



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL**

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Escherichia coli EN EL CULTIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa*) IRRIGADO CON
AGUAS RESIDUALES EN IXMIQUILPAN, HIDALGO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

GARCÍA MACEDA GRECIA ALBERTINA

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

DR. DANIEL RUÍZ JUÁREZ

CO-DIRECTOR

DR. JOSÉ JESÚS PÉREZ GONZÁLEZ

ASESOR

DR. RUTILIO ORTIZ SALINAS

Ciudad de México, 11 de diciembre de 2020

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Daniel Ruiz Juárez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Co-Director

Dr. José Jesús Pérez González

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Asesor

Dr. Rutilio Ortiz Salinas

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Maestría en Ciencias Agropecuarias

Ciudad de México, 11 de diciembre de 2020

Los que suscriben, miembros del jurado examinador de la alumna Grecia Albertina García Maceda con número de matrícula 2173805520 hace constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada “*Escherichia coli* en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) irrigado con aguas residuales en Ixmiquilpan, Hidalgo”.

Tesis presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias Agropecuarias

Presidente

Dr. José Roberto Ángeles Vázquez
Universidad Autónoma Metropolitana
Departamento de El Hombre y su Ambiente

Secretario

Dr. Salvador Hernández Moreno
Colegio de la Frontera Sur
ECOSUR

Vocal

Dr. Rutilio Ortiz Salinas
Universidad Autónoma Metropolitana
Departamento de Producción Agrícola y Animal

DEDICADA

A Lina Oliva Maceda Alba y Octavio García Fuentes, mis padres: Por las innumerables veces que se apretaron el corazón para permitirme ser quien soy.

A mi hermanita, Meztli García Maceda: Gracias por este viaje a través de la vida, tomadas de la mano.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), por el apoyo económico de la beca (868542) que me fue otorgada para la realización de los presentes estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (**UAM-X**), que, a parte de ser mi alma mater, me permitió finalizar los estudios de esta Maestría en Ciencias Agropecuarias.

A la **Dra. Marcela Vergara Onofre**, Coordinadora de la Maestría en Ciencias Agropecuarias, por la orientación y el apoyo general que me brindó amablemente.

A la **Sociedad de Productores Agrícolas de Ixmiquilpan, Hidalgo S.P.R de R.L de C.V** por dar la autorización para que este trabajo de investigación llegara a buen puerto.

A **Cornelio Flores Cruz**, productor de Ixmiquilpan, Hgo., por todas sus consideraciones, el apoyo y la confianza brindada para la culminación de este proyecto.

Al **Dr. Daniel Ruiz Juárez**, por las aportaciones para la realización y mejora de esta investigación y por la noble lección de vida que me aportó.

Al **Dr. José Jesús Pérez González**, por sus contribuciones diversas para el buen desarrollo del trabajo y enseñarme a pensar de una forma diferente en el campo profesional.

Al **Dr. Rutilio Ortiz Salinas**, por sus interesantes colaboraciones para la culminación de este trabajo, que me permitieron aprender con un enfoque diverso al objeto en estudio.

A la **Dra. Estela Teresita Méndez Olvera** por permitirme ocupar el Laboratorio de Biología Molecular y por sus prolíferas y entusiastas enseñanzas para el desarrollo de esta investigación.

Al **Dr. Daniel Martínez Gómez** por permitirme ocupar el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, así como poder analizar la cepa bacteriana y por sus nutridas explicaciones al respecto.

A la **M. en C. Eva Segundo Rojas**, por el apoyo de una amiga que aporta sus conocimientos, tiempo, paciencia y consejos.

A **Rosa Miguel, Alejandro Mendoza, Noemi Ortiz, Faviola Laurel y Beatriz Márquez** por su apoyo incondicional e ilustrarme que la vida bien llevada aleja de lugares comunes para colocarnos en territorios mejores, en donde lo que se pierde es nada en comparación de lo que se gana. Filosofía con la cual se realizó esta investigación.

Agradezco a todos los que hicieron posible este trabajo, que sería una lista interminable, siempre estaré agradecida por su amistad y cariño.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
2.1 Lechuga.....	17
2.1.1 Origen	17
2.1.2 Clasificación botánica.....	17
2.1.3 Banda de Caspary.....	19
2.2 Cultivo de lechuga.....	20
2.2.1 Preparación de terreno y cama de siembra.....	20
2.2.2 Establecimiento y Densidad de siembra.....	20
2.2.3 Riego	20
2.2.4 Cosecha.....	20
2.2.5 Empaque y embalaje	20
2.3 Importancia económica del cultivo de lechuga	21
2.3.1 Producción mundial de la lechuga	21
2.3.2 Producción de lechuga en México	21
2.3.3 Producción de lechuga en el municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo	22
2.3.4 Cadena de valor en la producción de lechuga (Buenas Prácticas Agrícolas BPA).....	23
2.3.5 Disminución de riegos antes de la plantación.....	23
2.3.6 Disminución de riesgos durante la cosecha.....	23
2.3.7 Disminución de riesgos durante la producción	24
2.4 Agua residual	24
2.5 Uso de aguas residuales para la agricultura en México.....	25
2.5.1 Uso de agua residual en Hidalgo.....	25
2.6 Patógenos de importancia presentes en el agua residual.....	26
2.7 Tipos de aguas residuales.....	26
Aguas residuales domésticas.....	26
Aguas residuales industriales	26
Aguas residuales agroindustriales	27
2.7.1 Ventajas y desventajas del uso de agua residual	27
2.8 Enfermedades transmitidas por el uso de agua de riego.....	28
2.9 Sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP).....	28
2.10 Sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC).....	29

2.11	Importancia de la Inocuidad Alimentaria.....	30
2.12	Enfermedades Transmitidas por consumo de alimentos	30
2.13	Principales causas de muerte en el municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo	31
2.14	Normatividad para el uso del agua residual en la agricultura a nivel mundial.....	32
	Normatividad Internacional.....	32
	Normatividad Nacional	33
2.15	Presencia de <i>E. coli</i> en alimentos	33
2.15.1	<i>E. coli</i> como patógeno de interés en el cultivo de hortalizas	34
2.16	Taxonomía y morfología.....	35
	<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	36
2.16.1	Reacciones bioquímicas	36
2.16.2	Características coloniales	37
2.16.3	Estructura antigénica <i>E. coli</i>	37
2.17	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	38
2.17.1	Sistema de secreción de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	39
2.17.2	Interacción de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y las plantas	39
2. 17.3	Interacción de <i>E. coli</i> O157:H7 y el hombre.....	40
2.18	Métodos utilizados para el análisis microbiológico en alimentos	42
	Métodos fenotípicos.....	42
	Métodos basados en tinción	42
	Recuento microscópico directo	42
	Técnica de siembra en medios sólidos	43
	Siembra por estría	43
	Siembra en superficie.....	45
	Recuento en placa	45
	Método del número más probable (NMP)	45
	Métodos basados en pruebas bioquímicas.....	45
	Pruebas bioquímicas	45
	Métodos moleculares.....	47
	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	47
2.19	Normatividad para la determinación de la calidad microbiológica de alimentos en México	47
III.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	49
IV.	HIPÓTESIS.....	49
V.	OBJETIVOS	49
4.1	Objetivo general	49

4.2 Objetivos específicos	49
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	50
6.1 Zona de estudio	50
Etapa I. Identificación de <i>E. coli</i> O157:H7 en cultivo de lechuga irrigado con distintas aguas de riego en Ixmiquilpan, Hidalgo.....	51
6.2 Muestreo de agua de riego.....	51
6.3 Muestreo de lechuga.....	53
6.4 Análisis microbiológico	54
6.4.1 Identificación de <i>E. coli</i> en agua	54
6.4.2 Identificación de <i>E. coli</i> en lechuga	54
6.5 Identificación de <i>E. coli</i> O157:H7 en agua y tejido de lechuga mediante PCR	55
Etapa II. Translocación, detección e identificación de <i>E. coli</i> O157:H7 en plantas de lechuga	56
6.6 Diseño experimental para evaluar translocación bacteriana.....	56
6.7 Preparación del inóculo.....	58
6.8 Evaluación de la presencia de <i>E. coli</i> en tejido	58
6.9 Análisis estadístico de los datos	58
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
Etapa I	60
7.1 Características físicas de las aguas de riego	60
Potencial de hidrógeno (pH)	60
Temperatura del agua.....	63
Conductividad eléctrica (CE)	65
7.2 Análisis microbiológico	68
Niveles de carga bacteriana en aguas de riego (residuales, pozo, manantial y balneario)	68
Características morfológicas de bacterias encontradas en aguas de riego.....	74
Características coloniales en aguas de riego	74
Pruebas bioquímicas para identificación de <i>E. coli</i> en aguas de riego	76
Características morfológicas de bacterias identificadas en lechugas irrigadas con aguas de riego	79
Características coloniales identificadas en lechugas irrigadas con aguas de riego.....	79
Pruebas bioquímicas en muestras de lechuga irrigada con agua residual para identificación de <i>E. coli</i>	81
Análisis microbiológico	82
Niveles de carga bacteriana en lechuga.....	82
Etapa II. Penetración y permanencia de <i>E. coli</i> O157:H7 en lechuga.....	85

7.3	Identificación de <i>E. coli</i> O157:H7 en cultivo de lechuga.....	85
VIII.	CONCLUSIONES.....	89
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	91

RESUMEN

La lechuga es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial, en la actualidad la producción es de 18.75 millones de toneladas, de las cuales México aporta el 1.62%, destacando el estado de Hidalgo, particularmente la región del Valle del Mezquital. Sin embargo, esta región utiliza aguas residuales no tratadas para la producción de hortalizas, principalmente en el municipio de Ixmiquilpan, lo que pone en riesgo la calidad sanitaria de los alimentos de origen vegetal, por estar en contacto directo con el agua de riego e incrementar la probabilidad de que los alimentos frescos presenten microorganismos contaminantes. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue analizar la incidencia de *E. coli* O157:H7 en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) irrigado con aguas residuales y estudiar su translocación hacia la planta. El muestreo de las aguas de riego (aguas de balneario, manantial, manantial con canal, pozo y residual) se seleccionó en aquellas parcelas con cultivo de lechuga a punto de corte, realizando los análisis fisicoquímicos. El muestreo de los distintos tipos de agua se realizó de acuerdo con la norma NMX-AA-3-1980. Para determinar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en aguas y cultivo de lechuga se realizaron análisis microbiológicos de acuerdo con la norma NOM-210-SSA1-2014. Las muestras positivas se corroboraron mediante un análisis de PCR. A la par, en condiciones *in vitro* se estableció un cultivo de lechuga en dos sistemas de cultivo semihidropónico: a) Técnica de la Película del Nutriente (NFT), b) Bandeja flotante, donde se evaluaron dos tratamientos: Testigo Negativo (agua peptonada) y Testigo Positivo (agua peptonada con *E. coli* O157:H7), con 36 plantas cada uno y una forma de inoculación: sumergir la raíz de la planta de lechuga en los tratamientos. Donde se muestreo el desarrollo de plántula en intervalos de ocho días para cuantificar en placa las UFC/g y migración de las bacterias al interior del tejido de la planta. Los resultados en las muestras de aguas de riego, en los análisis fisicoquímicos se encontraron dentro de los parámetros establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996 para el pH, temperatura y NOM-069-ECOL-1994 para la CE, mientras que, en el agua residual se presentó alta carga de *E. coli* O157:H7 (15.34 UFC/100 mL en O-I y 15.58 UFC/100 mL en P-V) dada las condiciones fisicoquímicas adecuadas para el desarrollo y sobrevivencia de la bacteria. Las muestras de lechuga tomadas del campo no presentaron contaminación por *E. coli* O157:H7, probablemente por el buen manejo del agua de riego y la forma de cultivo por parte de los horticultores, donde el suelo sirve como retén de contaminantes microbiológicos. En el experimento hidropónico del sistema NFT se apreció la posible internalización de *E. coli* O157:H7, de la siguiente forma: Hoja (0.32 UFC/g), tallo (0.42 UFC/g)

y raíz (2.72 UFC/g); la bacteria logró internalizarse en la raíz debido al daño mecánico que la plántula presentó en el tejido radicular. Concluyendo que los cultivos de lechuga irrigados con aguas residuales en Ixmiquilpan, Hgo., no comprometen la inocuidad del producto final, al no existir presencia y translocación de la bacteria *E. coli*, sin embargo, debe mantenerse especial cuidado en la etapa de trasplante de las plántulas de lechuga al suelo, evitando daños mecánicos y heridas a la estructura radicular, asimismo, la posibilidad de hospedar a células bacterianas de *E. coli*.

Palabras clave: Contaminación microbiana; *Escherichia coli* O157:H7; aguas residuales; translocación; internalización, lechuga.

GLOSARIO

Aguas de manantial: Fuente natural de agua que brota de la tierra o entre las rocas.

Aguas de pozo: Túnel vertical o perforación que se realiza en la tierra para la obtención de agua subterránea.

Aguas residuales: Se pueden definir como aquellas aguas que cuyo origen está relacionado a las actividades domésticas, industriales, comerciales agrícolas o de cualquier otra actividad que, por el uso que le haya sido dado, en su composición se puede encontrar materia orgánica y otras sustancias químicas que perturban su calidad, inocuidad y composición original.

Aguas termales: Aguas subterráneas que se encuentran a una mayo temperatura.

Cepa: Conjunto de bacterias con igualdad en términos de sus características biológicas, es decir, bacterias de la misma especie, se llaman cepas o colonias.

Colonias: Agrupamiento de células en forma de masas visibles, en un medio sólido que provienen de una unidad formadora de colonia.

Conductividad Eléctrica (CE): La capacidad que tiene una sustancia o material para permitir el paso de corriente eléctrica a través de sí, es decir, de transportar electrones.

Cuerpo de agua: Acumulación de agua corriente o quieta, que en conjunto forma la hidrósfera; son los charcos temporales, esteros, manantiales, marismas, lagunas, lagos, mares, océanos, ríos, arroyos, reservas subterráneas, pantanos y cualquier otra acumulación de agua.

Escherichia coli (E. coli): Microorganismo presente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, por lo que su presencia en una muestra de alimento no es deseable ya que indica la presencia de materia fecal.

Límite permisible: Valor máximo de concentración de elementos o sustancias en los diferentes componentes del ambiente, determinado a través de métodos estandarizados, y reglamentado a través de instrumentos legales.

Muestra: Cantidad de material que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto a evaluar.

Patotipo: Poblaciones de la misma especie que difieren por su capacidad patogénica.

Serotipo: Puede causar una infección y se clasifica de acuerdo a los antígenos que exhibe en la superficie de sus células.

Unidades Formadoras de Colonias: Célula o conjunto de células que dan origen a una colonia en un medio sólido.

Símbolos y abreviaturas

°C Grados Celsius

CE Conductividad Eléctrica

CIT Citraro

cm Centímetro

EAM Agar Eosina Azul de Metileno

h Hora

IND Indol

mL Mililitros

pH Potencial de Hidrógeno

RBV Agar Rojo Bilis Violeta

RM Rojo de Metilo

sp. No se ha determinado la especie

spp. Se trata de varias especies del mismo género

TSI Agar Triple Azúcar y Hierro

VP Voges Proskauer

μL Microlitro

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de la lechuga	17
Tabla 2. Países productores de lechuga	21
Tabla 3. Entidades productoras de lechuga en México	22
Tabla 4. Importancia económica en materia de sanidad vegetal del cultivo de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo	23
Tabla 5. Características de las aguas residuales	24
Tabla 6. Reúso de agua residual en Ciudad de México e Hidalgo	25
Tabla 7. Patógenos causantes de enfermedades en humanos presentes en el agua residual	26
Tabla 8. Ventajas y desventajas del uso de agua residual	27
Tabla 9. Sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP)	29
Tabla 10. Causas de muerte en el municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo	31
Tabla 11. Directrices recomendadas sobre la contaminación microbiológica de las aguas residuales empleadas en agricultura	32
Tabla 12. Límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes para México	33
Tabla 13. Límites máximos de Conductividad Eléctrica	33
Tabla 14. Taxonomía de <i>E. coli</i>	35
Tabla 15. Cepas de <i>E. coli</i>	36
Tabla 16. Características morfológicas de las colonias de <i>E. coli</i> en medios específicos	37
Tabla 17. Medios sólidos utilizados para el crecimiento de <i>E.coli</i>	43
Tabla 18. Pruebas bioquímicas para identificación de <i>E. coli</i>	46
Tabla 19. Estudios sobre <i>E. coli</i> en lechugas irrigadas con aguas residuales entre los años 2015 y 2017	48
Tabla 20. Localización geográfica de las áreas de muestreo de agua para riego de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo.	52

Tabla 21. Fases y ciclos de los genes productores de toxina STX 1 y STX 2 para PCR	56
Tabla 22. Localización geográfica de las áreas de muestreo de agua de pozo para riego de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo.	71
Tabla 23. Comparación de los valores medios de los parámetros de calidad de aguas de riego en Ixmiquilpan, Hidalgo.	72
Tabla 24. Características morfológicas de las colonias de <i>E. coli</i>	75
Tabla 25. Morfología de colonias bacterianas aisladas de aguas para riego para el cultivo de lechuga balneario, manantial, manantial con canal, pozo y residual en Ixmiquilpan, Hidalgo	76
Tabla 26. Características claves para la identificación de <i>E. coli</i> presente en aguas de riego provenientes de Ixmiquilpan, Hidalgo.	77
Tabla 27. Morfología de colonias bacterianas de muestras de lechuga irrigadas con aguas de riego (residual, pozo, manantial y balneario) en agar Eosina Azul de Metileno.	80
Tabla 28. Características claves para la identificación de <i>E. coli</i>	81
Tabla 29. Comparación de los valores medios de los niveles de la carga bacteriana presente en el tejido de lechuga irrigado con dos aguas de riego en Ixmiquilpan, Hidalgo.	82
Tabla 30. Comparación de los valores medios de las UFC/mL (LOG)	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología externa de la planta de lechuga: a) Tallo; b) hoja; c) inflorescencia; d) raíz	18
Figura 2. Estructura de la raíz	19
Figura 3. La banda de Caspary impide el transporte a través de la matriz extracelular, de tal forma que todas las moléculas deben atravesar las células para llegar al sistema de transporte de la planta	19
Figura 4. Morfología celular de la célula bacteriana de <i>E. coli</i> .	38
Figura 5. Patogenia de <i>E. coli</i> O157:H7	42
Figura 6. Tipos de estriado en placa	43
Figura 7. Siembra en superficie	45
Figura 8. Mapa del municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo, con puntos de monitoreo y muestreo de agua para riego	50
Figura 9. Canales de riego provenientes del DR 03 de Ixmiquilpan, Hidalgo	51
Figura 10. Muestreo a canales de riego provenientes del DR 03 de Ixmiquilpan, Hidalgo	51
Figura 11. Canal de riego que abastece de agua residual a la parcela de lechuga.	53
Figura 12. Ubicación del surco central en la parcela de lechuga	53
Figura 13. Conteo de 50 pasos para adentrarse a la parcela y conteo de 10 plantas.	54
Figura 14. Corte de la décima planta de lechuga como muestra.	54
Figura 15. Los datos presentados indican el promedio de pH en las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan, Hidalgo durante el ciclo agrícola O-I.	61
Figura 16. Los datos presentados indican el promedio de pH en las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan, Hidalgo durante el ciclo agrícola P-V.	61
Figura 17. Los datos presentados indican el promedio de temperatura de las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de O-I.	63

- Figura 18. Los datos presentados indican el promedio de temperatura de las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de P-V. 64
- Figura 19. Salida de aguas del balneario en Ixmiquilpan, Hidalgo. 64
- Figura 20. CE en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hidalgo, para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de O-I. 66
- Figura 21. CE en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hidalgo, para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de P-V. 66
- Figura 22. Los valores del NMP/100 mL en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hgo., para el cultivo de lechuga indican el promedio de UFC/100 mL de las aguas de riego durante los ciclos agrícolas de O-I. 69
- Figura 23. Los valores del NMP/100 mL en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hgo., para el cultivo de lechuga indican el promedio de UFC/100 mL de las aguas de riego durante los ciclos agrícolas de P-V. 69
- Figura 24. Condiciones generales de pozo profundos con agua para riego de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo. 72
- Figura 25. Tinción de Gram. Bacilos gram negativos observados bajo microscopía de luz convencional (100x) presentes en muestras de aguas de riego. 74
- Figura 26. Crecimiento colonial de *E. coli* en agar Eosina Azul de Metileno de muestras en aguas residuales de Ixmiquilpan, Hidalgo **a)** Cepa de referencia de *E. coli* O157:H7; **b)** Testigo agar EAM; **c)** Colonias bacterianas desarrolladas en el medio EAM. 75
- Figura 27. Crecimiento bacteriano de aguas de manantial en agar Eosina Azul de Metileno **a)** Cepa de referencia de *E. coli* O157:H7; **b)** Testigo agar EAM; **c)** Coliformes totales. 75
- Figura 28. Producto de la PCR en gel de agarosa al 1 % para el gen productor de STX 1 y STX 2. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1: Testigo positivo *E. coli* O157:H7; Carril 2-8: muestras de aguas de riego de Ixmiquilpan, Hgo., para el cultivo de lechuga. 78

Figura 29. Bacilos gram negativos presentes en muestra de lechuga irrigada con aguas de riego observados bajo microscopía de luz convencional (100x).	79
Figura 30. Crecimiento bacteriano en medios específicos de muestras de lechuga irrigadas con aguas de riego (residual, pozo, manantial y balneario) en agar Eosina Azul de Metileno a) Referencia de <i>E. coli</i> O157:H7; b) Testigo agar EAM; c) Colonias bacterianas desarrolladas.	80
Figura 31. Riego de cultivo de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo.	83
Figura 32. Raíz de plántula de lechuga sana.	86
Figura 33. Raíz de plántula de lechuga dañada.	87

I. INTRODUCCIÓN

Desde sus inicios hasta la actualidad, el hombre por generaciones ha buscado preservar la salud a través del consumo de vegetales y frutas frescas, y con ello ha provocado un aumento en el consumo de alimentos de origen vegetal, como es el caso de las hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Noumedem et al., 2017), presentando un alto consumo, debido a que es una verdura dietética importante que se consume en crudo, presentando vitamina C, compuestos fenólicos y contenido de fibra (FAOSTAT, 2010; Aranzazu y Fereres, 2012).

La lechuga, pertenece a la familia de las Asteraceae, es de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial, en la actualidad la producción es de 18.75 millones de t, de las cuales México aporta el 1.62% de la producción nacional (SIAP, 2020). Entre los principales estados productores de la República Mexicana, destaca el estado de Hidalgo con 17, 302 t (SIAP, 2019).

En este estado, los cultivos agrícolas se irrigan con diferentes tipos de agua, debido a que sufren de escasez de recursos hídricos y, adicionalmente, estas aguas aportan un valor nutritivo a los cultivos (García-Salazar, 2019): 60.62 % con aguas negras; 39.00 % con aguas blancas (pozos y lluvias) y sólo 0.38 % aguas residuales tratadas (CONAGUA, 2014).

En el municipio de Ixmiquilpan, las hortalizas se irrigan con aguas residuales no tratadas provenientes del DR 03 Tula y DR 100 Alfajayucan, aguas de balneario, aguas de manantial, manantial con canal y aguas de pozo para la producción de hortalizas lo que pone en riesgo la calidad sanitaria de los alimentos frescos de origen vegetal, por estar en contacto directo con el agua de riego, provocando Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's).

