa	10 azul
PF	192			69			15			39	14			104			12			178									
PF	200			65			21			41	15			101			10			190									
TA	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	TA	22	10 rosa	10 azul	0	2 rosa	2 azul	0	0 rosa	0 azul	TA	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
TA	0			0			0			0	0			0			0			0									
TA	0			0			0			2	0			0			0			0									
P	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	P	3	10 rosa	10 azul	12	10 rosa	10 azul	0	0 rosa	0 azul	P	0	0 rosa	0 azul	4	4 rosa	4 azul	4	4 rosa	4 azul
P	0			0			0			19	0			0			0			0									
P	0			0			0			62	0			0			0			0									
CONTRO	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	CONTRO	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	CONTRO	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
CONTRO	0			0			0			0	0			0			0			0									
CONTRO	0			0			0			0	0			0			0			0									

**Tabla 17. Cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* aisladas de la granja 3.**

(Granja 3, Agua de Pozo)(Lechuga Tropicana)									(Granja 3, Agua de Pozo)(Lechuga Tropicana)									(Granja 3, Agua de Pozo)(Lechuga Romana)											
Banco #1									Banco #2									Banco #3											
Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConke y sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConke y sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConke y sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConke y sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConk ey sorbitol
TD	10			65			2			TD	7			14			8			TD	16			5			8		
TD	9	10 rosas	10 azul	68	10 rosas	10 azul	2	4 rosa	4 azul	TD	4	10 rosa	10 azul	16	10 rosas	10 azul	10	10 rosas	10 azul	TD	21	10 rosas	10 azul	5	10 rosa	10 azul	12	10 rosas	10 azul
TD	10			73			0			TD	2			16			10			TD	31			7			11		
PI	26			80			2			PI	70			16			6			PI	12			5			4		
PI	60	10 rosas	10 azul	89	10 rosas	10 azul	1	3 rosa	3 azul	PI	63	10 rosas	10 azul	20	10 rosas	10 azul	3	10 rosa	10 azul	PI	10	10 rosas	10 azul	3	10 rosa	10 azul	7	10 rosa	10 azul
PI	54			83			0			PI	37			11			6			PI	10			3			3		
PM	75			85			1			PM	14			5			8			PM	12			5			1		
PM	54	10 rosas	10 azul	93	10 rosas	10 azul	1	3 rosa	3 azul	PM	13	10 rosas	10 azul	7	10 rosas	10 azul	12	10 rosas	10 azul	PM	11	10 rosas	10 azul	2	10 rosa	10 azul	3	8 rosa	8 azul
PM	102			89			1			PM	103			11			16			PM	12			3			4		
PF	8			120			1			PF	15			6			9			PF	4			5			10		
PF	9	10 rosas	10 azul	125	10 rosas	10 azul	0	2 rosa	2 azul	PF	10	10 rosas	10 azul	1	10 rosa	10 azul	10	10 rosas	10 azul	PF	7	10 rosas	10 azul	5	10 rosa	10 azul	9	10 rosas	10 azul
PF	9			129			1			PF	19			10			7			PF	12			1			14		
TA	0			0			0			TA	0			0			0			TA	0			0			0		
TA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TA	0	0	0	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
TA	0			0			0			TA	0			0			0			TA	0			0			0		
P	0			0			7			P	0			0			7			P	34			7			65		
P	0	0	0	0	0	0	13	10 rosa	10 azul	P	0	0	0	0	0	0	13	10 rosas	10 azul	P	4	10 rosas	10 azul	13	10 rosa	10 azul	60	10 rosas	10 azul
P	0			0			2			P	0			0			2			P	13			2			63		
CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0		
CONTRC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CONTRC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CONTRC	0	0	0	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0			CONTRC	0			0			0		

**Tabla 18. Cantidad de colonias presuntivas de *Escherichia coli* aisladas de la granja 4.**

Granja 4 (Acueductos)(Lechuga Mesclum)									Granja 4 (Acueductos)(Lechuga Romana)									Granja 4 (Acueductos)(Lechuga Romana)											
Banco #1									Banco #2									Banco #3											
Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	Punto de muestreo	0-5 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	15-20 días	M-FC	MacConk ey sorbitol	30-35 días	M-FC	MacConk ey sorbitol
TD	28	10 rosa	10 azul	14	10 rosa	10 azul	34	10 rosa	10 azul	TD	23	10 rosa	10 azul	60	10 rosa	10 azul	38	10 rosa	10 azul	TD	50	10 rosa	10 azul	3	10 rosa	10 azul	40	10 rosa	10 azul
TD	23			21			46			71	56			TD			36			18	55			18			38		
TD	18			13			36			65	45			TD			22			10	50			10			38		
PI	15	10 rosa	10 azul	11	10 rosa	10 azul	38	10 rosa	10 azul	PI	24	10 rosa	10 azul	100	10 rosa	10 azul	39	10 rosa	10 azul	PI	52	10 rosa	10 azul	9	10 rosa	10 azul	39	10 rosa	10 azul
PI	24			9			31			84	19			PI			31			2	43			2			38		
PI	20			14			30			96	35			PI			22			13	47			13			37		
PM	15	10 rosa	10 azul	13	10 rosa	10 azul	39	10 rosa	10 azul	PM	26	10 rosa	10 azul	104	10 rosa	10 azul	56	10 rosa	10 azul	PM	58	10 rosa	10 azul	5	10 rosa	10 azul	37	10 rosa	10 azul
PM	20			18			38			98	49			PM			33			6	41			6			38		
PM	14			16			32			90	47			PM			31			5	43			5			33		
PF	17	10 rosa	10 azul	11	10 rosa	10 azul	31	10 rosa	10 azul	PF	33	10 rosa	10 azul	97	10 rosa	10 azul	59	10 rosa	10 azul	PF	55	10 rosa	10 azul	10	10 rosa	10 azul	35	10 rosa	10 azul
PF	22			12			35			88	62			PF			26			12	62			12			45		
PF	13			11			36			95	45			PF			24			4	49			4			41		
TA	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	TA	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	TA	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
TA	0			0			0			0	0			TA			0			0	0			0			0		
TA	0			0			0			0	0			TA			0			0	0			0			0		
G	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	G	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	G	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
G	0			0			0			0	0			G			0			0	0			0			0		
G	0			0			0			0	0			G			0			0	0			0			0		
CONTRO	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	CONTRO	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	CONTRO	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul	0	0 rosa	0 azul
CONTRO	0			0			0			0	0			CONTRO			0			0	0			0			0		
CONTRO	0			0			0			0	0			CONTRO			0			0	0			0			0		