Las ETA's en los humanos constituyen parte de la tasa de mortalidad a nivel mundial, hasta el año 2010 se estimaron 600 millones de casos provocados por ETA's que causaron 420, 000 muertes (WHO, 2015). Los brotes por estas enfermedades son atribuidos principalmente por el consumo de hortalizas frescas tales como: espinaca, brotes de alfalfa y lechuga (FDA, 2002), dado que son irrigadas con aguas residuales no tratadas; el uso de este tipo de aguas conlleva un riesgo sanitario debido a la presencia de bacterias como: *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, lo que pone en duda la inocuidad de las hortalizas (Díaz y Hernández, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que una de las bacterias que causa mayor cantidad de muertes es *E. coli* O157:H7 con 230, 000 muertes hasta el año 2017 (WHO, 2015; SENASICA, 2018), provocando el síndrome urémico hemolítico, que son descargas líquidas con hemorragias que causan la muerte a niños y personas de la tercera edad (Eguía et al., 2017). En México hasta el año 2002 se reportaron 11 brotes provocados por *E. coli* O157:H7 (Hernández et al., 2011). En 2017 en el estado de Hidalgo se reportaron enfermedades diarreicas, amibiasis intestinal, ascariasis, brucelosis y fiebre tifoidea por el consumo de hortalizas en fresco (Secretaría de Salud, 2018).

El uso de aguas residuales es probable que se asocie con las principales causas de muerte en Ixmiquilpan, Hidalgo, se relacionan principalmente con enfermedades del aparato digestivo, por ejemplo, brotes epidemiológicos de *Salmonella* spp. en cilantro (datos no publicados); no existen trabajos que demuestran el número de personas que se enferman y mueren en este lugar por el consumo de hortalizas en fresco que se encuentran contaminadas. Por lo que esta investigación tiene como propósito realizar un análisis microbiológico para determinar la presencia de *Escherichia coli* (Enterohemorrágica EHEC O157:H7) en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) de la Sociedad de Productores Agrícolas de Ixmiquilpan S.P.R. de R.L. de C.V., irrigado con de balneario (termal), manantial, manantial con canal, pozo y residuales en Ixmiquilpan, Hidalgo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Lechuga

2.1.1 Origen

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es el cultivo más importante en el grupo de verduras de hoja; pertenece a la familia de las Asteraceae, que comprende entre 23,000 y 30,000 especies y se cree que es la familia más grande de plantas (Kuetze, 2017). Su origen se encuentra en Europa y el suroeste de Asia; era cultivada por los antiguos egipcios, pero no está claro si era para la producción de aceite de las semillas, para comer las hojas o como ofertas con fines religiosos (Loebenstein y Lecoq, 2012). Hoy en día, el consumo de lechuga se ha extendido enormemente en todo el mundo debido a su alto valor nutritivo y su importancia medicinal. La especie *L. sativa* se caracteriza por una alta diversidad genética resultante de su origen polifilético y un complejo proceso de domesticación (Kesseli et al., 1991).

2.1.2 Clasificación botánica

La lechuga es una planta anual (*L. sativa* L.) (Tabla 1), esta es la planta más importante del grupo de las hortalizas de hoja (Rivera, 2010).

Tabla 1. Clasificación botánica de la lechuga

Nombre común	Lechuga
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	Lactuca
Especie:	<i>Lactuca sativa</i>

Fuente: Osorio y Lobo (1983).

De acuerdo a González (2010) la planta de lechuga está constituida por: **Tallo.** Cilíndrico y ramificado; **Hojas.** Las hojas están colocadas en roseta, desplegadas al principio. En algunos casos siguen así durante todo el desarrollo (variedades Romanas) y en otras se acogollan más tarde. El borde de los limbos puede ser liso, ondulado o aserrado; **Inflorescencia.** Son capítulos florales amarillos dispuestos en racimos; **Raíz.** La raíz no sobrepasa los 25 cm. de largo, es pivotante, corta y con ramificaciones (Figura 1).



Figura 1. Morfología externa de la planta de lechuga: a) Tallo; b) hoja; c) inflorescencia (Tomada de Flickr, 2008); d) raíz.

La estructura de la raíz de los tejidos primarios, del exterior hacia el interior, constan de: epidermis, compuesta de células de paredes delgadas, en donde se realiza la absorción de agua y nutrientes. La absorción del agua se lleva a cabo por ósmosis y los conductos capilares de las plantas tienen alrededor de $r = 0.001$ cm. El córtex almacena minerales transportados. El cilindro vascular se sitúa en el xilema que transporta agua y minerales disueltos (Encyclopedia Britannica, 2019); endodermis, presentan dos vías o barreras apoplásticas, en donde una de sus funciones principales es la protección contra patógenos y parásitos, la vía **A** ó simplástica transporta la membrana plasmática mediante transporte activo (sales) u ósmosis (agua) y atravesando el citoplasma de las células y la vía **B** ó apoplástica, a través de las paredes celulares y de los espacios intercelulares (Lux et al., 2004; Rochus, 2015 y Fromm, 2019).

La banda de Caspary, la cual es una modificación de la pared celular en forma de anillo en la endodermis de la raíz de las plantas vasculares y son vitales para la exclusión de sales y patógenos (Naseer, 2012 y Chengwei et al., 2019). En las interacciones con microbios patógenos esta pared celular es la primera línea de defensa que proporciona alto nivel de resistencia general (no huésped) a las plantas (Rich et al., 2014) (Figura 2). De acuerdo a Luque y Estrada (2004) las raíces representativas de la familia de las Asteraceae muestran caracteres estructurales que

difieren de la generalidad de las dicotiledóneas reportadas: forman yemas y felógeno exógenos y retienen la corteza primaria por largo tiempo, además las raíces parecen contener grandes cantidades de sustancias grasas.

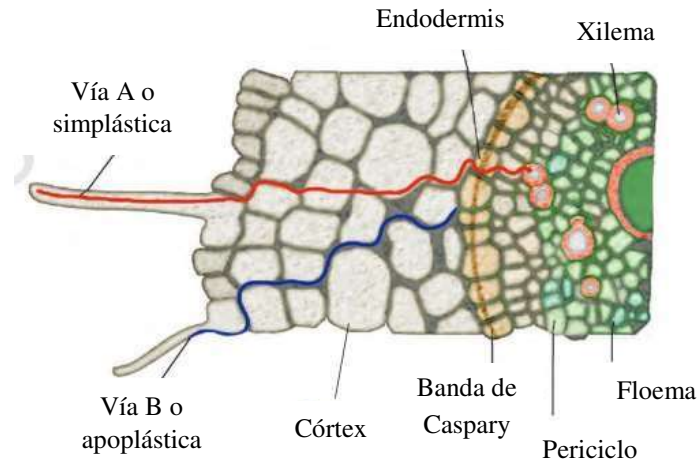


Figura 2. Estructura de la raíz (Tomada y modificada de Ncert, 2019).

2.1.3 Banda de Caspary

Casi todas las plantas tienen sólo una capa endodérmica que rodea los tejidos transportadores de sus raíces; la endodermis tiene la función de actuar como barrera entre los tejidos estelares internos y los tejidos superficiales externos (Li et al., 2018). Las tiras casparianas son modificaciones de la pared celular en forma de anillo en la endodermis de la raíz de las plantas vasculares (Naseer et al., 2012; Franke, 2015). Estas bandas forman una red en las paredes primarias de las células endodérmicas que actúa como una barrera física de transporte apoplásico, son estructuras lignificadas, es decir, están compuestas de lignina y suberina, lo que lo convierte en una estructura protectora para los tejidos vasculares en las plantas que ayudan a la exclusión de patógenos, absorción selectiva de nutrientes y absorción de agua (Barberon, 2016; Li et al., 2018; Song et al., 2019).

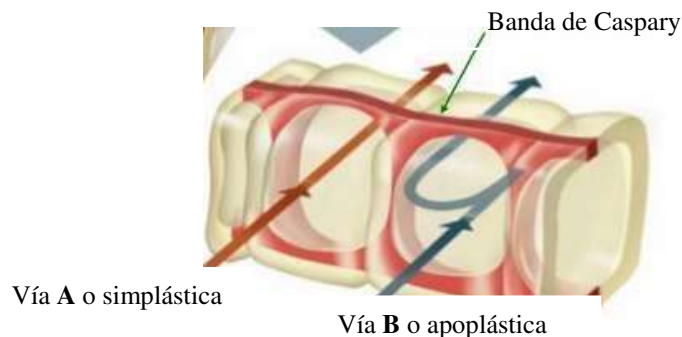


Figura 3. La banda de Caspary impide el transporte a través de la matriz extracelular, de tal forma que todas las moléculas deben atravesar las células para llegar al sistema de transporte de la planta (Tomada y modificada de SlideShare, 2014).

2.2 Cultivo de lechuga

2.2.1 Preparación de terreno y cama de siembra

De acuerdo al INIFAP (2011), en la preparación del terreno se logra con limpia o rastreo, arado profundo de 30 a 35 cm y volteo de igual profundidad, luego se da rastreos cruzados, y finalmente se nivela el terreno. Se trazan camas de siembra de 1 metro de ancho y se ranura la parte central donde se coloca la cintilla o manguera de gotero integral a una profundidad aproximada de 15 cm, si se pretende realizar el riego por goteo, se tapa y acama a 60 cm de ancho.

2.2.2 Establecimiento y Densidad de siembra

De acuerdo al INIFAP (2011) y SAGARPA (2014), la plántula de lechuga se obtiene en 25 días, y a partir de ese momento ya se encontrará lista para su trasplante. El trasplante se realiza en camas de 1 metro de ancho, a doble hilera, en tresbolillo, con separación de 30 cm entre plantas e hileras. Son aconsejables densidades que oscilan entre 11 y 13 plantas por m².

2.2.3 Riego

De acuerdo al INIFAP (2011), el cultivo de lechuga requiere láminas de riego de 50 cm la cual puede ser distribuida en 6 mm diarios de agua durante los meses frescos (otoño-invierno) y 10 mm durante los meses cálidos (primavera-verano).

2.2.4 Cosecha

De acuerdo a SAGARPA (2014), la lechuga se cosecha entre los 60 y 90 días dependiendo la variedad. La madurez está basada en la compactación de la cabeza o roseta, de esta forma es considerada apta para ser cosechada de forma manual cortando la planta por la base, a ras del suelo.

2.2.5 Empaque y embalaje

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-FF-51-1982, productos alimenticios no industrializados para uso humano-hortalizas en estado fresco-lechuga, menciona que cada empaque debe llevar en el exterior una etiqueta o impresión permanente, con características legibles e indelebles, el producto no debe sobresalir del nivel superior del envase madera u otro material y debe reunir condiciones de higiene y ventilación.

2.3 Importancia económica del cultivo de lechuga

2.3.1 Producción mundial de la lechuga

Hasta el año 2017, considerando el mercado global, el primer país productor de lechuga es China, seguido por Estados Unidos (USA) (FAOSTAT, 2019) y donde México ocupa el lugar 9 (Tabla 2).

Tabla 2. Países productores de lechuga

Lugar	País	Producción (t)
1	China	15, 156, 509
2	USA	3, 836, 820
3	India	1, 090, 770
4	España	976, 112
5	Italia	735, 873
6	Japón	574,646.1
7	Irán	513,041.9
8	Turquía	490, 423
9	México	486, 440
10	Alemania	353, 883

Fuente: FAOSTAT (2019).

2.3.2 Producción de lechuga en México

La producción de lechuga se desarrolla en 22 estados de la República Mexicana, hasta el año 2018 alcanzó un volumen de producción de 486, 440 t (FAOSTAT, 2019). En México destacan como principales entidades productoras de esta hortaliza: Guanajuato (181,015 t), Zacatecas (79,963) y Puebla (66,234) (Tabla 3) (SIAP, 2019). Sin embargo, el estado de Hidalgo se encuentra en el resto de las entidades productoras de lechuga, siendo el lugar en donde el mayor campo agrícola a nivel mundial es regado con aguas negras (Hernández, 2011).

Tabla 3. Entidades productoras de lechuga en México

Lugar	Entidad Federativa	Región	Producción (t)
1	Guanajuato	Centro-occidente	142,870
2	Zacatecas	Noroeste	87,415
3	Puebla	Centro	67,674
4	Aguascalientes	Centro-Occidente	54,206
5	Querétaro	Centro-Occidente	26,549
6	Baja California	Noroeste	24,713
7	Michoacán	Centro-Occidente	15,536
8	Sonora	Noroeste	14,157
9	CDMX	Centro	13,833
10	Tlaxcala	Centro	11,786
	Resto		27,701

Fuente: SIAP (2019).

2.3.3 Producción de lechuga en el municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo

El estado de Hidalgo cuenta con una gran diversidad de climas, suelos y temperaturas, lo cual permite sembrar diversos cultivos como las hortalizas, las cuales están cultivadas en más de 10, 000 ha., donde los cultivos de tomate, chile, jitomate, calabacita, ejote y lechuga se concentran en 7, 433 ha (CESAVEH, 2015).

De acuerdo al CESAVEH en 2015, el municipio de Ixmiquilpan se atienden a 16 productores de lechuga que cuentan con una superficie de 52.50 ha sembradas con este cultivo, dentro de la campaña “Manejo Fitosanitario de Hortalizas, a operar con recursos del componente de sanidad del programa Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria” y cuentan con una producción anual de 2, 117.50 t (Tabla 4). Sin embargo, por comunicación personal con los integrantes de la “Asociación de Productores de Ixmiquilpan, Hidalgo”, mencionan que tienen una superficie de 12, 000 ha irrigadas con aguas residuales y por ende, la producción anual es más elevada a los datos publicados por el CESAVEH; donde existen alrededor de 3 000 productores dedicados al cultivo de lechuga.

Tabla 4. Importancia económica en materia de sanidad vegetal del cultivo de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo

Cultivo	Número de productores	Superficie (Ha)	Producción (t)	Valor de producción (\$)	Costo de producción (\$)	Costos fitosanitarios (\$)
Lechuga	16	52.50	2,117.50	8,469,999.93	8,190,770.00	1,030,750.00

Fuente: CESAVEH (2015).

2.3.4 Cadena de valor en la producción de lechuga (Buenas Prácticas Agrícolas BPA)

Los consumidores están cada vez más preocupados por obtener alimentos de calidad e inocuos. En este contexto, nacen las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), las cuales simplemente pueden definirse como “Hacer las cosas bien y dar garantía de ello” (FAO, 2012). En el manual de SAGARPA/SENASICA de Siller et al. (2002) mencionan que hay siete pasos para llevar a cabo las BPA, las cuales son: a) disminución de riesgos de contaminación química, física y biológica antes de la plantación, b) disminución de riesgos durante la producción, c) disminución de riesgos durante la cosecha, d) sección de empaque, e) limpieza e higiene, f) recepción del producto, empaque-embalaje y g) transporte.

2.3.5 Disminución de riesgos antes de la plantación

Debe existir una selección adecuada del material vegetativo en donde es importante contar con información necesaria sobre la semilla antes de la siembra, los materiales de germinación deben encontrarse sanitizados, conocer el historial del lote en donde se realizará la siembra, y realizar el transplante y establecimiento del cultivo. Esta etapa de cultivo y crecimiento de la planta es quizá la de mayor riesgo de contaminación microbiológica del producto (Siller et al., 2002).

2.3.6 Disminución de riesgos durante la cosecha

Los factores de riesgo de contaminación microbiana que intervienen en esta etapa son las instalaciones sanitarias en el campo, las herramientas de corte, los contenedores y las condiciones de higiene de los trabajadores. Donde se deben adoptar buenas prácticas de higiene así como asegurarse del cumplimiento de higiene en los camiones u otros tipos de transporte para el traslado de las lechugas frescas (Siller et al., 2002). Dentro de las buenas prácticas agrícolas, el agua de riego es una variable muy importante por los riesgos de contaminación físicas, químicas y biológicas que pueden presentar de acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua

para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

2.3.7 Disminución de riesgos durante la producción

El riego rodado por inundación presenta mayores posibilidades de contaminación si se utiliza con cultivos de porte bajo como la lechuga, la fresa o similares que tienen contacto directo con el suelo. El riego por aspersión representa una manera rápida de contaminar el producto si el agua utilizada está contaminada (Siller et al., 2002).

2.4 Agua residual

Las aguas residuales son aguas cuyas propiedades físicas, químicas o biológicas han cambiado como resultado de la introducción de ciertas sustancias que la hacen insegura (Amotey y Bani, 2011). No tienen un valor inmediato para el fin en que se le utilizó ni para el propósito que se produjo debido a su calidad, cantidad o al momento en que se dispone de ella. Sin embargo, pueden servir de suministro para otro usuario en un lugar diferente además de ser una combinación de efluentes domésticos, industriales entre otros (AQUASTAT, 2016). Las aguas residuales están compuestas aproximadamente en un 99 % de agua y en un 1 % de sólidos en suspensión, coloidales y disueltos, tanto orgánicos como inorgánicos (UN WATER, 2017).

Las características de estas aguas dependen del tipo de industria, régimen de operación, época del año e incluso debido a las aguas de lluvia que se recolecten de los diversos puntos de una planta (Tabla 5) (D'Alessandri, 2012).

Tabla 5. Características de las aguas residuales

Características	Importancia
Características físicas	Conductividad eléctrica (CE), turbidez, color, aroma, sólidos totales y temperatura.
Características químicas	Demanda química de oxígeno (DQO), carbono orgánico total (COT), nitrógeno, fósforo, cloruros, sulfatos, alcalinidad, pH, metales pesados, elementos traza, contaminantes prioritarios.
Características biológicas	Helminthos, coliformes totales, coliformes fecales en donde <i>E. coli</i> se utiliza como indicador.

Fuente: Amotey y Bani (2011).

2.5 Uso de aguas residuales para la agricultura en México

En 1904, México implementó el sistema de irrigación con aguas residuales en el Valle del Mezquital del estado de Hidalgo (Núñez, 2015). En 14 de los 25 municipios del Valle del Mezquital, la totalidad de los sembradíos son irrigados con aguas crudas o negras, aunado a ello, en esa región se han alcanzado altos niveles de rendimiento. En ese sentido el 60 % de las 46, 480 unidades agrícolas con sistema de riego en el estado de Hidalgo usan aguas negras en los cultivos; así mismo el 39 % utiliza aguas blancas (de pozos y lluvias) y sólo 0.38 % aguas residuales tratadas (CONAGUA, 2014).

2.5.1 Uso de agua residual en Hidalgo

La Dirección de Registro Público de Derechos del Agua menciona que el estado de Hidalgo tiene concesionado en un 35 % el volumen de aguas nacionales. El reúso de agua residual en la región asciende a un volumen anual de 1785 hm³ (56.6 m³/s) y es el mayor del país. Del gran total de aguas residuales provenientes del Río Tula, el 94 % se utiliza para riego en el cultivo de forrajes y hortalizas, el resto para riego de parques y jardines, así como lavado de autos (Tabla 6) (CONAGUA, 2018).

Tabla 6. Reúso de agua residual en Ciudad de México e Hidalgo

Uso	Valle de México		Tula		Total		% Total de reúso
	(m ³ /s)	(hm ³ /año)	(m ³ /s)	(hm ³ /año)	(m ³ /s)	(hm ³ /año)	
Agropecuario	3	101	50	1,574	53	1,675	93.82
Abastecimiento público	2	66	-	-	2	66	3.71
Industrial	1	16	1	28	1	44	2.47
Total	6	183	51	1,602	57	1,785	100.00

Fuente: CONAGUA (2018).

2.6 Patógenos de importancia presentes en el agua residual

De acuerdo a Ríos et al. (2017), dentro de los patógenos que se encuentran presentes en las aguas residuales existen microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales y de tipo viral (Tabla 7):

Tabla 7. Patógenos causantes de enfermedades en humanos presentes en el agua residual

Virus	Bacterias		Parásitos	
Hepatitis A y E	Gram positivas	Gram negativas	Protozoos	Helmintos
Norovirus: Calcivirus	<i>Micrococcus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Giardia</i> spp.	<i>Ascaris</i>
Rotavirus: Grupo A, B y C	spp., <i>Staphylococcus</i>	sp, <i>Klebsiella</i> sp	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>lumbricoides</i>
Bacteriofagos: colifagos, bacteriófagos de <i>Bacteroides fragilis</i>	spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Sarcina</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>		

Fuente: Ríos et al. (2017).

2.7 Tipos de aguas residuales

Las aguas residuales pueden tener diversos orígenes, los cuales provienen de origen doméstico, industrial y agroindustrial.

Aguas residuales domésticas

Este tipo de aguas se originan principalmente en la vivienda y el comercio (Cubillos, 2007). El efluente de aguas residuales domésticas es el principal contribuyente a diversos problemas de contaminación del agua como: eutrofización; riesgos para la salud de los humanos y el ganado; pérdida de oxígeno y cambios en el ecosistema acuático (Wijaya y Soedjono, 2018).

Aguas residuales industriales

Estas aguas son desechadas de los procesos y operaciones de transformación, como es el caso del agua de enfriamiento, con base en el tipo de industria se presenta amplia diversidad en las concentraciones de los contaminantes de origen biológico, químico y físico, que por lo general, en la mayoría de los casos le imparten características indeseables y de difícil tratamiento (Cubillos, 2007).

Aguas residuales agroindustriales

Son volúmenes de aguas residuales derivadas del procesamiento de materias primas agrícolas y ganaderas se eliminan anualmente a los ecosistemas acuáticos de todo el mundo como resultado de la creciente demanda de alimentos; presentan alta concentración de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y pH variable (Cubillos, 2007; Posadas et al., 2014).

2.7.1 Ventajas y desventajas del uso de agua residual

De acuerdo a Jaramillo y Restrepo (2017) el uso de aguas residuales presenta ventajas y desventajas para el uso agrícola, práctica que se está adoptando en distintas regiones debido a la escasez del agua y al crecimiento poblacional (Tabla 8).

Tabla 8. Ventajas y desventajas del uso de agua residual

Ventajas	Desventajas
Alternativa que ayuda a confrontar la escasez de agua, especialmente para el mayor usuario, las aguas residuales varían de acuerdo a la disponible.	Los niveles de concentración, tipos de patógenos y sustancias químicas presentes en agricultura por ser consumiendo 70 % del agua de la región, condiciones sanitarias y socioeconómicas de cada comunidad.
Reutilización de aguas residuales aumenta la producción agrícola en las regiones con escasez de agua.	La concentración de microorganismos patógenos causantes de enfermedades puede ser de 10 a 100 veces mayor en los países subdesarrollados que en los desarrollados.
Presentan nutrientes de forma natural como micronutrientes (Ca, Mg, Fe, Mn o Zn) y macronutrientes (N, P, K).	Presencia de contaminantes emergentes con actividad biológica en diferentes organismos y sus propiedades persisten en el medio.
Aumentar la producción agrícola en regiones que experimentan escasez de agua.	Afectar el crecimiento de la planta y su fertilidad por exceso de nitrógeno.

Fuente: Jaramillo y Restrepo (2017).

2.8 Enfermedades transmitidas por el uso de agua de riego

El consumo de verduras frescas particularmente como son: la lechuga, col y otros vegetales que generalmente se consumen crudas han sido asociados a brotes epidémicos de diarrea en humanos (Muñoz, 2005). En general, se ha reportado que en los países industrializados el porcentaje de la población que sufre de ETA's es del 30 % mayor que los casos estimados, las cuales se adquieren por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos como bacterias que afectan la salud del consumidor (Núñez, 2015). Esto debido a que las aguas se encuentran contaminadas por restos fecales de humanos y animales, que contienen microorganismos patógenos (OMS, 2019). En México, en el período 1993-1997 las principales causas de mortalidad en el país fue el consumo de hortalizas frescas con un total 2.95 millones de personas enfermas por consumo de alimentos contaminados, obteniendo un promedio anual de 10, 300 defunciones (Jiménez, 2018).

2.9 Sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP)

De acuerdo a la norma NOM-251-SSA1-2009 el sistema HACCP tiene como objetivo diseñar plan de seguridad para identificar los peligros relacionados en cualquier etapa de la cadena alimentaria y así garantizar la inocuidad del producto. Este sistema se basa en un conjunto de siete principios (Tabla 9) (Krishnakumar, 2019).

Tabla 9. Sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP)

Principios	
1. Realizar análisis de peligros	Identificar los peligros potenciales asociados con cada una de las diferentes fases del proceso de producción, empaque y almacenamiento de los productos alimenticios.
2. Determinar los puntos críticos de control (PCC).	Los puntos operacionales, procesos, o fases de un proceso que pueden ser controlados para eliminar los riesgos o minimizar la ocurrencia de los mismos a un nivel seguro para el consumidor final.
3. Establecer un límite o límites críticos.	Definir los niveles o límites que aseguren que un PCC está bajo control. Un límite crítico está constituido por una o más tolerancias prescritas que debe ser satisfechas para garantizar que un determinado PCC controla realmente un riesgo.
4. Establecer un sistema de vigilancia del control de los PCC.	Desarrollar un sistema de comprobación u observaciones programadas que haga posible monitorear el control efectivo de los PCC y sus límites confirmando que no se exceden los valores preestablecidos. Los resultados del control deben ser documentados.
5. Establecer medidas correctivas se adapten cuando la vigilancia indica que un determinado PCC no está controlado.	Establecer un sistema que permita identificar precisamente que acción correctiva se debe implementar en el caso de que un PCC este fuera de control.
6. Establecer procedimientos de comprobación para confirmar que HACCP funciona eficazmente.	La comprobación está integrada por los métodos, procedimientos y pruebas que se usan para determinar que el sistema está de acuerdo con el plan.
7. Establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y los registros.	Se debe tener un archivo establecido para ser mostrado a los inspectores oficiales si estos lo solicitan. Se pueden idear modelos para registrar y documentar el sistema.

Fuente: Krishnakumar (2019).

2.10 Sistemas de reducción de riesgos de contaminación (SRRC)

Los SRRC son medidas y procedimientos establecidos para garantizar las condiciones sanitarias de los alimentos durante el proceso de producción primaria, disminuyendo la contaminación física, química y microbiológica a través de la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas. Con su aplicación, se busca minimizar los riesgos de contaminación a través de una serie de medidas preventivas, enfocadas a las actividades desarrolladas en cada unidad de producción, como: manejo de documentación y registros, infraestructura, personal, control de desechos y fauna nociva, además de higiene, limpieza de instalaciones y equipo (SENASICA, 2016). De acuerdo a la norma NOM-251-SSA1-2009 peligro se define como agente biológico, químico o físico

presente en el alimento, bebida o suplemento alimenticio o bien la condición en que éste se halla, que puede causar un efecto adverso para la salud.

2.11 Importancia de la Inocuidad Alimentaria

De acuerdo a lo establecido por el *Codex Alimentarius* la inocuidad es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine (FAO, 2019). Sin embargo, se ve afectada debido a la presencia de peligros físicos, químicos y biológicos que pueden ser introducidos tanto en la producción primaria como en los procesos de empaque y/o transformación (OMS, 2017). Los alimentos son la fuente principal de exposición a agentes patógenos, tanto químicos como biológicos (virus, parásitos y bacterias), a los cuales nadie es inmune, ni en los países en desarrollo ni en los desarrollados; se estima que cada año enferman 600 millones de personas en el mundo uno de cada 10 habitantes, por ingerir alimentos contaminados y que 420,000 mueren por esta misma causa, además, en los últimos diez años se han registrado brotes de enfermedades graves transmitidas por los alimentos en todos los continentes, a menudo amplificadas por la globalización del comercio (OMS, 2017).

2.12 Enfermedades Transmitidas por consumo de alimentos

Las ETA's han sido catalogadas por la OMS como uno de los problemas más grandes de salud pública a nivel mundial (Barrantes y Achí, 2011), las cuales son las causas principales de enfermedades y muertes infantiles en los países en vías de desarrollo. Muchas de estas infecciones se adquieren a través de alimentos y agua contaminados (Zaidi et al., 2008). Considerando el agua de riego como uno de los medios de transmisión más importantes de patógenos humanos entéricos que se encuentran presentes en los cultivos de frutas y hortalizas (Jung and Matthews, 2014). A nivel mundial se estima que hay más de 2.2 millones de muertes al año, de las cuales 1.4 millones son niños causadas por enfermedades transmitidas por las aguas de riego contaminadas. Los casos de estas enfermedades también incluyen diarrea, enfermedades gastrointestinales y enfermedades sistémicas (Ramírez et al., 2015). En México, un estudio gubernamental realizado en 2003, reportó 4 556 decesos causados por infecciones intestinales (Hernández et al., 2011).

Los brotes reportados por enfermedades gastrointestinales en los últimos años, han estado relacionados con la contaminación de hortalizas principalmente tomates, espinacas, lechugas y brotes de semillas (Soodb et al., 2018). Estas enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por microorganismos bacterianos, en particular, por microorganismos que pertenecen a

la familia *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, mismas que se caracterizan por ser bacterias Gram-negativas, y al género *Staphylococcus* consideradas bacterias Gram-positivas. La relevancia de estos microorganismos en la salud humana es que son importantes agentes causantes de intoxicación alimentaria e infección en el tracto gastrointestinal de los seres humanos (Andersen et al., 2015). La mayoría de los patógenos transmitidos por los alimentos está vinculado con el consumo de productos frescos irrigados con aguas residuales, dentro de los microorganismos más importantes asociados con enfermedades gastrointestinales son *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* (Hernández et al., 2011; Alam, 2014; Soodb et al., 2018).

2.13 Principales causas de muerte en el municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo

De acuerdo a las estadísticas obtenidas por el Sistema Integral de Información del Estado de Hidalgo, las principales causas de muerte que tienen lugar en la región VI de Ixmiquilpan, Hidalgo predominan las enfermedades del aparato digestivo (Tabla 10), en donde están presentes las enfermedades de tumores malignos en los órganos digestivos (INEGI, 2016). Debido a que en la región se producen hortalizas irrigadas con aguas residuales, las cuales se ven afectadas por la presencia de microorganismos patógenos presentes en estas aguas, y al ser consumidas, producen daños en el consumidor.

Tabla 10. Causas de muerte en el municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo

Causas de muerte	Total en Hidalgo	Total en Ixmiquilpan
Tumores malignos de los órganos digestivos	526	15
Enfermedades endocrinas y metabólicas	1943	64
Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	258	15
Enfermedades hipertensivas	429	13
Enfermedades de otras partes del aparato digestivo	1508	91
Total	4,664	198

Fuente: INEGI (2016).

2.14 Normatividad para el uso del agua residual en la agricultura a nivel mundial

Normatividad Internacional

En la agricultura se utiliza gran cantidad de agua, sin embargo en el uso y manejo de aguas residuales se deben tener en cuenta aspectos en la calidad e inocuidad del agua, para evitar riesgos en la salud humana debido a los microorganismos presentes en las aguas residuales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó guías y regulaciones internacionales para un uso seguro de aguas residuales, que especifican sobre calidad microbiológica de aguas residuales para irrigación mismas que se clasifican en tres categorías, a partir de sus niveles de parásitos y coliformes fecales presentes (virus, bacterias, protozoos y helmintos) (Tabla 11) (OMS, 1989).

Tabla 11. Directrices recomendadas sobre la contaminación microbiológica de las aguas residuales empleadas en agricultura

Categoría	Condiciones de aprovechamiento	Grupo expuesto	Coliformes fecales/100 mL ^a	Tratamiento requerido para la calidad microbiológica exigida
A	Riego de cultivos que comúnmente se consumen crudos, campos de deporte, parques públicos.	Trabajadores, consumidores, público	1.000 ^b	Serie de estanques de estabilización que permiten lograr la calidad microbiológica indicada o tratamiento equivalente.
B	Riego de cultivos de cereales, industriales y forrajeros, praderas y árboles.	Trabajadores	No se recomienda ninguna norma	Retención en estanques de estabilización por 8 a 10 días o eliminación equivalente de helmintos y coliformes fecales.
C	Riego localizado en la categoría B, cuando ni los trabajadores ni el público están expuestos.	Ninguno	No se aplica	Tratamiento previo según lo exija la tecnología de riego, pero no menos que sedimentación primaria.

^a. Durante el período de riego.

^b. Conviene establecer una directriz más estricta (< 200) coliformes fecales por 100 mL) para prados públicos.

Fuente: OMS (1989).

Normatividad Nacional

En México la normatividad para el reúso de aguas residuales está basada en las normas oficiales de carácter obligatorio tales como:

NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Para determinar la contaminación por patógenos se tomará como indicador a los coliformes fecales (Tabla 12).

Tabla 12. Límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes para México

Parámetro	Límite máximo	Tipo de agua
Coliformes fecales	1000-2000 NMP/100 mL	
pH	5-10	Descargas de aguas residuales
Temperatura	40°C	

Fuente: NOM-001-SEMARNAT-1996

NOM-069-ECOL-1994, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de componentes eléctricos y electrónicos (Tabla 13).

Tabla 13. Límites máximos de Conductividad Eléctrica

Parámetro	Límite máximo
CE	2500-3000 μ S/cm

Fuente: NOM-069-ECOL-1994

2.15 Presencia de *E. coli* en alimentos

Estas bacterias son agentes causales de epidemias, debido a la contaminación cruzada de alimentos, ya que es esparcida por medio de heces fecales, provocando en el humano, severos trastornos gastrointestinales, principalmente en niños y ancianos (Rodríguez, 2015). De acuerdo a Soto et al. (2016) *E. coli* se encuentra en cárnicos, lácteos, pescados, mariscos, bebidas, hielo y leguminosas. Sin embargo *E. coli* también se le ha encontrado en productos frescos como melones, tomates y chiles jalapeños producidos en México, con fines de exportación (Caballero,

2012), en diversos trabajos se ha encontrado la presencia de esta bacteria en otras frutas y hortalizas, principalmente en cebolla, rábano, cilantro y perejil (Rivera et al., 2009). Recientemente la OMS (2018) reportó un número creciente de brotes epidemiológicos por presencia de *E. coli*, mismo que se asocia al consumo de las coles de Bruselas, espinacas, ensaladas de col y lechuga.

2.15.1 *E. coli* como patógeno de interés en el cultivo de hortalizas

En 1885 Theodore von Escherich describió por primera vez a *E. coli* (Kamran et al., 2014). El hábitat principal de *E. coli* es el intestino de los animales de sangre caliente y es considerado un miembro fundamental de la flora facultativa normal del intestino y juega un papel importante en el mantenimiento de su fisiología, ya que tiene la función en el cuerpo humano de suprimir el crecimiento de peligrosas bacterias y contribuir a la síntesis de un apreciable volumen de vitaminas (Rodríguez, 2015).

Estas bacterias constituyen alrededor del 0.1 % de la flora normal del intestino (Kamran et al., 2014). Gracias a esta capacidad, muchos de los miembros de esta familia son de vida libre, mientras que otros son comensales de animales o plantas (Sousa, 2015). *E. coli* es una bacteria gram negativa de la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 14). Las enterobacterias se caracterizan por ser capaces de respirar en el ambiente exterior, por lo que son consideradas aerobias (Sousa, 2015).

E. coli se ha convertido en la actualidad, en uno de los tipos de bacteria enteropatógena de mayor preocupación en la industria alimenticia, debido a que se le ha catalogado como uno de los principales agentes causales de epidemias por contaminación de alimentos, ya que es esparcida por medio de heces, provocando en el humano severos trastornos gastrointestinales, principalmente en niños y ancianos (Rodríguez, 2015). Algunas cepas de *E. coli* pueden causar enfermedades extra-intestinales (infección del tracto urinario, bacteriemia y meningitis en los recién nacidos) y otras cepas son asociadas a gastroenteritis (Ochoa, 2011).

E. coli puede intercambiar material e información genética con otras bacterias como lo son *Shigella* spp.; *Salmonella* spp. y de esta manera generar variaciones en el tipo de enfermedades presentes en los humanos (Ochoa, 2011). *E. coli* representa un grupo muy diverso de bacterias. Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en la capacidad parasitaria que tienen en común, como lo es en función del factor de virulencia que presenta cada una de las cepas. Generalmente a las secreciones de tipo diarreico se asocian seis patotipos, conocidos colectivamente como *E.*

coli diarreogénica. En este sentido, la cepa *E. coli* que produce la toxina Shiga (STEC) es una de las más comúnmente asociadas a brotes de origen alimentario (Farfán et al., 2016).

2.16 Taxonomía y morfología

E. coli es una bacteria Gram-negativa (Tabla 14), anaeróbico facultativo y no esporulante. Las celdas son típicamente en forma de varilla, y tienen aproximadamente 2.0 µm de largo y 0.25-1.0 µm de diámetro, con un volumen de célula de 0.6-0.7 µm además puede vivir en alimentos y agua (Tabla 16) (Stenutz et al., 2006).

Tabla 14. Taxonomía de *E. coli*

Nombre común	<i>Escherichia coli</i>
Reino:	Procariotas
División:	Gracilicutes
Clase:	Escotobacteria
Orden:	Eurobacterias
Familia:	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>coli</i>

Fuente: Brooks et al. (2010).

Las cepas que poseen flagelos son móviles mismos que están distribuidos a lo largo de la superficie de la bacteria (Al-mohanna, 2011). *E. coli* tiene seis tipos de cepas descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherentemente difusa (DAEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Yacarini et al., 2019) (Tabla 15).

Tabla 15. Cepas de *E. coli*

Cepa	Características
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	La infección por <i>E. coli</i> enteropatógena es principalmente una enfermedad de lactantes menores de dos años. Esta enfermedad juega un papel más importante en los países en desarrollo, donde es la principal causa de enfermedad diarreica.
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Es una causa común de diarrea infecciosa especialmente en climas tropicales. La mayoría de casos ocurren en bebés y niños pequeños después del destete. Este patógeno puede expresar toxinas termolábiles y/o termoestables.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	Las cepas EIEC son bioquímicamente, genéticamente y patogénicamente relacionadas con <i>Shigella</i> spp.
<i>E. coli</i> enteroagregativa (CEEA)	La CEEA induce un daño leve pero significativo de la mucosa. Las características clínicas de la diarrea CEEA están cada vez mejor definidas en brotes y casos esporádicos.
<i>E. coli</i> de adherencia difusa (DAEC)	DAEC produce una adherencia difusa en el ensayo de células HEp-2. Se han llevado a cabo pocos estudios para describir adecuadamente la epidemiología y el aspecto clínico de la diarrea causada por este serotipo.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Es un agente etiológico de la diarrea con complicaciones potencialmente mortales. Causa colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. Los serogrupos de EHEC más comunes son: O4, O5, O16, O26, O46, O48, O91, O98, O111ab, O113, O117, O118, O119, O125, O126, O128, O145, O172 y O157.

Fuente: Stenutz et al. (2006).

2.16.1 Reacciones bioquímicas

E. coli tiene pocas exigencias nutritivas por lo que crece en medios comunes; fermenta la lactosa (bacilos coliformes y la glucosa), en condiciones anaeróbicas para la fermentación ácido mixta produce lactato, succinato, etanol, acetato y dióxido de carbono, produciendo gas hidrógeno en

bajos niveles, en condiciones anaeróbicas produciendo: lactato, succinato, etanol, acetato y dióxido de carbono (Al-mohanna, 2011).

5.16.2 Características coloniales

De acuerdo a Al-mohanna (2011) las características coloniales de *E. coli* son las que se aprecian en la Tabla 16.

Tabla 16. Características morfológicas de las colonias de *E. coli* en medios específicos

Temperatura 37°C por 24 hrs	Agar Mac Conkey	Agar Eosina Azul de Metileno
Tamaño (mm)	1	1
Forma	Circular	Circular
Color	Rosado	Brillo metálico
Elevación	Ligeramente aumentado	Convexo
Turbiedad	Opaco	Translúcido
Consistencia	Suave	Suave

Fuente: Al-mohanna (2011).

2.16.3 Estructura antigénica *E. coli*

E. coli incluye una vasta población de bacterias con diversidad tanto fenotípica como genética, además, sigue siendo las especies bacterianas con mayor variabilidad genética ya que sólo alrededor del 20 % de su genoma es común en todas sus diferentes cepas. La serotipificación de *E. coli* se encuentra basada en los antígenos somáticos (O) esta característica se debe por la presencia de diferentes azúcares y enlaces ésto contribuye a la variabilidad antigénica de la superficie celular de la bacteria, los bacilos son flagelares (H), también presentan polisacáridos capsulares (K) (Figura 4). Estas características pueden ser únicos para un serogrupo particular o pueden compartirse determinantes antigénicos, lo que da como resultado reacciones cruzadas con otros serogrupos de *E. coli* o incluso con otros miembros de la familia de Enterobacterias (Stenutz et al., 2006; Wang et al., 2007; Kamran, 2014).

Los antígenos O y K presentan propiedades antifagocitarias e inhibitoras de las sustancias bactericidas del suero y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas, cuyas síntesis está codificada por genes que se encuentran en plásmidos de elevado peso molecular (López y Guevara 2002).

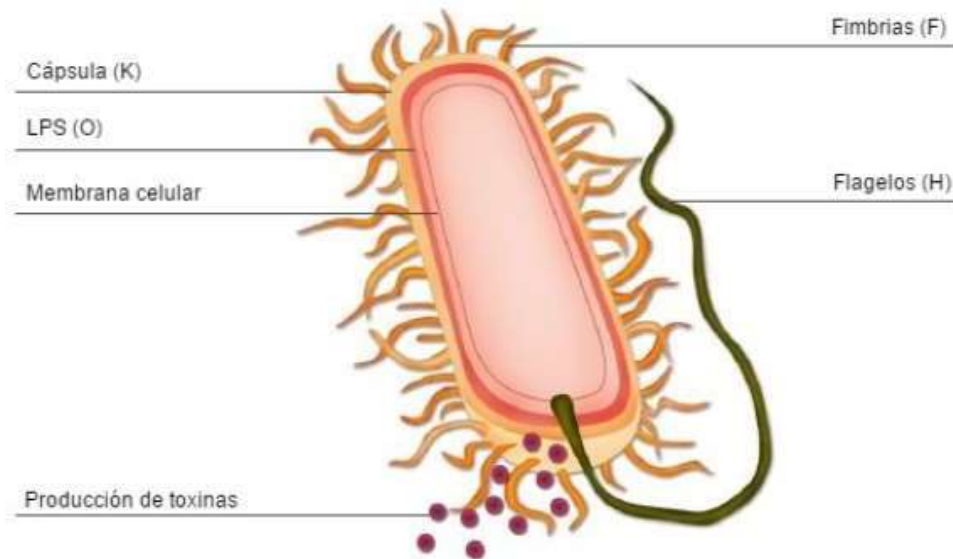


Figura 4. Morfología celular de la célula bacteriana de *E. coli* (Tomada de Bagginis, 2019).

2.17 *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 es reconocido como el serotipo más frecuente asociado a grandes brotes de hemorragia, colitis y síndrome urémico hemolítico (SUH) en muchos países (Fernández et al., 2012). Esta bacteria es productora de la toxina Shiga y causa un estimado de 73,480 enfermedades en habitantes cada año de los Estados Unidos de Norte América (Clawson et al., 2009). Por lo general se transmite a través del contacto directo con el reservorio de rumiantes o indirectamente a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados (Elhadidy et al., 2015).

El factor principal de virulencia de EHEC es la producción de uno o más tipos de toxina Shiga (Stx) (Stx1, Stx2 o sus variantes), su adherencia al epitelio intestinal y al intestino, además, el grado de adhesión intestinal ha sido correlacionado con la capacidad de causar enfermedad en humanos, infección por el SUH, con una dosis infecciosa mínima de 10 bacterias por gramo de alimento (Fernández et al., 2012). El periodo de incubación varía entre tres y ocho días, la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal (OMS, 2017). La definición de factor de virulencia es compleja, sin embargo ha contribuido al mejor entendimiento de la patogénesis bacteriana en los humanos, se trata de cualquier partícula o molécula que actúa sobre el hospedero para permitir la supervivencia bacteriana (Llamosas, 2016). Los síntomas en humanos son dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y poca fiebre. *E. coli* O157:H7 es el principal agente del SUH produciendo anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal (Farfán et al., 2016).

E. coli O157: H7 posee varios factores de virulencia como la isla de patogenicidad, el locus de eliminación del enterocito (LEE) que codifica genes reguladores adhesina, intimina, un sistema de chaperones, proteínas secretadas como el receptor de intimina, translocado Tir y secreción de tipo III (SST3) (Deng et al., 2004; Lai et al., 2013 y Kessler et al., 2015).

El SST3 es una nanomáquina que se ubica en la membrana de varias bacterias Gram negativas, que al entra en contacto entre bacterias y células huésped en forma similar a una jeringa que transfiere proteínas denominadas efectores desde el citosol bacteriano al citoplasma; la arquitectura de la jeringa se conserva a nivel estructural y funcional y admite la inyección en una gran variedad de huéspedes y tejidos (Puhar y Sansonetti, 2014).

2.17.1 Sistema de secreción de *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7, al ser una bacteria Gram negativa, emplea un sistema de secreción tipo III (T3SS) para administrar proteínas efectoras al citoplasma en las células huésped infectadas (Zhou et al., 2014). La mayoría de los sistemas de secreción están alojados en elementos móviles, incluidos transposones, plásmidos, islas de patogenicidad y fagos, *E. coli* es una de las bacterias más versátiles que adopta esta información genética mediante transferencia horizontal de genes (Navarro et al., 2019). Este sistema de secreción exporta proteínas afectoras fuera de la bacteria, que dan como resultado la creación de lesiones de fijación y borrado (A/E) en las células epiteliales del hospedero (Fernandez et al., 2016).

2.17.2 Interacción de *Escherichia coli* O157:H7 y las plantas

Las fuentes más comunes de contaminación microbiológica en las hortalizas son el agua de riego contaminada, esto debido a que en la superficie del suelo se encuentra disponible agua y nutrientes; indispensables para el crecimiento de *E. coli* O157:H7. La superficie de plantas y frutas suelen presentar carga estática o tienen textura microrugosa, incrementando ambos factores la posibilidad de contaminación bacteriana debido a que facilitan la adhesión y establecimiento de la bacteria patógena (Torres et al., 2016).

Estas bacterias pueden comunicarse por medio del *quorum sensing* el cual sirve para que detecten la cantidad de bacterias que se encuentran a su alrededor una vez que esto ha sucedido las bacterias inician un cambio de comportamiento multicelular, y de esta forma pueda comunicarse con las plantas para evadir la respuesta defensiva temprana de la planta, además de que los patógenos retrasan la expresión de factores de virulencia (Rojas, 2011).

Cuando una hortaliza está expuesta a bacterias, éstas tienden a unirse a la superficie de la planta, adhesión que toma un par de horas, sólo entonces, la adhesión se vuelve lo suficientemente fuerte como para resistir el lavado convencional, haciendo que su remoción sea mucho más difícil, de esta forma *E. coli* O157:H7 es capaz de entrar por las aberturas naturales en la epidermis de la planta, tales como las cavidades sub-estomatales de las hojas (Torres et al., 2016).

De acuerdo con Wan-Ying (2015) el primer paso para que ocurra una contaminación bacteriana en tejido vegetal es el contacto con el filoplano.

De acuerdo a Torres et al. (2016), los pasos para la interacción de *E. coli* O157:H7 con la planta son los siguientes:

- | | | |
|---|---|--|
| 1. <i>E. coli</i> O157:H7 expresa intimina y otras adhesinas. | { | Proteínas involucradas en la unión de <i>E. coli</i> tanto a superficies abióticas como el plástico y acero, y superficies vivas. |
| 2. Adhesión y borrado (A/E) | { | Las proteínas bacterianas localizadas en la membrana externa como lo son intimina y su receptor traslocado intimina (Tir). |
| 3. Codificación de intimina mediante el gen <i>eaeA</i> de la membrana externa. | { | Son necesarias para la adhesión entre la célula hospedera para producir la lesión de A/E, las cuales forman un pedestal rico en actina mediante el cual se mantiene la unión entre la bacteria y la planta.

Es uno de los factores de virulencia más importante de <i>E. coli</i> . La intimina está implicada en el proceso de fijación de <i>E. coli</i> O157:H7. |
| 4. Regulación de la intimina por el locus LEE. | { | La intimina está implicada en el proceso de fijación de <i>E. coli</i> O157:H7.

Su expresión se puede regular con el fin de responder a factores externos como la osmolaridad y pH. |
| 5. Las células de guarda se cierran y las bacterias quedan dentro de la planta. | { | Las bacterias quedan protegidas de la mayoría de los sanitizantes superficiales, lo que hace que la bacteria no pierda su capacidad de ser virulenta a humanos. |

2. 17.3 Interacción de *E. coli* O157:H7 y el hombre

Fuente: Kendall et al., 2007; Torres et al., 2007; Farfan y Torres, 2012; McWilliams y Torres (2014).

La infección por *E. coli* O157: H7 se presenta con amplio espectro de manifestaciones clínicas, incluyendo el SUH, esta bacteria es una de las principales causas de diarrea bacteriana principalmente en pacientes en edades extremas quienes tienen mayor riesgo de infección y complicaciones asociadas. Dicha situación es dada por el consumo de alimentos contaminados (Tarr et al., 2019).

La colonización EHEC O157:H7 en el intestino grueso de los humanos produce histopatología característica llamada lesiones de fijación y borrado (A/E). Los genes para la producción de lesiones A/E se transportan en una isla de patogenicidad denominada *locus* de borrado de enterocitos (LEE) (Sharma y Casey, 2014).

De acuerdo a Farfán et al. (2016) los pasos para llevar a cabo esa lesión de A/E son:

1. Adherencia la interacción de la bacteria con los enterocitos, la cual está mediada por la intimina y el T3SS. La unión de la intimina con su receptor Tir y a la nucleolina, contribuye en la fijación inicial de EHEC a la célula, lo que produce lesiones A/E características de este patotipo, mismas que participan en la formación de la lesión que codifican en la isla de patogenicidad LEE.

2. Toxina Shiga (Stx): Se encuentran los subgrupos Stx1 y Stx2, inmunológicamente diferentes y cada cepa puede presentar uno o ambos. Stx2 está más asociado a los casos de SHU. El ingreso a la célula y la distribución de la toxina hacia diferentes órganos son mediados por tres mecanismos principales: a) Macropinocitosis (MPC): permite la entrada de Stx cuando el receptor de las membranas globotriaosilceramida, que contribuye a la formación demicrocolonias y a la adhesión a células epiteliales de colon; b) Transcitosis: mediante vesículas la toxina pasa de un espacio extracelular a otro; c) Endocitosis: una vez se une la subunidad de la toxina al receptor se produce la invaginación de la membrana celular, la toxina es introducida al citoplasma; inhibe la síntesis proteica y conduce a la muerte celular (Figura 5).

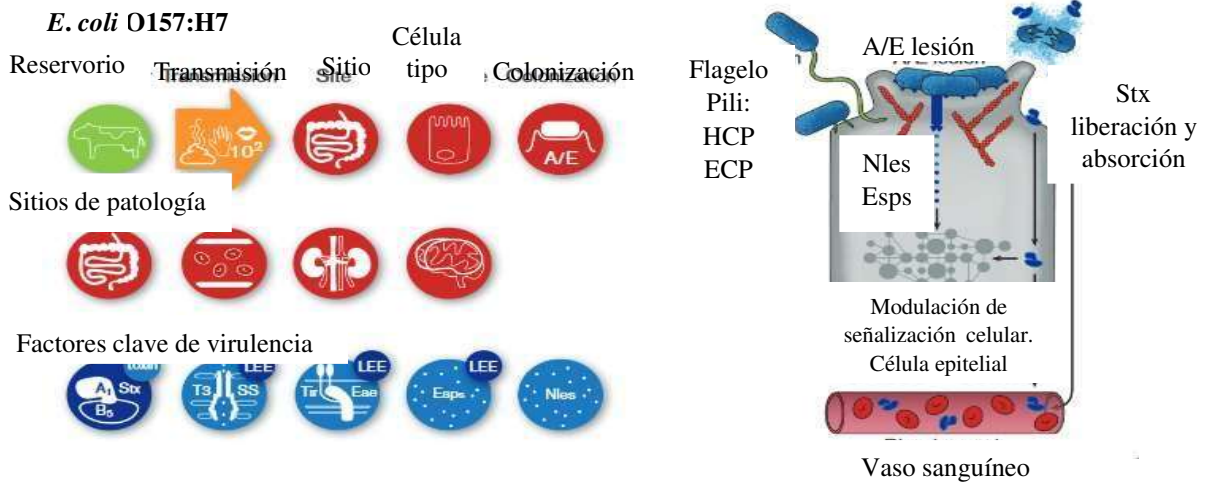


Figura 5. Patogenia de *E. coli* O157:H7 (Tomada y modificada de Gally y Stevens, 2017).

2.18 Métodos utilizados para el análisis microbiológico en alimentos

Para el análisis microbiológico de alimentos se utilizan métodos biológicos, bioquímicos, moleculares o químicos para la detección, identificación o enumeración de microorganismos, ésto con el fin de asegurar que el alimento cumpla con las normas legales (Varghese, 2016).

Métodos fenotípicos

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas, mediante el uso de características macroscópicas: morfología y hemólisis; apoyándose de medios de cultivo y requisitos de crecimiento en relación a atmósfera, temperatura y nutrición (Bou et al., 2011).

Métodos basados en tinción

Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando una lámina sometida a un proceso de tinción diferencial, con estos criterios morfológicos se encabezan las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana (Reynoso et al., 2015).

Recuento microscópico directo

De acuerdo a la norma NOM-112-SSA1-1994 este tipo de recuento se utiliza para determinar la cantidad de microorganismos de una muestra. Es un método que resulta ser bastante exacto debido a que tiene una dimensión que facilita el conteo de los microorganismos por cuadrante.

Técnica de siembra en medios sólidos

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizan distintos medios de cultivo como se puede observar en la Tabla 17.

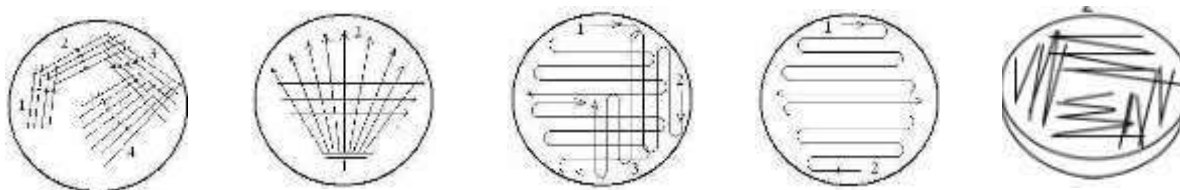
Tabla 17. Medios sólidos utilizados para el crecimiento de *E. coli*

Medios sólidos	Características
Mac Conkey	Es un medio diferencial y selectivo para el desarrollo de Enterobacterias. Es un medio que hecho a base de sales biliares en donde se desarrolla <i>E. coli</i> .
Rojo Bilis Violeta	Se utiliza para la enumeración e identificación presuntiva de microorganismos coliformes. Está hecho a base de peptona y lactosa, por lo cual se incluye el desarrollo de microorganismos Gram negativos, y se desarrolla <i>E. coli</i> .
Eosina Azul de Metileno	Se utiliza para el desarrollo de Enterobacterias. Es un medio que contiene peptona, por esto, es específico para el desarrollo de <i>E. coli</i> las cuales presentan un característico color verde brillante.

Fuente: Britania, 2017.

Siembra por estría

De acuerdo a la norma NOM-113-SSA1-1994, con asa de siembra, previamente esterilizada, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre un área pequeña de la superficie de la placa con agar nutritivo, en forma de estrías. Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de un cultivo que contenga elevado número de células bacterianas, que una vez incubadas, formen colonias puras (Figura 6) (Tomás, 2015).



E. Estría cruzada

B. Radiante

C. Forma de T

D. Continuo

E. Estría cruzada

Figura 6. Tipos de estriado en placa (Tomada y modificada de Seramix, 2013).

Siembra en superficie

Este método se utiliza para el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido; la siembra en superficie es colocar sobre la parte superior del agar el inóculo, esparciéndolo con el asa Drigalsky, para lograr el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Este método se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en la superficie del agar (Figura 7) (Tomás, 2015).

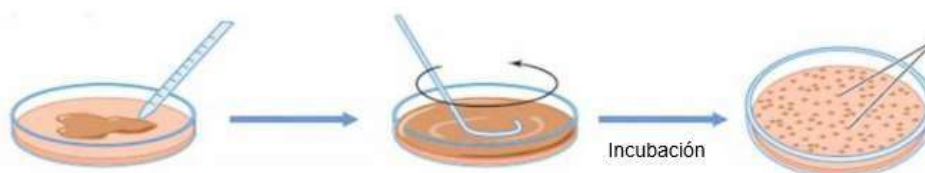


Figura 7. Siembra en superficie (Tomada y modificada de Docplayer, 2018).

Recuento en placa

El recuento de placa se utiliza para realizar los recuentos de coliformes y *E. coli* como indicadores de calidad microbiana y sirve como criterio importante para evaluar la calidad y presencia microbiana de varios alimentos (Parseelan et al., 2018).

Método del número más probable (NMP)

La técnica del número más probable o técnica de dilución en tubo, es un método estadístico que se fundamenta en la teoría de la probabilidad, para cuantificar la presencia de individuos bacterianos como *E. coli*. En él se preparan múltiples series de diluciones crecientes, con cada dilución se inoculan varios tubos que contienen el medio de cultivo (Camacho et al., 2009).

Métodos basados en pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos y la producción de compuestos coloreados, entre otros (Tabla 18) (García y Mendoza, 2014).

Tabla 18. Pruebas bioquímicas para identificación de *E. coli*

Nombre	Función
Agar hierro	Contiene glucosa, lactosa y sacarosa. Se producen cambios de color amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización. Permite la diferenciación de triple azúcar los organismos fermentadores de glucosa, lactosa y/o sacarosa. <i>E. coli</i> presenta coloración amarilla con producción de ácido y presencia de gas.
Urea	Los microorganismos que poseen actividad ureasa, actúan sobre la urea presente en el medio. Amoníaco alcaliniza el medio y el indicador hace que el medio vire de anaranjado-amarillo a rosa fuerte. <i>E. coli</i> da negativo.
Medio SIM (Indol)	Se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano y si la bacteria presenta movimiento. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa <i>E. coli</i> presenta indol y movimiento.
Rojo de metilo	El rojo de metilo es un indicador de pH. Actúa entre pH 4.2 y 6.3 variando desde rojo (pH 4.2) a amarillo (pH 6.3). Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido- mixta. <i>E. coli</i> da positivo.
Voges- Proskauer	Permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Si es así, se forma un producto intermedio (acetoína) que forma un complejo de color rojizo con el naftol. Se usa en la identificación a nivel de especie de bacilos entéricos gramnegativos <i>E. coli</i> da positivo.
Citrato de Simmons	Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. <i>E. coli</i> da negativo.

Fuente: García y Mendoza, 2014.

Métodos moleculares

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El método de PCR tiene la ventaja de ser un análisis rápido a nivel molecular en la detección de microorganismos patógenos (Ramírez et al., 2015). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) implica tecnologías moleculares basadas en la amplificación *in vitro* del ADN (Malorny, 2004). Esta técnica se basa en el principio de complementariedad de bases del ADN y en la participación de la enzima polimerasa que permite la extensión del fragmento a amplificar, agregando nucleótidos en secuencia complementaria al ADN molde por medio de un proceso cíclico que comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión para lograr la amplificación exponencial de la secuencia específica del gen 16 rARN (Palomino y González, 2014). El gen 16S rRNA se utiliza como marcador filogenético para evaluar la comunidad microbiana y la información filogenética en el dominante miembros de la comunidad pueden ser generados secuenciando el rARN 16S genes obtenido a través de PCR (Alam, 2014).

2.19 Normatividad para la determinación de la calidad microbiológica de alimentos en México

Las Normas Oficiales Mexicanas que regulan la calidad microbiológica en alimentos son:

NOM-109-SSA1-1994 Bienes y servicios. Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-112-SSA1-1994 Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

NOM-113-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales.

NOM-210-SSA1-2014 Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos en placa.

En la Tabla 19 se presenta un compilado de artículos científicos sobre el estatus sanitario en los últimos cinco años sobre el cultivo de lechuga irrigado con aguas residuales, en donde se muestra que es un tema vigente el estudio sobre la presencia de *E. coli* en el cultivo de lechuga.

Tabla 19. Estudios sobre *E. coli* en lechugas irrigadas con aguas residuales entre los años 2015 y 2019.

Autores	Título	Técnica utilizada	Resultados
Karaye et al., 2019.	Detection of <i>Escherichia coli</i> in Freshly Harvested Spinach Samples Collected from Five Different Markets in Zaria.	Crecimiento de <i>E. coli</i> en agar EAM. Pruebas bioquímicas convencionales.	Se aisló un total de 47.6 % de <i>E. coli</i> O157:H7 en espinaca perteneciente a mercados locales en Zaria.
Makkaew et al., 2017.	The influence of the microbial quality of wastewater, lettuce cultivars and enumeration technique when estimating the microbial contamination of wastewater-irrigated lettuce.	Conteo de Mesófilos Aeróbicos de acuerdo a International Standard Methods (ISO).	No se detectaron diferencias estadísticas ($p>0.01$) entre los conteos de <i>E. coli</i> obtenidos en las distintas partes de la lechuga.
Coniglio et al., 2016.	The Importance of the microbiological quality of ready-to-eat salads from a public health perspective.	Conteo de Mesófilos Aeróbicos de acuerdo a International Standard Methods (ISO).	Todas las muestras fueron positivas en concentraciones medias 10^6 - 10^7 UFC/g; 25 % fueron positivas para coliformes y 10 % para <i>E. coli</i> (concentraciones medias $<10^2$ UFC/g).
Kljujev et al., 2015.	Transmission of <i>E. coli</i> from contaminated irrigation water and soil to plant tissue	Cortes de la raíz por el método microscopía láser confocal, -PCR	Los resultados mostraron que los tratamientos con agua contaminada aumentó la cantidad de <i>E. coli</i> dentro de los estomas.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe contaminación por *E. coli* O157:H7 en los cultivos de lechuga irrigados con aguas residuales y si existe translocación de la misma a la parte interna de la planta?

IV. HIPÓTESIS

Los cultivos de lechuga irrigados con aguas residuales se encuentran contaminados por *E. coli* O157:H7 y compromete la inocuidad del cultivo ya que existe translocación de la misma a la parte interna de la planta durante el cultivo.

V. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar la incidencia de *E. coli* O157:H7 en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) irrigado con aguas residuales y estudiar su translocación hacia la planta.

4.2 Objetivos específicos

Analizar las características físicas y químicas así como la presencia de microorganismos patógenos presentes en el agua residual en el periodo Primavera-Verano y Otoño-Invierno.

Evaluar la presencia de *E. coli* O157:H7 en el tejido de lechuga por procedimientos morfológicos, bioquímicos y moleculares.

Confirmar la translocación de *E. coli* O157:H7 del agua de riego a la planta de lechuga e identificar la presencia de *E. coli* O157:H7 en raíz, tallo y hoja de la lechuga por métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Zona de estudio

El municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo se ubica en los paralelos 20°29' latitud (LA), 99°13' longitud (LO) y a 1,700 msnm (INAFED, 2012). Este municipio cuenta con un clima semiseco templado y una temperatura media anual de 18.5 °C, presenta suelos tipo Leptosol (INEGI, 2009). Cuenta con una superficie de 565.3 km², de las cuales 5, 000 ha son dedicadas al cultivo de hortalizas bajo riego. Estos predios son irrigados con distintos tipos de aguas de riego, como lo son: balnearios (termal), manantial, manantial con canal, pozo y residual. Estas aguas se encuentran distribuidas en forma aleatoria, a lo largo del municipio, mismas que abastecen las parcelas para la irrigación de los diferentes cultivos hortícolas entre los que figura el cultivo de lechuga. En conjunto con la sociedad de “Productores Agrícolas de Ixmiquilpan S.P.R. de R.L. de C.V. en el Municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo”, se llevaron a cabo salidas de reconocimiento para identificar y georreferenciar 38 sitios de cultivo e irrigación de unidades de producción de lechuga, con una superficie de 8 a 10 ha por predio (Figura 8).



Figura 8. Mapa del municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo, con puntos de monitoreo y muestreo de agua para riego (Tomada y modificada de Google Maps).

Etapa I. Identificación de *E. coli* O157:H7 en cultivo de lechuga irrigado con distintas aguas de riego en Ixmiquilpan, Hidalgo.

6.2 Muestreo de agua de riego

Las muestras de agua se tomaron con base a la norma NMX-AA-3-1980 para el muestreo en Aguas Residuales. Los muestreos iniciaron a partir de la derivación del Río Tula y del Río Alfajayucan hacia los diferentes sitios de cultivo de hortalizas. Se dio seguimiento al cauce de los canales principales y secundarios que irrigan las unidades de producción de lechuga (Figura 9 y 10). En cada sitio de muestreo se registraron las coordenadas geográficas con GPS GARMIN® *Etrex* 20x (Tabla 20). La muestra se tomó por triplicado, utilizando equipo de seguridad y protección personal. El agua de riego se tomó con tubos de ensayo estéril de 16 x 150 mm. Todas las muestras se preservaron en hielera a 4 °C hasta su análisis microbiológico en el laboratorio. El muestreo se realizó en dos ciclos, primavera verano y otoño invierno, en intervalos de 30 días, con 10 muestras promedio por muestreo con un total de 38 muestras por ciclo.



Figura 9. Canales de riego provenientes del DR 03 de Ixmiquilpan, Hidalgo.



Figura 10. Muestreo a canales de riego provenientes del DR 03 de Ixmiquilpan, Hidalgo.

Tabla 20. Localización geográfica de las áreas de muestreo de agua para riego de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo.

Sitio	Tipo	Coordenadas
Tollán	Balnearios	N 20°27.743' W 099°11.803
Dios Padre	Balnearios	N 20°27.750' W 099°11.679
El Alberto	Balnearios	N 20°24.705' W 099°12.836'
Dauthi Barrido	Balnearios	N20°26.956' W 099°11.510'
Dauthi	Balnearios	N 20°26.896' W 099°11.325
Las Cuevitas	Balnearios	N 20°26.869' W 099°11.233
Maguey Blanco	Balnearios	N 20°26.578' W 099°10.321
El Te-phé	Balnearios	N 20°26.479' W 099°10.018
Barranca Mz. Ñaño	Manantial	N 20°30.158' W 099°12.716'
Barranca los Remedios (Manantial)	Manantial	N 20°30.536' W 099°12.733'
El pocito de René	Manantial	N 20°30.536' W 099°12.733'
Carrizal	Manantial	N 20°31.223' W 099°12.970'
Barranca Mz. Ñaño	Manantial con agua de pozo	N 20°31'12.9 W 099°12' 42.5
Agustín Lara	Manantial con agua de pozo	N 20°29.681' W 099°12.575'
Área de horticultores	Pozo	N 20°07.108' W 099°09.006'
Bañul	Pozo	N 20°30.536' W 099°12.733'
Remedios	Pozo	N 20°32'426 W 099°12'252
Jesús de la Cruz Medina	Pozo	N 20°32.123' W 099°12.567'
La Heredad	Pozo	N 20°30.860' W 099° 13.602'
San Nicolás Invernadero Ma. Félix (1)	Pozo	N 20°30.653' W 099° 12.958'
San Nicolás Invernadero Ma. Félix (2)	Pozo	N 20°30.658' W 099° 12.966'
San Nicolás Invernadero Ma. Félix (3)	Pozo	N 20°30.623' W 099° 12.908'
San Nicolás Invernadero Ma. Félix (4)	Pozo	N 20°30.655' W 099° 12.961'
Av. Allende Mz. Ñaño	Pozo	N 20°30.513' W 099°12.936'
Pozo 1	Pozo	N 20°28.955' W 099°13.178'
Colonia del Oro	Pozo	N 20°29.077 W 099°13.630'
La Media Luna	Pozo	N 20°29.043 W 099°13.169'
El Alberto (inicio)	Residual	N 20°25.260' W 099° 13.892'
El Alberto (final)	Residual	N 20°30.655' W 099° 12.961'
Centinela	Residual	N 20° 27.079' W 099°12.711'
El Barrido	Residual	N 20°37.212' W 099°11.454'
El Tephe Pueblo Nuevo	Residual	N 20°26.960' W 099° 10.733'
La Loma de la Cruz	Residual	N 20° 28.942' W 099° 10.850'
La Joya	Residual	N 20° 29.488' W 099° 10.947'
El Arenalito	Residual	N 20°30.532' W 099° 10.594'
San Pedro y Vázquez	Residual	N 20°31.488' W 099° 10.266'
Pozo Mirador y Cerrito	Residual	N 20° 31.860' W 099° 11.576'
Remedios-Lázaro Cárdenas	Residual	N 20°30.700' W 099° 12.705'

6.3 Muestreo de lechuga

La zona de producción hortícola de Ixmiquilpan fue muestreada de acuerdo a los puntos inmediatos en donde se encontró la salida de agua de riego (muestras de lechuga irrigadas con agua residual y con agua de pozo) (Figura 11) y de cada sub-parcela se ubicaron 10 puntos de muestreo, distribuidos en un método de muestreo en zigzag, y cada punto de muestreo se georreferenció con un GPS GARMIN® *Etrex 20x*. En el sitio de muestreo, la toma de muestras de lechuga fue al azar por el método de Lobarda (2008). En la unidad de producción se ubicó el surco central, comenzando del borde del surco central (Figura 12), enseguida se caminaron 50 pasos hacia el interior de la parcela (Figura 13), enseguida sobre la trayectoria del mismo surco se contaron 10 plantas de lechuga y se tomó como muestra la décima planta. La lechuga se cortó con un cuchillo estéril en la base del tallo (Figura 14). Las muestras lechugas se preservaron en bolsas de polietileno estéril previamente etiquetadas y en hielera a 4 °C, hasta su análisis microbiológico. En la parcela, el mismo patrón de muestreo se realizó con cinco repeticiones, las cinco muestras de lechuga por parcela representaron una muestra compuesta de la unidad de producción. El tamaño de la muestra representativo en lechugas fue a partir del Manual Técnico de Muestreo de Productos Agrícolas y Fuentes de Agua para la Determinación de Contaminantes Microbiológicos del SENASICA (SENASICA, 2015). El muestreo se realizó en dos ciclos, primavera verano (bajo riego) y otoño invierno (temporal) del año 2017 al 2019, en intervalos de 30 días.



Figura 11. Canal de riego que abastece de agua residual a la parcela de lechuga.



Figura 12. Ubicación del surco central en la parcela de lechuga



Figura 13. Conteo de 50 pasos por el surco central en dirección al centro de la parcela y conteo de 10 plantas.



Figura 14. Corte de la décima planta de lechuga como muestra.

6.4 Análisis microbiológico

6.4.1 Identificación de *E. coli* en agua

De acuerdo a la norma NOM-210-SSA1-2014, en 100 mL de muestra de agua de riego para el cultivo de lechuga se agitaron vigorosamente, en seguida se inoculó en agua peptonada y se incubaron a 37 °C por 24 h, a este método establecido por la norma se le realizó una modificación, a partir de las muestras incubadas se realizaron diluciones 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , y 100 μ L de alícuota de cada dilución se transfirieron en medio Eosina Azul de Metileno (EAM) y Bilis Rojo Violeta (RBV), y con asa Drigalsky se sembró por triplicado. Como control se utilizó agua peptonada sin inóculo. Los aislamientos se incubaron a 37 °C por 24 h.

De cada placa del medio RBV se realizaron los conteos y del medio EAM se seleccionaron colonias con brillo metálico, de las cuales se resembraron en medio EAM para la realización del análisis molecular.

Las colonias sospechosas se diferenciaron por pruebas bioquímicas (Agar hierro triple azúcar TSI; Citrato de Simmons SIM; Rojo Metilo RM; Vogues Proskauer VP; Ureasa U; Medio Sim SIM) por 24 h a 37 °C.

6.4.2 Identificación de *E. coli* en lechuga

De acuerdo a la norma NOM-210-SSA1-2014, para la determinación de *E. coli* en tejido de lechuga, a partir de la muestra compuesta se pesaron 100 g de tejido fresco, el tejido se maceró en mortero estéril y del extracto se inocularon 3 mL en tubos con agua peptonada y se incubaron a 37 °C por 24 h. A partir del medio enriquecido, con asa bacteriológica se tomó una muestra de

cada tubo, y por estría cruzada se sembró por triplicado en EAM y RBV e incubó a 37 °C por 24 h. Como control se utilizó agua peptonada sin inóculo.

Las colonias sospechosas se diferenciaron por pruebas bioquímicas (Agar Hierro Triple Azúcar TSI; Citrato de Simmons SIM; Rojo Metilo RM; Vogues Proskauer VP; Ureasa U; Medio Sim SIM) por 24 h a 37 °C.

6.5 Identificación de *E. coli* O157:H7 en agua y tejido de lechuga mediante PCR

Para confirmar la presencia *E. coli* O157:H7, se realizó la extracción de ADN de la bacteria blanco con el kit de Qiagen®. La cepa de referencia utilizada como testigo positivo fue *E. coli* O157:H7 proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM-X. Los análisis de PCR fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la UAM-X.

La PCR se realizó en el termociclador TECHNE TC-5000®; en esta parte del proceso se llevó a cabo la amplificación de los Genes *STX 1* (VT1 a y VT1 b) y *STX 2* (VT2a y VT2b); las secuencias blanco fueron investigadas en BLAST.

VT1a (5' GAA GAG TCC GTG GGATTA CG 3')

VT1b (5' AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA 3')

VT2a (5' TTA ACC ACA CCC CAC CGG GCA GT 3')

VT2b (5' GCT CTG GAT GCA TCT CTG GT 3')

Todos los ensayos de PCR se realizaron con volúmenes finales de:

Agua	7 µL
ADN	1.5 µL
Primers	2 µL
Master mix	12.5 µL

Las diferentes fases y el número de ciclos utilizados para la realización de PCR se representan en la Tabla 21.

Tabla 21. Fases y ciclos de los genes productores de toxina STX 1 y STX 2 para PCR

	STX 1	STX 2
Desnaturalización	5 min 95°C	5 min a 94°C
Amplificación durante 30 ciclos	Desnaturalización: 1 min 95 °C Unión de los cebadores: 1 min a 52 °C Elongación: 1 min a 72 °C	Desnaturalización: 1.5 min 94 °C Unión de los cebadores: 1 min a 55 °C Elongación: 1 min a 72 °C
Elongación	5 min a 72 °C	4 min a 72 °C
Conservación de la muestra	4 °C	4 °C

El producto de la PCR se observó con electroforesis en gel de agarosa al 1 % y la separación de bandas se corrió a 50 voltios por 45 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se observaron en un fotodocumentador con luz ultravioleta (UV) ChemiDoc XRS marca Bio-Rad®.

Etapa II. Translocación, detección e identificación de *E. coli* O157:H7 en plantas de lechuga

6.6 Diseño experimental para evaluar translocación bacteriana

En condiciones controladas se evaluaron dos modelos biológicos, los cuales consistieron en evaluar un total de 64 plántulas de lechuga de la variedad italiana (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*), proporcionadas por la sociedad de productores agrícolas de Ixmiquilpan S.P.R. de R.L. de C.V., las cuales provenían de semilla certificada. Estas plántulas se mantuvieron en dos sistemas de cultivo semihidropónico, estos sistemas fueron elegidos debido a que permiten que la raíz de las plantas absorba todos los elementos necesarios de las soluciones de nutrientes y de inóculo. Se realizaron modificaciones en la metodología, en cuanto a la forma de realizar las inoculaciones a las plantas, utilizándose agua peptonada en lugar de agua destilada estéril debido a que este medio de enriquecimiento es favorable para el desarrollo de *E. coli* (Abdella, 2007; Keller et al., 2014; Kljujev et al., 2015; Delaide, 2016; Makkaew et al., 2017; Soares, 2018).

a) Estructura de la película del nutriente (NFT)

Las plántulas se colocaron en una canastilla de plástico de 75 mm x 46 mm de diámetro, con la cual se aseguró la acción capilar para atraer el agua y estimular la salida de las raíces en crecimiento, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% y alcohol al 50%. En cada serie se colocaron 20 L de agua destilada estéril con 20 g de solución nutritiva marca Hydro Enviroment[®] un fertilizante inorgánico en polvo para cultivo de lechuga hidropónica, el agua con la mezcla nutritiva se mantuvo en circulación constante con ayuda de una bomba de agua sumergible 1200/900 LPH y, a su vez, con un temporizador electrónico digital se controlaron los ciclos de recirculación de la solución nutritiva, considerándose 13 ciclos de tres minutos al día. Diariamente se realizó un monitoreo de pH y conductividad eléctrica (CE). También se llevó registro de temperatura y humedad relativa.

El tratamiento consistió en un testigo negativo: 18 plantas de lechuga con agua peptonada; testigo positivo: 18 plantas de lechuga con agua peptonada inoculada con 10^6 UFC/mL de *E. coli* O157:H7.

b) Bandeja flotante

Las plántulas se colocaron en gradillas de metal sobre una solución nutritiva, la cual se reemplazaba cada 48 h y mantener el nivel adecuado de oxigenación. En cada bandeja se colocaron 4 L de agua destilada estéril con 4 g de solución nutritiva marca comercial Hydro Enviroment[®] un fertilizante inorgánico en polvo para el cultivo de lechuga hidropónica.

Para ambos modelos se tuvieron dos tratamientos, en intervalos de 48 h las inoculaciones se realizaron en condiciones óptimas para el desarrollo de las plántulas, los cuales consistieron en sumergir las raíces de las plántulas en agua con suspensión bacteriana de 10^6 UFC/mL de *E. coli* O157:H7. Las evaluaciones e inoculaciones se realizaron durante tres semanas.

El tratamiento consistió en un testigo negativo: 18 plantas de lechuga con agua peptonada; testigo positivo: 18 plantas de lechuga con agua peptonada inoculada con 10^6 UFC/mL de *E. coli* O157:H7.

Para hacer la corroboración de la presencia de *E. coli* O157:H7 se realizó la metodología de la norma NOM-110-SSA1-1994.

La cepa de *E. coli* O157:H7 fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM Xochimilco.

6.7 Preparación del inóculo

Para la inoculación bacteriana la cepa de *E. coli* O157:H7 se reactivó en Agar Soja Tríplico (TSA), se incubó a 37° C por 24 h. A partir de colonias bacterianas de 24 h se realizó un raspado y las células bacterianas se suspendieron en 3 L de agua peptonada 0.1 % y se verificó por medio de un espectrofotómetro BECKMAN COULTER® DU 730, enseguida se cuantificó hasta obtener el inóculo de 0.08 a 0.1 absorbancia (Abs) y alcanzar una concentración de 10⁶ UFC/mL.

6.8 Evaluación de la presencia de *E. coli* en tejido

A partir de los 7 y 14 días después de la inoculación se colectaron muestras de hoja, tallo y raíz. El material fue colectado de acuerdo a la norma NOM-109-SSA1-1994. Para la preparación de las muestras se utilizó la técnica descrita por la norma NOM-110-SSA1-1994, de la cual se realizó la adecuación de macerar en bolsas plásticas con cierre 1.0 g de raíz, 1.0 g de hoja y 1.0 g de tallo con agua peptonada al 0.1 %. De la mezcla obtenida se tomaron 100 µL para realizar siembra directa por duplicado en placas con agar EAM y RBV, mismas que se incubaron a 37 °C por 24 h. Después del tiempo de incubación se realizó el conteo de colonias positivas para *E. coli* O157:H7.

6.9 Análisis estadístico de los datos

Etapa I

En total se muestrearon 38 diferentes cuerpos de aguas de riego, sin embargo, por cuestiones administrativas no fue posible tener los mismos puntos de muestreo para ambas épocas, faltando un punto de muestreo en O-I y dos puntos de muestreo en P-V.

El diseño experimental realizado fue un estudio descriptivo longitudinal, debido a que este estudio se basa en la realización de dos mediciones. En esta primera etapa el estudio se orientó a mostrar las diferencias presentes en dos periodos primavera-verano (P-V) y otoño-invierno (O-I), donde se describe de manera cuantitativa las características fisicoquímicas de las aguas de riego (balneario, manantial, manantial con canal, pozo y residual).

Los datos se transformaron a su forma logarítmica, enseguida fueron evaluados por un ANOVA ($p < 0,05$) y a partir de ello se generaron gráficos y cuadros, para analizar cuantitativamente y confirmar las características de la calidad de las aguas de riego en las distintas épocas de muestreo, de los microorganismos patógenos encontrados y la presencia de microorganismos en el cultivo de lechuga.

Para la comparación de medias, a partir de los análisis microbiológicos en agua de riego para el cultivo de lechuga se utilizó Tukey al 5 %, y para el análisis microbiológico en lechuga se utilizó T-Student por la cantidad de datos. Los promedios y desviación estándar se corrieron en Excel 2013, para comprobar se utilizó JMP V8 y en el mismo se realizaron las pruebas para la comparación de medias.

Etapa II

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de lechuga en condiciones controladas, al que se sometió a un tratamiento con 64 plántulas. El muestreo implicó la colecta de seis plantas por semana para cuantificar en placas las UFC/g. Los resultados fueron evaluados por un ANOVA ($p < 0,05$). Para la comparación de medias se utilizó T-Student por la agrupación de datos. Los promedios y desviación estándar se corrieron en Excel 2013, para comprobar se utilizó JMP V8 y en el mismo se realizaron las pruebas para la comparación de medias.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I

7.1 Características físicas de las aguas de riego

En Ixmiquilpan, Hidalgo existen distintos tipos de agua utilizadas para la irrigación de cultivos de lechuga como son: aguas residuales, manantial, pozo y balneario, pueden presentar una contaminación física, química y microbiológica. Es sabido que el uso de aguas residuales es una excelente alternativa para la agricultura, pero también es un riesgo inminente por ser una fuente de contaminación microbiana en productos frescos tales como las hortalizas. La carga microbiana en el agua depende de diversas variables fisicoquímicas, entre ellas, el potencial de hidrógeno (pH), conductividad eléctrica (CE) y temperatura (°C) que son importantes en la proliferación de los patógenos (Morales-Durán et al., 2018 y Rojas et al., 2016). Por tal razón, se consideraron evaluar los indicadores antes mencionados, ya que influyen en la permanencia y sobrevivencia de microorganismos en el agua de riego. A continuación se presentan los resultados de los valores medios obtenidos en las aguas residuales, manantial, manantial con pozo, pozo y balneario destinadas al riego para el cultivo de hortalizas frescas.

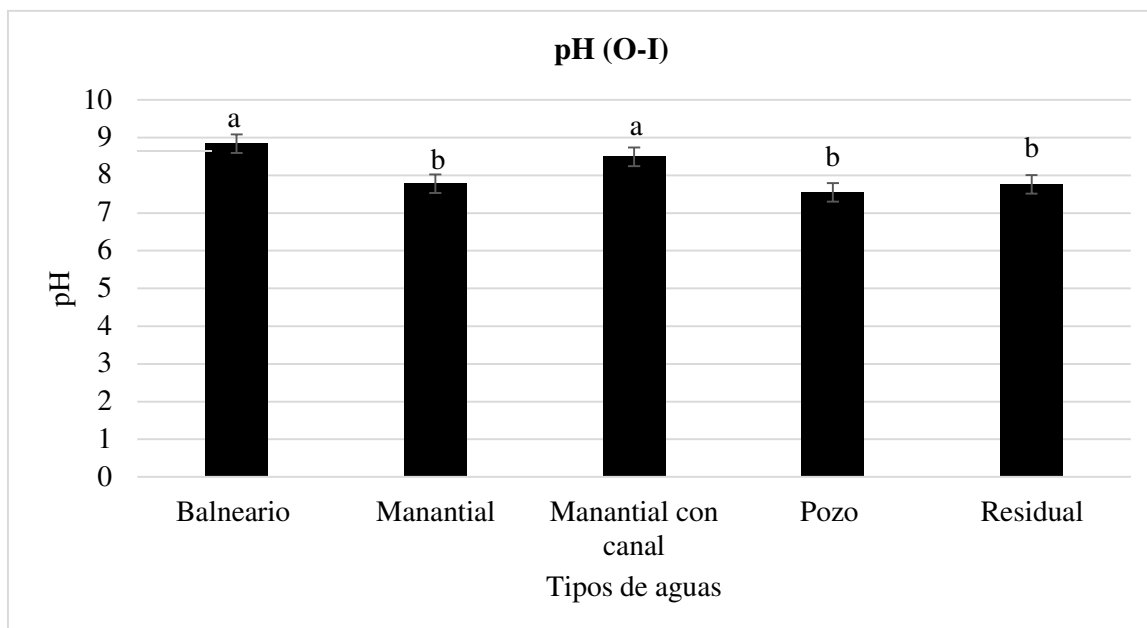
Potencial de hidrógeno (pH)

El pH del agua de riego es un factor importante que determina el desarrollo de las comunidades microbianas presentes en el agua de riego debido a que presentan mayor sobrevivencia los patógenos. En Tabla 23 se observa que las aguas de riego de Ixmiquilpan, Hidalgo analizadas presentaron diferencias estadísticas significativas en las mediciones de pH. Los valores arrojados en esta investigación oscilaron entre 4.3 y 6.8 para el ciclo P-V y 7.5 y 8.8 O-I (Figura 15 y Figura 16). El límite permisible de pH, de acuerdo a la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 varía en una escala de 5 a 10.

En las figuras 15 y 16, se aprecia que las aguas de riego en el período de primavera-verano (P-V) presentaron valores ácidos y en la temporada de otoño-invierno (O-I) los valores fueron alcalinos, esta leve alcalinidad indica la presencia de sales básicas débiles en el suelo (Abdul, 2002). En las aguas de balneario se presentaron los rangos más bajos y altos en comparación al resto de las muestras, presentando un pH de 5.8 en el período de P-V hasta 8.8 en el período O-I.

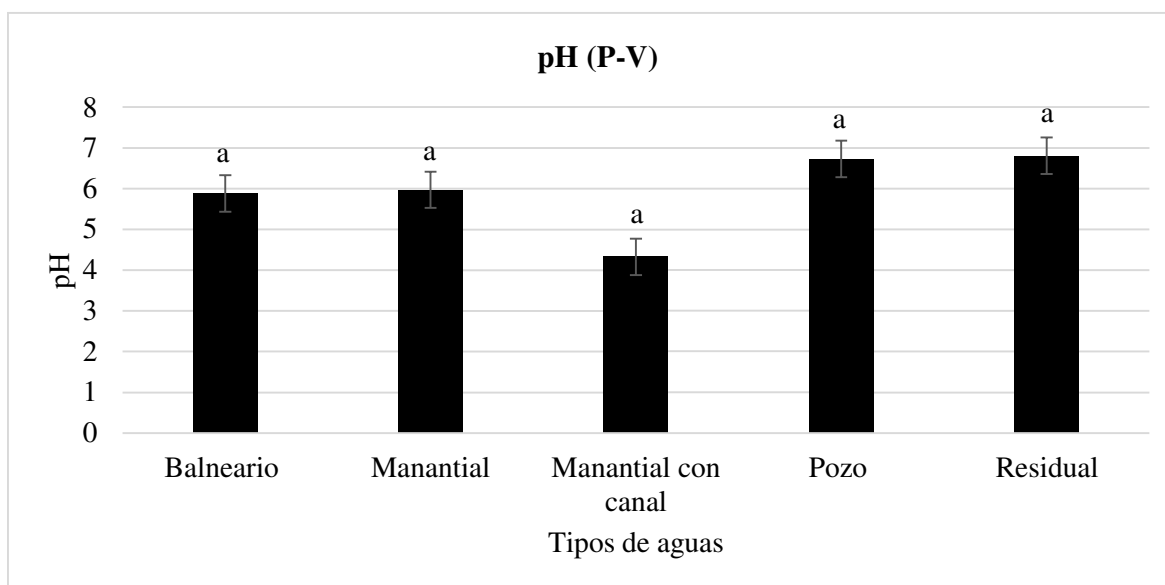
Todos los valores se encontraron dentro de los límites establecidos por la norma NOM-001-SEMARNAT-1996. De acuerdo a la FAO (2017) y con base en los parámetros de calidad del

agua de riego de Ixmiquilpan, Hgo. Las condiciones de pH de las diferentes aguas de riego son óptimas para el desarrollo de *E. coli* quien prolifera en pH con nivel de 4.4 a 10 (FAO, 2019).



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 15. Los datos presentados indican el promedio de pH en las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan, Hidalgo durante el ciclo agrícola O-I.



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 16. Los datos presentados indican el promedio de pH en las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan, Hidalgo durante el ciclo agrícola P-V.

Es probable que las diferencias significativas que existen para las aguas de riego en ambas épocas (P-V y O-I) se deba a las condiciones edáficas por las que atraviesa la corriente de estos tipos de aguas de riego (Ortega et al., 2010). Dentro de estas condiciones edáficas que pudieron alterar los niveles de pH en cada uno de los sitios de muestreo es la presencia de metales pesados en el suelo, así como las zonas con flora las cuales presentan contenidos altos de carbono y esto hace que el pH cambie (Aguirre et al., 2018).

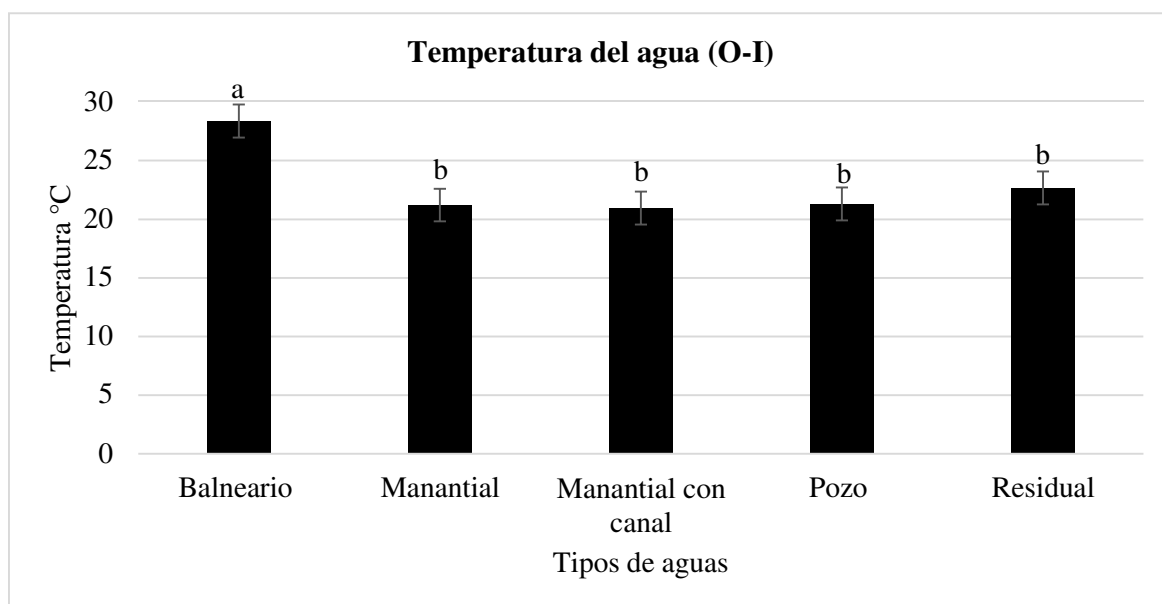
En estudio realizado en Panamá, midieron la calidad fisicoquímica y microbiológica proveniente de un río, donde los valores de pH variaban de acuerdo a la época del año (O-I 6-7.66 y P-V y 7.21-7.84) (Him, 2019), en comparación, con el presente trabajo, los valores de pH en agua residual son altos, sin embargo, todos ellos oscilan en un intervalo de 6 a 8.5. Estos resultados contrastan con lo reportado por Caicedo et al. (2019) que al estudiar la calidad de las aguas del río San Pablo en Ecuador, reportaron que el pH presentó valores de 6-8.5, en esta zona, los investigadores no encontraron diferencia de acuerdo a la época de muestreo, al igual que Abakpa (2013), en una investigación realizada en Nigeria, al realizar las comparaciones de los valores de pH en ambas épocas del año no observaron diferencias significativas, a pesar de que cada país presenta distintas condiciones ambientales, en ambas zonas no existió una diferencia significativa de pH.

En comparación con el presente estudio, la diferencia podría deberse a las distintas condiciones edáficas y climáticas de cada región, de esta manera, es que las comunidades microbianas como *E. coli* se encontraron presentes en ambas épocas en donde el mayor recuento de estos patógenos fue en la temporada de lluvias.

Los diferentes valores de pH se deben a procesos como flora residente y su muerte, fotosíntesis, respiración, exposición a la temperatura del aire, eliminación de desechos industriales, geología y contenido mineral de un área de captación, drenaje de minas ácidas, escorrentía agrícola, concentración de dióxido de carbono en la atmósfera que afecta mediante la precipitación (lluvia ácida) (Rogbesan, 2002; Reuben et al., 2018).

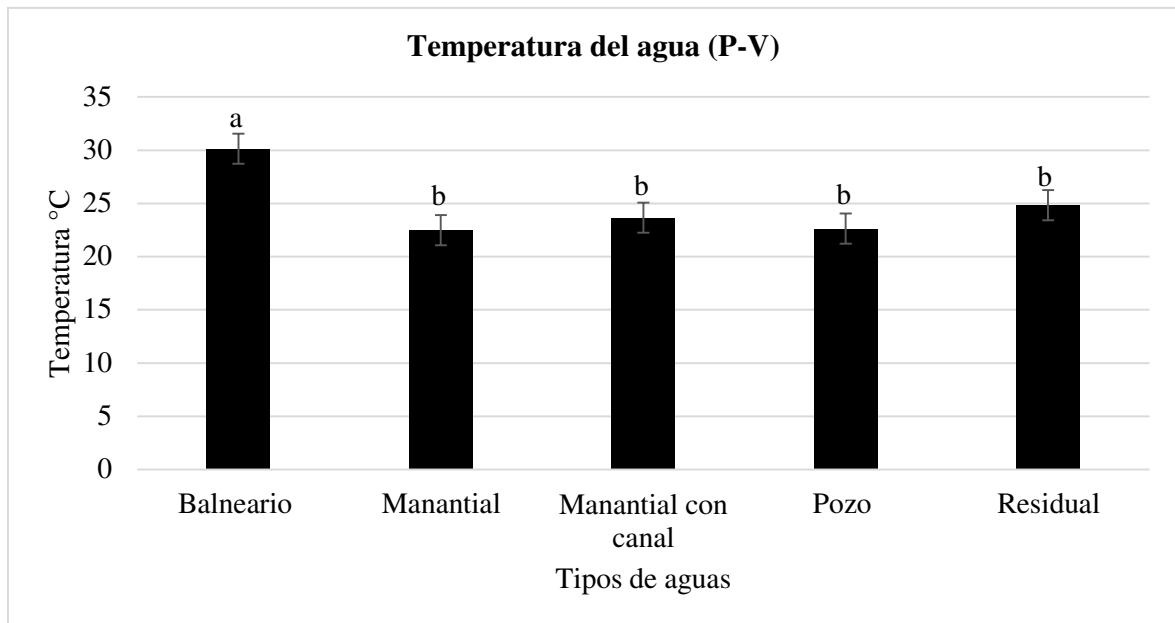
Temperatura del agua

Evaluar la presencia de *E. coli* para la calidad del agua ha sido aceptado en países de clima templado, debido a factores como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Larrea et al., 2013). En la Tabla 23 se observa que las aguas de riego de Ixmiquilpan, Hidalgo mostraron diferencias estadísticas significativas en la temperatura. Los valores proyectados en esta evaluación fluctuaron entre 22.6° y 30.1 °C para el ciclo P-V y 20.9° y 28.3 °C O-I (Figura 17 y Figura 18). El límite permisible de la Temperatura, de acuerdo a la NOM-001-SEMARNAT-1996 es de 40 °C.



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 17. Los datos presentados indican el promedio de temperatura de las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de O-I.



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 18. Los datos presentados indican el promedio de temperatura de las aguas de riego para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de P-V.

Bustamante et al. (2008) mencionan que los caudales bajos y la escasa cubierta vegetal, son los que determinan las altas temperaturas del agua tal como se muestra en la Figura 19.

El caudal de las aguas de los balnearios de Ixmiquilpan, Hgo., es bajo, la escasa flora y las altas temperaturas del ambiente propician que la temperatura del agua incremente ($30.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ época P-V), mientras que en O-I el caudal de las aguas de balneario no baja y se encuentra abundante presencia de flora, durante esta temporada la temperatura del agua se encuentra en $28.3\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 19. Salida de aguas del balneario en Ixmiquilpan, Hidalgo.

Los resultados demuestran que la temperatura más alta se presentó en la época de P-V en aguas de balneario con 30.1 °C, mientras que, en el período de O-I las aguas de manantial con agua de canal presentaron la temperatura más baja con 20.9 °C dicha temperatura es óptima para el desarrollo y permanencia de *E. coli*. Valores similares reportados por Abakpa et al. (2015) reportan que los valores de temperatura del agua presentaron diferencias significativas, registrando un mayor valor en la época de P-V (27.19 °C) que en O-I (25.26 °C), al igual que un estudio realizado en la cuenca del Río Little en Georgia. Haley et al. (2009) reportan que la temperatura se correlaciona positivamente con la prevalencia *Salmonella* en concentraciones significativamente más altas durante la época de P-V, la cual era de 25.9 °C.

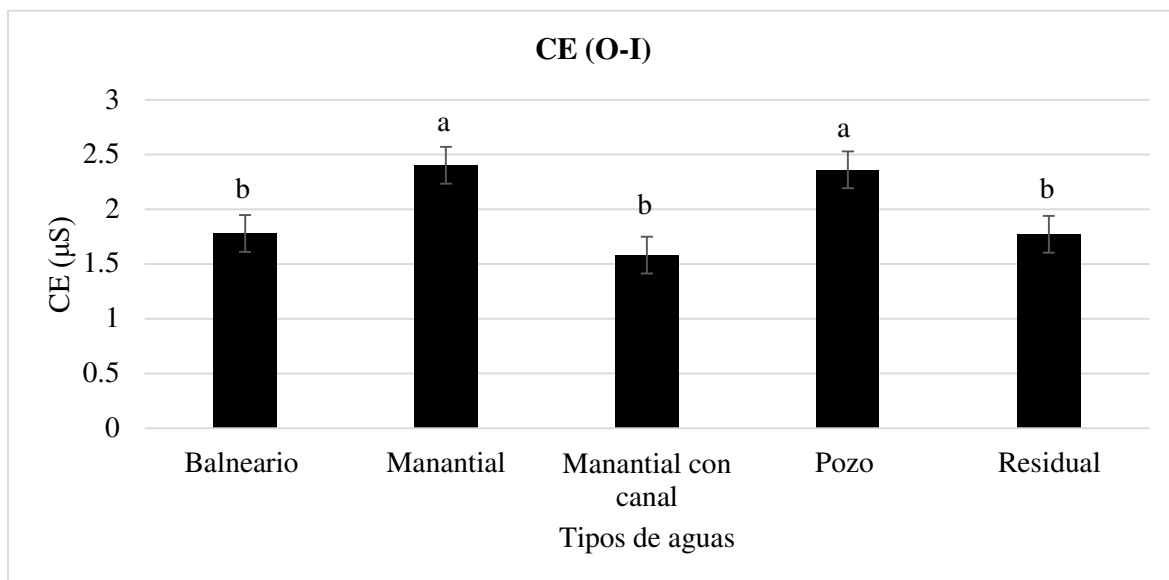
En la Figura 17 y Figura 18, se observa que el parámetro de Temperatura se encuentra dentro del rango establecido en la norma NOM-001-SEMARNAT-1996, lo que indica que no existen temperaturas elevadas que puedan contribuir al aumento de sales y aceleración de procesos de putrefacción, sin embargo, dentro de estas aguas de riego *E. coli* puede estar presente, pero no con altos niveles de carga bacteriana (Carmentaty et al., 2009), aunado a esto, dichas temperaturas sí son óptimas para el desarrollo de patógenos las cuales están entre 21° y 40° C (USDA, 2017) como *E. coli*, quien prolifera en un intervalo de temperatura de 7° a 50° C (WHO, 2018), además, Gu et al. (2013) y Luo et al. (2015) en estudios similares realizados al sur de Georgia indicaron que *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* presentaron un patrón estacional para su prevalencia, con niveles elevados en meses con temperaturas más altas.

Conductividad eléctrica (CE)

La CE es uno de los parámetros más importantes dentro de las determinaciones de la calidad de agua para riego, debido a que presenta valores elevados de acuerdo a la cantidad de impurezas que se encuentran presentes en el agua, como la concentración de sales solubles, sustancias disueltas y productos químicos y minerales. El incremento de temperatura favorece los procesos de descomposición de materia orgánica y por consiguiente mineralización, lo que favorece el desarrollo de bacterias patógenas como *E. coli* (Narsimha et al., 2013). De acuerdo a Solís y Zuñiga (2017), de que no se hayan obtenido temperaturas altas del agua pudo ser un factor para que la CE en las aguas de riego no presentaran valores altos y se encontraran dentro de los límites establecidos por la norma NOM-069-ECOL-1994 la cual establece un parámetro límite de 3000 µS/cm.

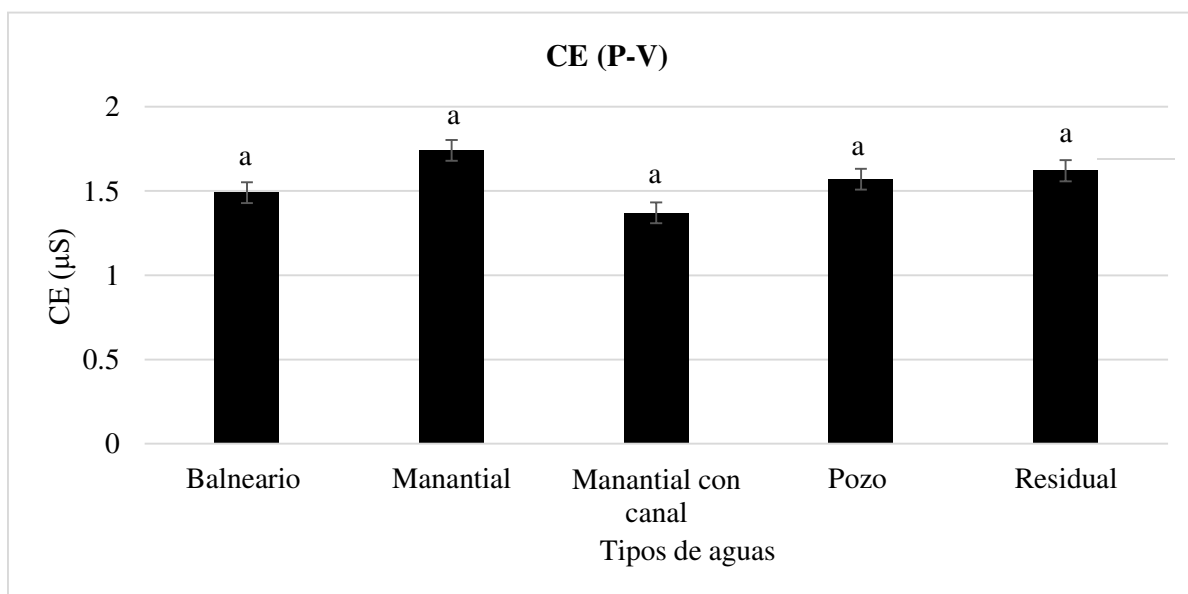
Es probable que los rangos de CE no se encontraron elevados en los cuerpos de agua muestreados y analizados. En el estricto sentido del análisis estadístico en la Tabla 23 se observa que los

cuerpos de agua de riego de Ixmiquilpan, Hgo. mostraron diferencias estadísticas significativas en la CE. Los valores determinados en esta valoración fluctuaron entre 1370 y 1740 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para el ciclo P-V y 1580 y 2400 $\mu\text{S}/\text{cm}$ O-I (Figura 20 y Figura 21), estos valores variaron debido a la presencia del total de sólidos disueltos (Pathak et al., 2011).



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 20. CE en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hidalgo, para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de O-I.



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 21. CE en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hidalgo, para el cultivo de lechuga de Ixmiquilpan Hidalgo durante el ciclo agrícola de P-V.

El periodo de O-I presentó los valores más altos de CE, a pesar de ello todos los valores se encuentran dentro de los límites establecidos por la NOM-069-ECOL-1994. Estos valores que variaron el ciclo agrícola O-I pueden deberse al incremento de contaminación del agua por la acción del lavado, lixiviación de la lluvia y de la escorrentía agrícola, que transfiere contaminación superficial (Narsima et al., 2013). En la Figura 20 y Figura 21 se muestran los valores obtenidos de CE, valores que en las aguas de pozo presentó un incremento, en el periodo P-V presentó 1570 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y en el periodo O-I 2360 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Abakpa (2013) en un trabajo realizado sobre la calidad del agua de riego, reporta que los valores de CE en el agua mostraron una diferencia significativa de acuerdo a la época del año, siendo la época de P-V (1733.21 $\mu\text{S}/\text{cm}$) la cual presentó valores más altos a diferencia de la época de O-I (8869 $\mu\text{S}/\text{cm}$), estos valores fueron similares a los reportados en el presente trabajo, debido a que en la época O-I los valores de CE fueron más altos en esta época. Estos valores de la CE pueden elevarse debido a las actividades antropogénicas y procesos geoquímicos de la región como lo son las rocas, el tipo de suelo, los sedimentos y el agua (Sánchez-Pérez y Trémolières, 2003; Ravindra y Garg, 2007). En el presente trabajo se apreció que la CE se encontró baja durante la época de P-V, lo cual podría deberse al efecto de dilución como resultado de un mayor volumen de agua en el río debido al aumento de la precipitación. Sin embargo, en la estación O-I no se presenta un efecto de dilución, se aprecia una evaporación debido a la época de secas (P-V) en donde las temperaturas oscilaban entre los 22.4° y 31.1°C, lo cual puede conducir a mayores niveles de concentración de iones disueltos, obteniendo una correlación positiva y significativa con los niveles de microorganismos presentes (Edokpayi, 2018; Caicedo et al., 2019).

También Sakinnoma et al. (2013) mencionan que la concentración de sal se puede controlar cambiando los volúmenes de agua de riego para favorecer continua percolación. De acuerdo a Nazar (2007) indica que las bacterias forman biopelículas, las cuales están hechas de una estructura resistente, lo que facilita su adaptación y sobrevivencia a las aguas con CE elevada, lo

que no impide su desarrollo, además, estas biopelículas comienzan colonizando en superficies ricas en carbono de los medios del suelo, como raíces y minerales de arcillas, en donde los espacios entre el suelo crean numerosos microhábitats y proporciona un espacio vital simultáneo de microorganismos que ocupan.

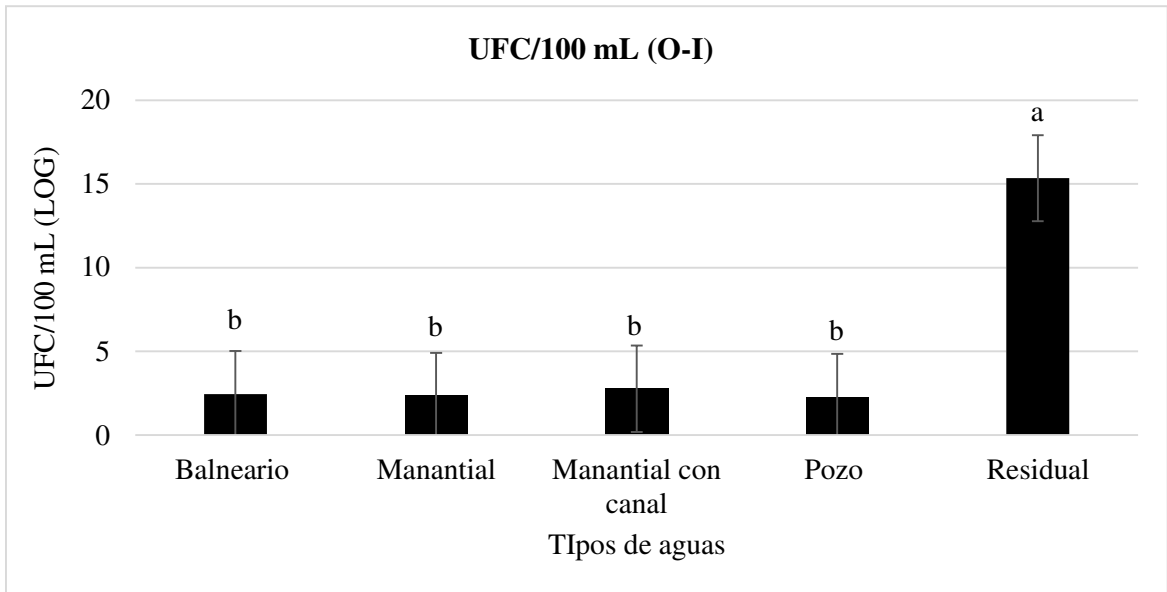
La CE se emplea como indicador de calidad ya que el alto contenido de sales en el agua reduce la productividad agrícola, al afectar a cultivos sensibles como cebolla, guisante, zanahoria, alfalfa y lechuga (Morales-Durán et al., 2018). Las raíces de las plantas al absorber el sodio y transportarlo a sus hojas puede acumularse y provocar lesiones, además, el agua de riego con alto nivel de sal de sodio puede ser particularmente tóxico si se aplica a las hojas de las plantas (Olubango y Alade, 2018). El exceso de sales generalmente afecta el crecimiento vegetal por la tensión osmótica en el suelo, lo que implica la absorción excesiva de sales del suelo y genera un efecto tóxico en las verduras (Proadhan et al., 2018). La salinización afecta el metabolismo de los organismos presentes en el suelo, esta reducción de población microbiana se debe a que estos microorganismos necesitan mantener el equilibrio osmótico entre el citoplasma y el medio ambiente (Maganhotto y Francisconi, 2014).

7.2 Análisis microbiológico

Niveles de carga bacteriana en aguas de riego (residuales, pozo, manantial y balneario)

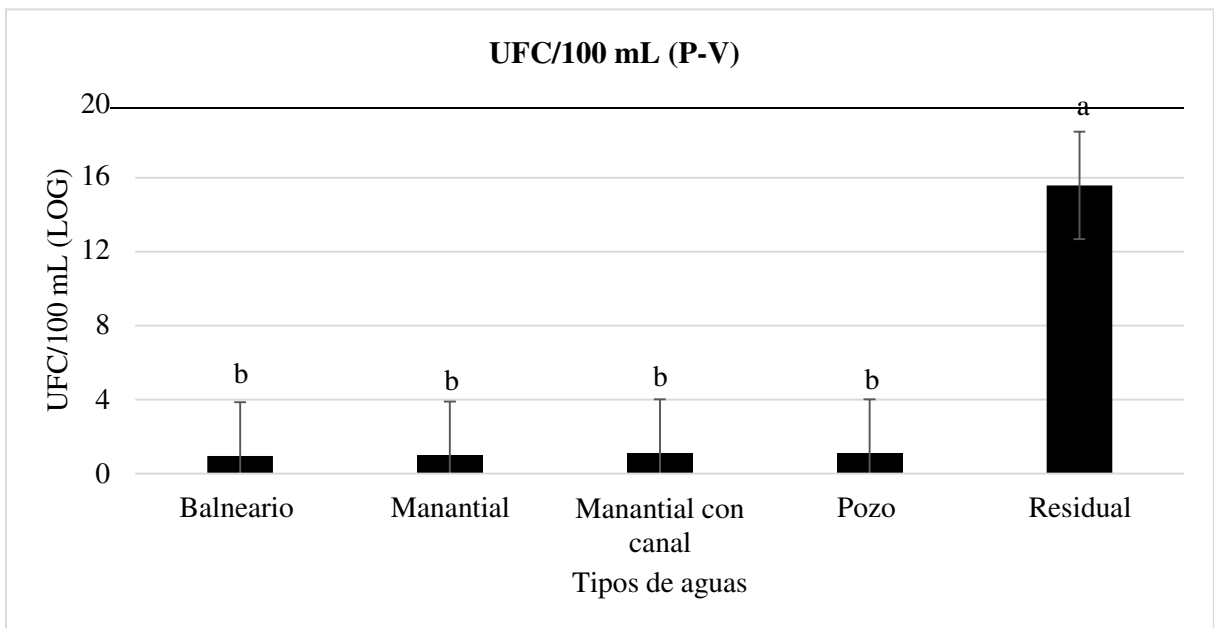
Las concentraciones de los niveles de carga bacteriana mostraron valores de 15.34 y 15.58 UFC/100 mL (logaritmo [LOG]) en las aguas residuales, en la época O-I y P-V respectivamente, en donde se reportaron mayores concentraciones de *E. coli* con base en estos niveles de carga microbiana. Por lo que se rebasa los límites establecidos por la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 sobrepasan el límite máximo de 2000 UFC/100 mL de células bacterianas.

En la Tabla 23 se observa que en los diferentes cuerpos de agua de riego de Ixmiquilpan, mostraron diferencias estadísticas significativas en el contenido de *E.coli* UFC/100 mL. Los valores establecidos en esta evaluación, en los distintos cuerpos de agua oscilaron entre 2.27-15.34 UFC/100 mL (LOG) para el ciclo O-I y 0.94-15.58 UFC/100 mL (LOG) en el ciclo P-V. Sin embargo en las aguas residuales en ambos ciclos, el valor siempre estuvo por arriba de la media respecto a las fuentes de agua de balneario (termal), manantial, manantial con canal, pozo y residual (Figura 22 y Figura 23).



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 22. Los valores del NMP/100 mL en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hgo., para el cultivo de lechuga indican el promedio de UFC/100 mL de las aguas de riego durante los ciclos agrícolas de O-I.



Literales diferentes entre barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre ciclo agrícola y entre fuente de origen del agua de riego.

Figura 23. Los valores del NMP/100 mL en aguas de riego de Ixmiquilpan, Hgo., para el cultivo de lechuga indican el promedio de UFC/100 mL de las aguas de riego durante los ciclos agrícolas de P-V.

En general, existe una presencia de coliformes fecales en las muestras de agua de balneario, manantial, manantial con canal, pozo y residuales, en distintas concentraciones. La carga microbiana de *E. coli* en las fuentes de agua de riego es ligeramente más alta en el ciclo agrícola O-I que en P-V, excepto por las aguas residuales. Sin embargo en las aguas residuales en ambos ciclos, el valor siempre estuvo por arriba de la media respecto a las fuentes de agua de balneario, manantial, manantial con canal y pozo (Figura 22 y Figura 23).

La presencia de *E. coli* en los cuerpos de agua es un indicador de contaminación fecal y orgánica, quien forma parte de la flora intestinal de animales de sangre caliente (Del Pilar et al., 2005; Lamendella et al., 2008) y que además esta Enterobacteria es una especie que causa patologías como el síndrome urémico hemolítico, gastroenteritis (Soto, 2016). Además, la carga microbiana por *E. coli* en el agua de riego demerita la inocuidad del agua, la presencia de estas bacterias también se debe a la escorrentía con contaminación fecal que puede provenir de la fauna del sitio (Rodríguez, 2002).

De acuerdo a las características fisiológicas que caracteriza a *E. coli* para sobrevivir en condiciones adversas, en materia de inocuidad alimentaria es de vital importancia, debido a que las aguas residuales en Ixmiquilpan, Hgo. son utilizadas para irrigar los cultivos hortícolas. Además, el suelo y la vegetación natural que crece y se desarrolla en el municipio son reservorio natural, en donde la población de microorganismos fecales y no fecales pueden albergar y con el arrastre de la lluvia llegan a las aguas de balneario, manantiales y pozo, y propicia el incremento de coliformes, de esta manera se justifica la presencia de las bacterias en balneario, manantiales y pozos profundos. En la agricultura, los periodos de lluvia son relevantes ya que favorecen el suministro de agua para el desarrollo de los cultivos, la recarga de presas, manantiales y mantos acuíferos, también inducen el arrastre y escorrentía de las tierras rurales, urbanas y actividades agrícolas de los suelos con materia fecal procedentes de animales de vida salvaje o de corral. Por esta razón las diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de *E. coli* entre los ciclos agrícolas con periodo de lluvias y el periodo de secas puede deberse a estos cambios naturales (Shehane et al., 2005; Pérez et al., 2008). En las aguas de pozo se encontró presencia de bacterias coliformes fecales, sin embargo con base en la norma NOM-001-SEMARNAT-1996, la calidad e inocuidad de las aguas de pozos para el riego y cultivo de

hortalizas son aceptables, 2.2 UFC/100 mL en O-I y 1.09 UFC/100 mL, en P-V es de interés señalar que este tipo de agua está menos expuesta a la contaminación que las aguas superficiales, pero, en ciertas condiciones como lo son pozos poco profundos se pueden ver afectados por el agua superficial o las grietas de su revestimiento, entre otras causas, pueden estar expuestos a riesgos de contaminación microbiana (Salomón et al., 2008), como en los puntos muestreados (Tabla 22), en donde se observó que los productores no tenían los cuidados necesarios con estos pozos (Figura 24).

Tabla 22. Localización geográfica de las áreas de muestreo de agua de pozo para riego de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo.

Sitio	Profundidad (m)	Coordenadas	UFC/100 mL O-I	UFC/100 mL P-V
Área de horticultores	10	N 20°07.108' W 099°09.006'	15	2
Bañul	35	N 20°30.536' W 099°12.733'	0	2
Remedios	30	N 20°32'426 W 099°12'252	3	3
Jesús de la Cruz Medina	22	N 20°32.123' W 099°12.567'	11	5
La Heredad	35	N 20°30.860' W 099° 13.602'	19	8
San Nicolás Invernadero	12	N 20°30.653' W 099° 12.958'	15	2
San Nicolás Invernadero Ma. Félix (2)	12	N 20°30.658' W 099° 12.966'	15	2
San Nicolás Invernadero	12	N 20°30.623' W 099° 12.908'	19	3
San Nicolás Invernadero Ma. Félix (4)	12	N 20°30.655' W 099° 12.961'	1	2
Av. Allende Mz. Ñaño	8	N 20°30.513' W 099°12.936'	15	5
Pozo 1	7	N 20°28.955' W 099°13.178'	19	2
Colonia del Oro	9	N 20°29.077 W 099°13.630'	19	2
La Media Luna	15	N 20°29.043 W 099°13.169'	4	2



Figura 24. Condiciones generales de pozo profundos con agua para riego de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo.

La profundidad de estos pozos variaba entre los 7 y 35 m, de acuerdo a Palamuleni y Akoth, (2015) la profundidad mínima de un pozo es de 40 m, de modo que la contaminación microbiana de las fuentes superficiales se elimina dentro de los primeros 30 m a medida que el agua subterránea pasa a través de arena saturada y roca no fisurada, sin embargo, en un acuífero fracturado, los contaminantes microbianos pueden pasar rápidamente a través de la zona no saturada hasta el nivel freático, probablemente por esta razón fue que se encontró presencia de coliformes fecales. Palamuleni y Akoth (2015) reportaron la presencia de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O104:H4 en pozos debido a que construyeron junto a letrinas y esto tiene el potencial de contaminar el agua subterránea.

Mora y Calvo (2011) reportan que los coliformes fecales son mayores en la época lluviosa y puede deberse a un mayor arrastre de los desechos animales y humanos hacia los ríos por parte de la escorrentía, al igual que Abakpa (2013) y Kisterman et al. (2002) quienes reportaron que los recuentos más altos observados fueron en la época de P-V esto podría atribuirse a la lluvia y escorrentía.

En el presente trabajo, los valores altos se reportan en la época de O-I para las aguas de balneario, manantial, manantial con canal y pozo, excepto el agua residual (15.34 UFC/100 mL LOG), que ligeramente se encontró por debajo en comparación con la época de P-V (15.58 UFC/100 mL LOG), esto se podía deber a que de acuerdo con lo mencionado por Berney et al. (2006) demostraron que debido a la exposición a la luz solar se reduce la supervivencia de *E. coli*, *Shigella flexneri* y *Vibrio cholerae*. Retamozo et al. (2010) y Edokpayi et al. (2018), quienes en su informe señalaron que durante la estación seca se espera un alto recuento bacteriano debido a

que ésta proporciona una temperatura adecuada para la incubación bacteriana, caso contrario a lo reportado por Haley et al. (2009) mencionan que la presencia de *E. coli* fue mayor en la época de P-V (558 UFC/100 mL) que en O-I (50 UFC/100 mL).

En las aguas de manantial [O-I 2.34 UFC/100 mL (LOG) y P-V 0.96 UFC/100 mL (LOG)] y manantial con pozo [O-I 2.77 UFC/100 mL (LOG) y 1.1 UFC/100 mL (LOG)] se encontró la presencia de coliformes totales, los niveles de carga fueron muy bajos y con base en la NOM-001-SEMARNAT-1996, la calidad e inocuidad de estas aguas para riego y cultivo de hortalizas son aceptables. Prieto et al. (2017) en un trabajo realizado con aguas de manantiales ubicadas en Araró, Zinapécuaro Michoacán reportan que no detectaron en las aguas presencia de Coliformes fecales (NMP/100 m³). Los valores altos reportados en el presente trabajo fueron en la época de O-I, al igual que los valores reportados por Daghara et al. (2019) quienes mencionan que en aguas de manantial pertenecientes a Palestina, el recuento de microorganismos presentó un valor máximo registrado en el mes de septiembre y los valores pequeños fue el resto de los meses, lo cual podría deberse a la filtración y ruptura en las redes de suministro del agua.

Singh et al. (2019) mencionan que la contaminación elevada microbiana en las aguas de manantial fue en la temporada de lluvias, lo que indica la mezcla de agua de escorrentía con materiales fecales de animales, también se reportó que el 90 % del agua de manantial se encontraban contaminadas con *E. coli*.

En las aguas de balneario [O-I 2.45 UFC/100 mL (LOG) y P-V 0.94 UFC/100 mL (LOG)] se encontró la presencia de coliformes fecales, los niveles de carga fueron muy bajos y con base en la norma NOM-001-SEMARNAT-1996, la calidad e inocuidad de estas aguas para riego y cultivo de hortalizas son aceptables. De acuerdo a Yedeme et al. (2017) *E. coli* se encontró en 30 % de las muestras de aguas de alberca lo que podría deberse a las prácticas de saneamiento, actitud del bañista y período de estudio. Wyczarska-Kokot et al. (2019) reportan que las albercas analizadas son estacionales y recreativas al aire libre el número total de microorganismos fue de 100 UFC/100 mL los cuales no superaron los límites permisibles establecidos por la OMS.

Tabla 23. Comparación de los valores medios de los pa

	Otoño-Invierno							
	pH	Temperatura del agua	CE	UFC/100 mL (LOG)	ppm	Humedad (%)	Temperatura ambiente	T
Balneario	8.84 ± 0.28 a	28.38 ± 2.18 a	1.78 ± 0.51 b	2.45 ± 1.04 b	0.89 ± 0.25 b	39.37 ± 11.90 b	28.35 ± 3.97 a	12.
Manantial	7.78 ± 0.08 b	21.22 ± 0.53 b	2.40 ± 0.19 a	2.34 ± 0.78 b	1.20 ± 0.08 a	57.5 ± 16.94 ab	23.47 ± 3.50 ab	13.
Manantial con canal	8.49 ± 0.07 a	20.95 ± 0.77 b	1.58 ± 0 b	2.77 ± 0 b	0.79 ± 0 b	58 ± 5.65 ab	23.1 ± 0.14 ab	14.
Pozo	7.55 ± 0.29 b	21.31 ± 0.83 b	2.36 ± 0.36 a	2.27 ± 0.91 b	1.17 ± 0.16 a	61.33 ± 12.13 a	21.37 ± 3.41 b	13
Residual	7.76 ± 0.31 b	22.67 ± 1.34 b	1.77 ± 0.08 b	15.34 ± 4.17 a	0.88 ± 0.04 b	58.75 ± 1.21 a	22.84 ± 0.89 b	12.

*Literales diferentes entre filas indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

Los resultados mostrados en la Tabla 23 se muestran los distintos tipos de agua muestreados en dos épocas del año (O-I y P-V) y en las variables evaluadas se pueden apreciar las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

El pH en la época de O-I fue mayor respecto a la temporada de P-V, en las aguas de balneario (8.84 ± 0.28) y aguas de manantial con canal (8.49 ± 0.07) se presentó una diferencia significativa al resto de las aguas, mientras que en P-V ningún tipo de aguas presentó diferencia significativa.

Los valores de la temperatura en los distintos cuerpos de agua fueron ligeramente mayores en la época P-V en comparación con los valores de la temporada O-I. Las aguas de balneario presentaron un incremento en la temperatura, mostrando así una diferencia significativa respecto al resto de las aguas de riego (30.11 ± 2.87).

La CE fue mayor en la temporada de O-I, sin embargo, las aguas de manantial (2.34 ± 0.78) y pozo (2.27 ± 0.91) presentaron una diferencia significativa, mientras que en la temporada de P-V no existió una diferencia significativa para esta variable en los cuerpos de agua muestreados.

La carga bacteriana en O-I fue mayor en comparación con P-V, sin embargo, el agua residual fue la única que presentó diferencias significativas en ambas épocas en comparación al resto de las aguas muestreadas. En P-V el agua residual presentó un ligero incremento en la carga bacteriana (15.58 ± 4.38 P-V y 15.34 ± 4.17).

Las sales disueltas (ppm) en O-I presentaron una diferencia significativa en las aguas de manantial y pozo, mientras que en P-V esta variable no presentó diferencias significativas para en esta variable con respecto a los cuerpos de agua muestreados. La humedad en el ambiente presentó diferencias significativas en ambas épocas. Para la temporada de O-I en el ambiente donde se tomaron las muestras de aguas de pozo (61.33 ± 12.13) y residuales (58.75 ± 1.21), seguidas por la humedad del ambiente de las aguas de manantial con canal (58 ± 5.65) y manantial (57.5 ± 16.94), mientras que en P-V la humedad del ambiente en las aguas de manantial con canal (62.5 ± 3.53), pozo (60.30 ± 14.56), manantial (50.75 ± 8.69) y balneario (48.62 ± 8.74) presentaron diferencias significativas,

La temperatura ambiente en P-V presentó valores más altos, siendo las aguas de manantial con canal (37 ± 1.41) las que presentaron una diferencia significativa en comparación con la época O-I en donde la temperatura ambiente en las aguas de balneario presentó una diferencia significativa (28.35 ± 3.97).

El tiempo de rocío en la época O-I no presentó diferencias significativas en las zonas de muestreo de los cuerpos de agua, sin embargo, en la temporada P-V en la zona de muestreo de las aguas de manantial con canal (34.9 ± 0.98) se presentó una diferencia significativa en comparación al resto de las aguas.

Con este análisis se puede observar que dependiendo del lugar de muestreo y el ciclo agrícola existen diferencias significativas para las variables que van a afectar en el crecimiento y desarrollo de la carga bacteriana presente en las aguas de riego.

Características morfológicas de bacterias encontradas en aguas de riego

En relación a las características morfológicas identificadas en las muestras de lechuga, se observó que de acuerdo a lo reportado por Al-mohanna (2011) *E. coli* es una bacteria Gram-negativa, lo cual en las muestras analizadas microscópicamente confirma esta clasificación (Figura 25).

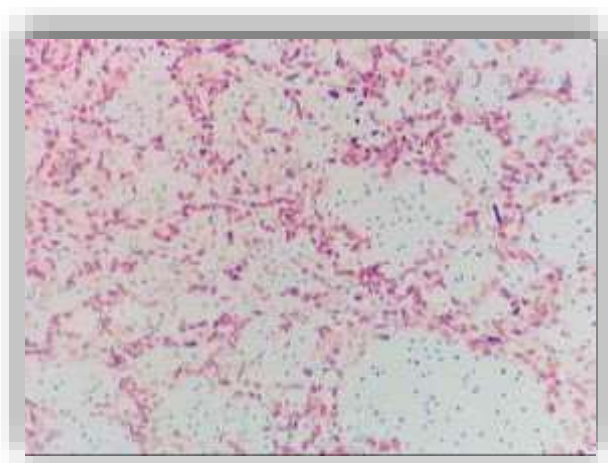


Figura 25. Tinción de Gram Bacilos gram negativos observados bajo microscopía de luz convencional (100x) presentes en muestras de aguas de riego.

Características coloniales en aguas de riego

En las muestras de aguas residuales el 100 % de los aislamientos bacterianos corresponden a las características coloniales de *E. coli*, descritas por Eguía et al. (2017) las cuales deben presentar 2 a 4 mm de diámetro, centro grande de color oscuro e incluso negro, con brillo verde metálico debido a la rápida fermentación de la lactosa. Las aguas de balneario que presentaron un 45 % de presencia de *E. coli*, las aguas de pozo, manantial y manantial con agua de canal no mostraron presencia de *E. coli*, sin embargo, si hubo crecimiento de otras bacterias (Figura 26 y 27; Tabla 25).

Las características morfológicas de las colonias de *E. coli* de muestras de agua para riego de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo y aisladas en medios específicos, mismas que se agrupan en la Tabla 24, concuerdan con lo reportado por Al-mohanna (2011). Las descripciones realizadas en el laboratorio coinciden con el trabajo realizado por Jyothilekshmi et al. (2019) en un análisis microbiológico realizado a muestras de aguas en la India, tras hacer pruebas confirmatorias en agar EAM reportaron que el crecimiento de *E. coli* presentó un brillo verde metálico.

Tabla 24. Características morfológicas de las colonias de *E. coli*

Temperatura 37°C por 24 hrs	Agar Mac Conkey	Agar Eosina Azul de Metileno
Tamaño (mm)	2	2
Forma	Circular	Circular
Color	Rosado	Brillo metálico
Margen	Completo	Completo
Elevación	Ligeramente aumentado	Convexo
Opacidad	Opaca	Translúcida
Consistencia	Suave	Suave

Fuente: Al-mohanna (2011).

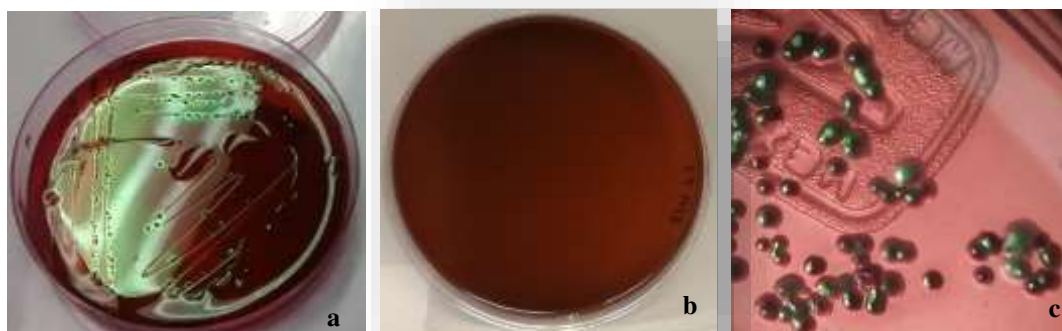


Figura 26. Crecimiento colonial de *E. coli* en agar Eosina Azul de Metileno de muestras en aguas residuales de Ixmiquilpan, Hidalgo a) Cepa de referencia de *E. coli* O157:H7; b) Testigo agar EAM; c) Colonias bacterianas desarrolladas en el medio EAM.

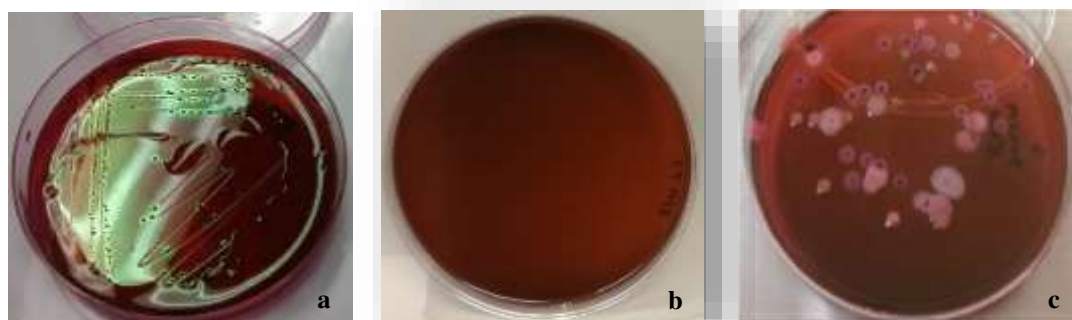


Figura 27. Crecimiento bacteriano de aguas de manantial en agar Eosina Azul de Metileno a) Cepa de referencia de *E. coli* O157:H7; b) Testigo agar EAM; c) Coliformes totales.

Tabla 25. Morfología de colonias bacterianas aisladas de aguas para riego para el cultivo de lechuga balneario, manantial, manantial con canal, pozo y residual en Ixmiquilpan, Hidalgo

	Aguas balneario	Aguas de manantial	Aguas de manantial con canal	Aguas de pozo	Aguas residuales
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Borde	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Textura	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa	Mucosa
Coloración	Halo transparente con centro negro con presencia de coloración brillante	Fiucsa	Fiucsa	Fiucsa	Halo transparente con centro negro con presencia de coloración verde brillante

Pruebas bioquímicas para identificación de *E. coli* en aguas de riego

Las pruebas bioquímicas demostraron que 100 % de las cepas aisladas en las muestras de aguas residuales en el ciclo agrícola O-I con temporada de lluvia y en el ciclo agrícola P-V en época de secas corresponden a *E. coli*. En las muestras de agua de balneario se detectó que 45 % de las cepas aisladas son positivas a *E. coli* durante el ciclo agrícola P-V y en el ciclo agrícola O-I la presencia de *E. coli* disminuyó al 2 %. En las muestras de agua de pozo, manantial y manantial con canal no se detectó la presencia de *E. coli* en ninguno de los ciclos agrícolas. En la Tabla 26 se muestran los resultados que se obtuvieron en general al realizar las pruebas bioquímicas.

Palamuleni y Akoth (2015) realizaron las mismas pruebas bioquímicas convencionales para detectar características de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, logrando identificar *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, algunos aislamientos produjeron perfiles desconocidos, al igual que en el presente trabajo en donde se presentaron colonias bacterianas que no lograron identificarse.

Tabla 26. Características claves para la identificación de *E. coli* presente en aguas de riego provenientes de Ixmiquilpan, Hidalgo.

	TSI	GAS	H ₂ S	RM	VP	IND	CIT	URE	MOV
Referencia de crecimiento de <i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	+
Aguas balneario	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aguas manantial	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aguas de manantial con canal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aguas de pozo	A/A	+	-	+	-	+	-	-	+
Aguas residuales	A/A	+	-	+	-	+	-	-	+

A/A. Pico de flauta ácido (el medio vira a color amarillo); Gas. Presencia de gas; H₂S. Negativo a presencia de sulfuro de hidrógeno; RM. Rojo Metilo; VP. Vogues Proskauer; IND. Producción de Indol; CIT. Citrato; URE. Ureasa; Mov. Presenta movimiento.

PCR para identificación de *E. coli* O157:H7 en aguas de riego

A partir del crecimiento en medios específicos y el análisis de las pruebas bioquímicas de las 38 muestras de agua de riego, 20 muestras presentaron características típicas de *E. coli*, en seguida a estas muestras se les realizó el análisis molecular con base en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final.

Para la identificación de *E. coli* O157:H7 de los genes STX1 y STX2, para asegurar que los resultados eran confiables se utilizaron técnicas que consistían en tener un control positivo, control negativo y control blanco, esto coincide con la técnica utilizada por Hoofmar et al. (2004), en donde utilizaron dicha técnica y también buscaron los mismos genes en *E. coli* O157:H7.

La amplificación por PCR de los genes de virulencia asociados al SUH de *E. coli*, reveló que del total de las cepas aisladas cinco correspondieron al serotipo O157:H7, esta corrida electroforética mostró bandas de aproximadamente 360 pb, al igual que en lo reportado por Rasheed et al. (2014) para la detección del gen productor de toxinas Shiga STX1 y STX2, sin embargo, Ibekwe et al. (2002) mencionan que para la identificación de *E. coli* O157:H7 en aguas residuales de los genes STX1 y STX2 el gen STX1 amplificó a 150 pb y el gen STX2 amplificó a 200 pb, además, mencionan que la concentración más alta de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 la obtuvieron en abril y la

más baja se registró en septiembre en todos los puntos de muestreo, caso contrario a lo reportado en el presente trabajo, debido a que las muestras positivas a *E. coli* O157:H7 fueron encontradas en la época de O-I.



Figura 28. Producto de la PCR en gel de agarosa al 1 % para el gen productor de STX 1 y STX 2. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1: Testigo positivo *E. coli* O157:H7; Carril 2-8: muestras de aguas de riego de Ixmiquilpan, Hgo., para el cultivo de lechuga.

Las muestras positivas a estos genes fueron provenientes de las aguas residuales, caso similar al reportado por Loukiadis et al. (2006) en donde mencionan que del 25 % las muestras tomadas a aguas residuales contenían al menos una cepa de *E. coli* con los genes STX1 Y STX 2 (Figura 28). En este sentido el uso de este tipo de agua para riego y cultivo de hortalizas frescas conlleva a factores de virulencia que pueden propagarse a través de los sistemas de irrigación, además del

riesgo latente por las poblaciones bacterianas patógenas presentes en el ambiente (Martínez et al., 2015), asimismo *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir en el huésped o en el entorno donde se libera, ya sea en las excretas de animales o aguas de riego (Lawan et al., 2015). García-Aljaro et al. (2005) y Heijnen y Medema (2007) estudiaron 27 muestras de agua superficial y cuatro de aguas residuales *E. coli* O157:H7 y ambos genes Stx se detectaron en dos muestras de aguas residuales, mientras que solo se detectó *E. coli* O157:H7 en dos muestras de aguas superficiales.

Características morfológicas de bacterias identificadas en lechugas irrigadas con aguas de riego

De acuerdo a lo reportado por Al-mohanna (2011) *E. coli* es una bacteria Gram-negativa, por lo cual, las bacterias presentes en las muestras de lechuga y analizadas microscópicamente se encontraron dentro de esta clasificación (Figura 29).

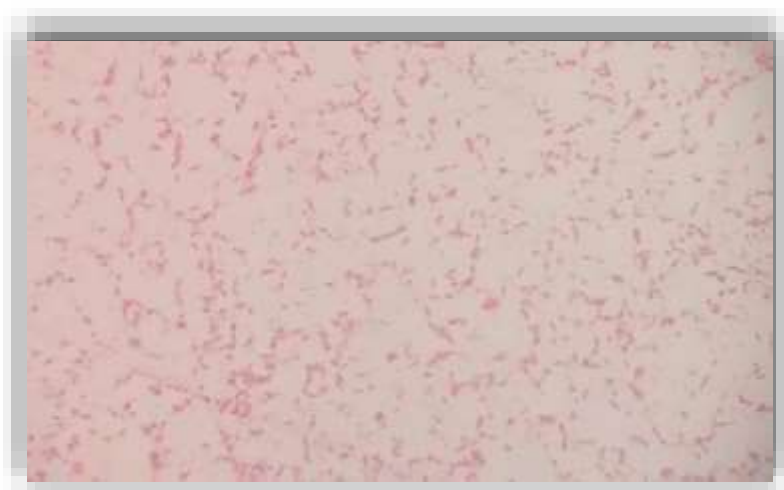


Figura 29. Bacilos gram negativos presentes en muestra de lechuga irrigada con aguas de riego observados bajo microscopía de luz convencional (100x).

Características coloniales identificadas en lechugas irrigadas con aguas de riego

Las muestras de lechuga presentaron solamente un 1.2 % de crecimiento bacteriano las cuales no correspondieron a descripción morfológica descrita por Eguia et al. (2017) para *E. coli*. Estas muestras que presentaron crecimiento se recuperaron para realizar las pruebas bioquímicas y el resto de las muestras no presentó crecimiento bacteriano (Tabla 27 y Figura 30). Por lo cual el cultivo de lechuga se encuentra dentro de los lineamientos establecidos por la NOM- 093-SSA1-

1994 la cual menciona que los Coliformes Fecales no pueden exceder de 100 UFC/mL o no ser detectables.

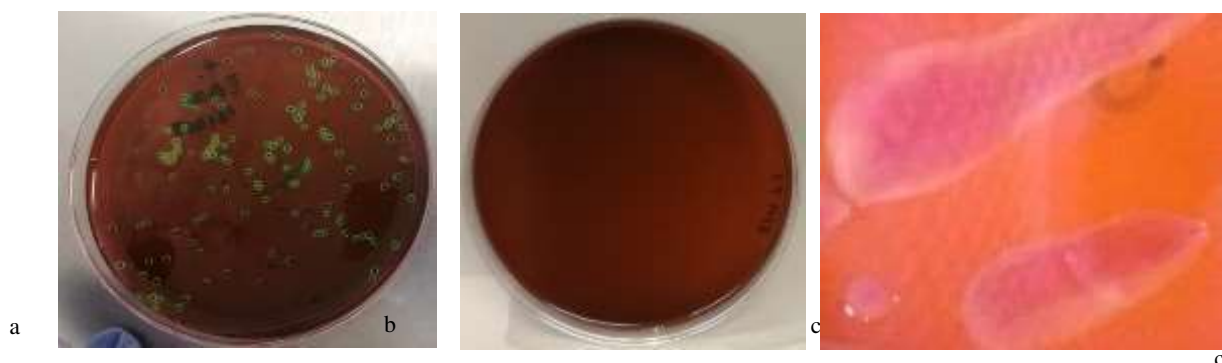


Figura 30. Crecimiento bacteriano en medios específicos de muestras de lechuga irrigadas con aguas de riego (residual, pozo, manantial y balneario) en agar Eosina Azul de Metileno a) Referencia de *E. coli* O157:H7; b) Testigo agar EAM; c) Colonias bacterianas desarrolladas.

Tabla 27. Morfología de colonias bacterianas de muestras de lechuga irrigadas con aguas de riego (pozo y residual) en agar Eosina Azul de Metileno.

Características bacterianas en muestras de lechuga	
Elevación	Plana
Borde	Entero
Forma	Irregular
Textura	Mucosa
Coloración	Fiucsa

Antony et al. (2016) en una evaluación comparativa del agar EAM realizada a partir de muestras alimentarias mostró que *E. coli* produce un alto brillo verde metálico en el agar y Goñi et al. (2016) en su trabajo realizado sobre los brotes de infecciones asociados a semillas contaminadas por *E. coli* O157:H7, tras distintas técnicas realizaron el sembrado en agar EAM, reportando que las colonias presentaban un brillo verde metálico, sin embargo, en el presente trabajo las características de las colonias aisladas y cultivadas de tejido de lechuga observadas no coincidieron con las reportadas por estos autores, debido a que probablemente las bacterias encontradas son bacterias saprofitas, las cuales se encuentran presentes en las plantas debido a

que son las que se encargan de descomponer la materia orgánica que es utilizada por las plantas como alimento (Salazar et al., 2010).

Pruebas bioquímicas en muestras de lechuga irrigada con agua residual para identificación de *E. coli*

Las pruebas bioquímicas para la caracterización de *E. coli* de los aislamientos de tejido en el cultivo de lechuga confirmaron que la bacteria no se encontró presente en la parte interna de la planta (Tabla 28). A diferencia de Muñoz (2017) quien utilizó las mismas pruebas bioquímicas para determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 en diferentes hortalizas, dando positivo a 13.3 % de las muestras tomadas.

Tabla 28. Características claves para la identificación de *E. coli*

	TSI	GAS	H₂S	RM	VP	IND	CIT	URE	MOV
Referencia de crecimiento de <i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	+
Resultados de pruebas bioquímicas	-	+	-	-	-	-	+	-	-

A/A. Pico de flauta ácido (el medio vira a color amarillo); **GAS.** Presencia de gas; **H₂S.** Negativo a presencia de sulfuro de hidrógeno; **RM.** Rojo Metilo; **VP.** Vogues Pasteur; **IND.** Producción de Indol; **CIT.** Citrato; **URE.** Ureasa; **Mov.** Presenta movimiento.

Karaye et al. (2019) en muestras de espinaca provenientes de súper mercados de Zaria, utilizaron la caracterización bioquímica convencional para la identificación de *E. coli* O157:H7, dando positivo en las bioquímicas por el contrario a lo reportado en el presente trabajo debido a que las bioquímicas no presentaron ninguna característica que diera positivo a *E. coli* O157:H7 en lechuga.

Análisis microbiológico

Niveles de carga bacteriana en lechuga

Tabla 29. Comparación de los valores medios de los niveles de la carga bacteriana presente en el tejido de lechuga irrigado con dos aguas de riego en Ixmiquilpan, Hidalgo.

Otoño-Invierno		Primavera-Verano	
	UFC/mg (LOG)		UFC/mg (LOG)
Pozo	0 ± 0 b	Pozo	0 ± 0 b
Residual	0 ± 0 b	Residual	0.98 ± 0.12 a

*Literales diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Los resultados son el promedio del análisis microbiológico realizado a muestras de tejido vegetal de lechuga en dos épocas del año (O-I y P-V) a las cuales se les realizó el recuento de UFC/gr (Tabla 29). La diferencia se presentó en la época de P-V en el agua residual ($p < 0.05$), en donde se presentó un crecimiento microbiológico de 1.2% del total de las muestras, sin embargo, las características coloniales no coincidieron con *E. coli*.

Puig et al. (2014) reportaron que las hortalizas que presentan superficies rugosas se encuentran expuestas a sufrir contaminación microbiana como lo son espinaca, col, berro y lechuga. El hecho de que no se haya encontrado la presencia de *E. coli* O157:H7 en el cultivo de lechuga podría deberse al tipo de suelo presente en Ixmiquilpan o a la forma en la que los productores irrigan el cultivo de lechuga.

La presencia de *E. coli* O157:H7 en el agua de riego como en la planta de lechuga es de suma importancia, debido a que este microorganismo es uno de los principales indicadores de contaminación fecal (Larrea et al., 2013), además, la importancia de los microorganismos encontrados en las aguas de riego radica en que estas bacterias representan la contaminación que está sufriendo cada uno de los cuerpos de agua (Rojas et al., 2016). A pesar de que, en el municipio de Ixmiquilpan, los productores irrigan sus cultivos con aguas residuales, que presentan cargas bacterianas por encima de las establecidas por la NOM, no se presenta contaminación por *E. coli* en el tejido fresco de la lechuga, lo anterior obedece a que la planta durante el cultivo no está en contacto directo con el agua de riego, debido a que, se encuentra en la parte superior del surco.

Keraita et al. (2007) recomiendan métodos de riego simples debido a que presentan un gran potencial para la reducción de contaminación en los cultivos; en el municipio de Ixmiquilpan,

Hgo., los productores realizan riego por gravedad, haciendo un buen uso y manejo de las aguas de riego.

Explicándose así que durante el trasplante y desarrollo del cultivo de lechuga, los productores forman camas y realizan riego por gravedad evitando el contacto directo de las aguas con el cultivo de lechuga (Figura 31), de esta manera impiden pudriciones al salpicar o asperjar el agua de riego sobre el follaje de la planta que podrían ser causadas por las aguas contaminadas, además de pérdidas económicas por la merma del producto, ésto en combinación con otras medidas de reducción de riesgos antes y después de la cosecha ayudan a reducir de forma integral los riesgos para la salud pública derivados del uso de agua contaminada en la agricultura de hortalizas (Balkhair, 2016). En este sentido el agua sube a las raíces de la planta por capilaridad, lo que propicia que las raíces se limitan a absorber sólo el agua y, ésta es una posible respuesta a que *E. coli* no se encontrará presente en las muestras de lechuga analizadas.



Figura 31. Riego de cultivo de lechuga en Ixmiquilpan, Hidalgo.

Las aguas de riego muestreadas en el municipio de Ixmiquilpan, Hgo., se encontraron por encima de los límites establecidos por la norma NOM-001-SEMARNAT-1996, sin embargo, en el cultivo de lechuga no se detectó la presencia de microorganismos patógenos, caso contrario a lo mencionado por Ndiaye et al. (2011) y Cobbina et al. (2013) quiénes reportan que las aguas residuales presentan un porcentaje mayor a 35% de contaminación por microorganismos patógenos y durante la cadena de producción del cultivo de lechuga se registraron altos niveles de contaminación microbiana debido a la gran superficie ocupada por sus hojas de la misma, además de que puede constituirse como un vector para la transmisión de patógenos bacterianos a los consumidores finales.

Las prácticas de riego que realizan en el Valle del Mezquital para el cultivo de hortalizas frescas, consisten en riego por gravedad, de esta manera, las aguas de riego no se encuentran en contacto

con el cultivo de lechuga, este es uno de los motivos que explica la razón por la cual el cultivo de lechuga no se encuentra con presencia de *E. coli* O157:H7, caso similar a lo reportado por Libuttia et al. (2018) en un trabajo realizado en la región de Apulia en el Mediterráneo y Cirelli et al. (2012), en el este de Sicilia, que los bajos niveles de indicadores microbianos se deben a la falta de contacto entre el agua de riego y las partes comestibles de la planta. Contrario a esto, Hamilton et al. (2006), mencionan en el estudio realizado para la evaluación de riesgo microbiano, que el riesgo anual promedio de infección fue siempre menor para la lechuga en comparación con las aguas de riego, sin embargo las muestras fueron tomadas en lugares en donde el cultivo se irriga por aspersión, lo que lo hace más vulnerable a la contaminación cruzada que se propicia por este tipo de riego.

Los resultados del presente estudio muestran la presencia de *E. coli* en el agua presentó un aumento de acuerdo a la época del año, específicamente en la temporada de lluvias, debido a los periodos de arrastre y escurrimientos del suelo, estos resultados coinciden con los de Prabhat y Tripathi (2007), en la investigación realizada en Dinapur, India, mencionan que el agua de riego muestreada en los conteos de *E. coli* y *Salmonella* sp., presentaba diferencias significativas de acuerdo a la estación del año y la zona en donde se muestreaba, además, indican que en el cultivo de espinacas (*Spinacia oleracea*) y col (*Brassica oleracea*) presentaron recuentos más altos en comparación con otras hortalizas en clima seco, en este sentido es significativamente más probable que estas bacterias se detecten durante la temporada de lluvias que durante la estación seca, a diferencia del presente estudio, en donde en el cultivo de lechuga no se identificó la presencia de *E. coli* en ninguno de los dos periodos (P-V y O-I).

De acuerdo a lo reportado por Muirhead et al. (2006) y Liu et al. (2017) existe un limitado conocimiento sobre las posibles interacciones entre los tipos de suelo y los patógenos humanos, especialmente en condiciones de campo. Luna (2019) menciona que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir en el suelo de 7 a 25 semanas, datos similares a los reportados por Fenlon et al. (2000) y Lang y Smith (2007) mencionan que esta bacteria podría persistir hasta 25 semanas en suelos arcillosos y francos. De acuerdo a Prieto et al. (2017) los suelos de Ixmiquilpan son arcillosos tipo 2:1 y presentan un pH 8.15.

Obayomi et al. (2019) reportaron que las cepas recuperadas de *E. coli* fueron en bajas concentraciones en los suelos con arcilla, estas diferencias podrían estar asociadas con una mayor disponibilidad de nutrientes y retención de agua que promueven la supervivencia y, en muchos

casos, el nuevo crecimiento de bacterias entéricas en la arcilla (Jamieson et al., 2002). A pesar de ello, la arcilla tiene una gran capacidad de intercambio catiónico, una gran área de superficie y grupos con carga positiva en los bordes de la red cristalina (Stevik et al., 2004) que demostraron atraer partículas o microorganismos con carga negativa. Por lo tanto, un mayor contenido de arcilla puede conducir a una mayor adsorción bacteriana (Ling et al., 2002) y a una menor movilidad que limitaría la frecuencia de internalización de los patógenos en las plantas (Dong et al., 2003; Sharma et al., 2009). Así mismo, los suelos contienen elementos trazas (Pb, Cd, Cr y Hg), de acuerdo a lo hallado por Prieto et al. (2005) reportan que los suelos del Valle del Mezquital contienen concentraciones relativamente bajas de metales trazas provenientes de las aguas residuales empleadas para el riego agrícola, las cuales pueden depositarse en los suelos, acumularse y simultáneamente lixiviarse con mayor facilidad,

Además, Pascual y Venegas (2016); Prieto et al. (2017) hacen mención que en los suelos se encuentra la presencia de materia orgánica, metales: K, Mg, Ca, B, Cd, Cr, Pb, As y Hg, y contiene bacterias Gram negativas como *E. coli*, al haber presencia de éstas quedan retenidas en los espacios interlaminares de la arcilla, por lo cual se explica que en las lechugas no se determinó la presencia de dicha bacteria. Por lo tanto, una posible explicación para esto es que la gran cantidad de patógenos que se encuentran en el suelo arcilloso no es probable que contaminen los cultivos.

Etapa II. Penetración y permanencia de *E. coli* O157:H7 en lechuga

7.3 Identificación de *E. coli* O157:H7 en cultivo de lechuga

Antes del experimento no se encontraron microorganismos coliformes ni *E. coli* en las plántulas de lechuga ni en el agua utilizada.

Los análisis fenotípicos realizados tuvieron la finalidad de confirmar por medio de la siembra de las muestras en agar EAM que las bacterias recuperadas eran las mismas inoculadas.

En el sistema de bandeja flotante, la inoculación de *E. coli* O157:H7 realizada en el agua, sólo se recuperó de una plántula de lechuga (0.36 %) la bacteria. En la Tabla 30 se muestra como no existe una diferencia significativa en la presencia de *E. coli* O157:H7.

La ausencia de *E. coli* O157:H7 se debió a que las raíces de las plántulas se encontraban sanas (Figura 32).



Figura 32. Raíz de plántula de lechuga sana.

En el sistema de la Técnica de la película del nutriente (NFT), la inoculación de *E. coli* O157:H7 realizada en el agua, durante el primer muestreo, permitió la recuperación de dicha cepa en Raíz (R), Hoja (H) y Tallo (T). Identificándose a los ocho días de realizar la inoculación. En el resto de los muestreos no se identificó la internalización de *E. coli* O157:H7. En la Tabla 30 se muestran las diferencias encontradas.

La presencia de *E. coli* O157:H7 en R se debió a que el tejido se encontraba dañado (Figura 33). Macarisin et al. (2014) evaluaron la internalización de *E. coli* O157:H7 en espinacas en suelo contaminado y en un sistema hidropónico, mencionando que la contaminación de las plantas cultivadas en suelo resultó con un número mayor de eventos de internalización que en los que se cultivaron hidropónicamente, lo que sugiere que la internalización de la bacteria depende del daño de la raíz, que es más probable que ocurra cuando las plantas crecen en suelo. De acuerdo a Ocaña et al., (2018) la recuperación de *E. coli* indica que existe un factible punto de entrada de esta bacteria a través de las raíces dañadas debido que es la vía principal de absorción de nutrientes y agua.



Figura 33. Raíz de plántula de lechuga dañada.

Tabla 30. Comparación de los valores medios de las UFC/mL (LOG)

	Bandeja flotante						NFT					
	Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3		Muestreo 1		Muestreo 2		Muestreo 3	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
Hoja	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.32 ± 0.76 a	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b
Tallo	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.27 ± 0.63 a	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0.42 ± 0.80 a	0 ± 0 b	0.27 ± 0.65 a	0 ± 0 b	0 ± 0 b
Raíz	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	2.72 ± 0.69 a	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b

*Literales diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Los resultados del presente estudio muestran que *E. coli* logró sobrevivir en el agua y la raíz de la planta debido a que, las raíces de las plántulas instaladas en la estructura NFT se encontraban dañadas. Riggio et al. (2019) mencionan que los patógenos transmitidos por alimentos pueden internalizarse en cultivos vegetales a través de los sistemas de raíces lesionadas, cutícula dañada o a través de estomas. En caso de ocurrir una absorción no se correlaciona con la presencia en hojas y tallos; lo que se apreció con el experimento realizado, donde las plántulas instaladas en el sistema de bandeja flotante no se encontraban dañadas, por lo tanto, no se encontró la presencia de la bacteria, y en la única plántula en donde se detectó *E. coli* sólo fue en raíz.

Jablasone et al. (2005) concluyeron que las plantas más jóvenes son las más susceptibles para un efecto de internalización de patógenos tanto en suelo como en hidroponía, sin embargo, los resultados obtenidos no coinciden con éste, debido a que las plántulas se encontraban dentro de las primeras etapas fenológicas del cultivo y la internalización en la raíz sólo se debió a los daños

presentes en las raíces, lo que significa que estos resultados dependió de la condición fisiológica en la que se encontraban las plántulas de lechuga. En contraste con resultados previos a los reportados por Solomon et al. (2002), en la investigación que realizaron, mencionan que le hicieron el corte a las lechugas, de esta manera, demostraron que las células de *E. coli* O157: H7 penetran por los estomas y zonas de unión de las hojas de lechuga cortadas, quedando atrapadas de 20 a 100 μm debajo de la superficie del borde cortado y estas células atrapadas tienen la capacidad de protegerse del saneamiento con cloro cuando son regadas directamente.

En lo que respecta a los conductos capilares de la raíz de la planta de lechuga, estos presentan apertura de 1 μm de diámetro, mientras que las dimensiones de *E. coli* O157:H7 presenta 2 μm de longitud por 0.25-1 μm de diámetro, con un volumen promedio de 0.6-0.7 μm por célula bacteriana. Estas características evidencian que la célula es más pequeña que la apertura capilar radicular, esto pudiera ser una posibilidad de ingreso de las células a la parte interna de la radícula (Stenutz et al., 2006).

Sin embargo, la bacteria no logró translocar al resto de los tejidos de la planta y sólo permanecer en la raíz, probablemente por la Banda de Caspary que impide el paso de patógenos (Barberon, 2016; Li et al., 2018; Song et al., 2019). Por lo tanto, se sugiere, que es necesario realizar cuidadosamente el trasplante de las plántulas de lechuga en el suelo y garantizar que el suelo no tenga materiales que dañen a las raíces.

Hasta la fecha no existen reportes que definan la internalización de *E. coli* O157:H7 en el cultivo de lechuga, en las investigaciones consultadas inducen la internalización de dicha bacteria mediante cortes en la raíz u hoja de la lechuga, tanto en cultivo al aire libre como en hidroponía, por lo tanto, no se puede afirmar que no exista un riesgo de contaminación en campo en el municipio de Ixmiquilpan, Hgo., pero las practicas agrícolas que en este municipio han venido realizando a lo largo del tiempo han funcionado adecuadamente para que en esta hortaliza no se encuentre la presencia de *E. coli* O157:H7, a pesar de ello, se sugiere que se sigan realizando estudios.

VIII. CONCLUSIONES

En las muestras del cultivo de lechuga irrigado con aguas residuales se detectó la presencia de bacterias, sin embargo, estas bacterias no correspondieron a *E. coli*, por lo tanto el cultivo se encontró dentro de los lineamientos establecidos por la NOM-093-SSA1-1994 la cual menciona que los Coliformes Fecales no pueden exceder de 100 UFC/mL o no deben ser detectables. A pesar de ello, cuando existe un daño físico en la planta *E. coli* O157:H7 puede ingresar a la parte interna de la planta y desplazarse por el tallo y la raíz.

Los cultivos de lechuga irrigados con aguas residuales en Ixmiquilpan, Hgo., no comprometen la inocuidad del producto final, al no existir presencia y translocación de la bacteria *E. coli*. Se recomienda especial cuidado en la etapa de trasplante de las plántulas de lechuga al suelo, evitar daños mecánicos y heridas a la estructura radicular, asimismo, la posibilidad de hospedar a células bacterianas de *E. coli*.

Al realizar el análisis de las características físicas y químicas así como la presencia de microorganismos patógenos presentes en las aguas residuales en el periodo O-I y P-V, los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura y CE) estuvieron dentro de los límites establecidos en las normas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-069-SEMARNAT-1994. Sin embargo, las mediciones de la carga bacteriana en las aguas muestreadas mostraron diferencias significativas en las aguas residuales durante los dos ciclos agrícolas (15.34 UFC/100 mL O-I y 15.58 UFC/100 mL P-V) teniendo valores superiores al límite permisible que establece la norma NOM-001-SEMARNAT-1996, la cual establece 2000 UFC/mL, estos niveles aumentaron ligeramente durante el periodo P-V.

Los cinco tipos de aguas de riego analizados presentaron condiciones óptimas para el desarrollo de *E. coli* O157:H7, por lo que el uso de estas aguas puede representar una problemática de salud pública debido a su empleo en los campos agrícolas de Ixmiquilpan, Hidalgo como principal fuente de agua en el sistema de riego de lechuga.

En los procedimientos morfológicos y bioquímicos realizados al cultivo de lechuga irrigado con aguas residuales, para identificar la presencia de *E. coli* O157:H7, el 1.2% de las muestras que presentaron crecimiento bacteriano, fueron bacterias saprofitas, confirmándose así que *E. coli*

O157:H7 no se detectó en el cultivo, a pesar de que el agua residual con la que se irriga el cultivo de lechuga sí tiene altos niveles de *E. coli* O157:H7 que sobrepasan los límites establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996, por lo que, el manejo del agua durante las prácticas de riego que realizan los productores de Ixmiquilpan, Hgo., ayuda a que el agua no entre en contacto directo con los tejidos de la planta.

La recuperación y aislamiento de *E.coli* O157:H7 de hoja, tallo y raíz de lechuga en el primer muestreo del sistema NFT, la bacteria mostró la capacidad de ingresar por la raíz y transportarse al tallo y hojas de la lechuga; en el resto de los muestreos de este sistema y del sistema de bandeja flotante no se identificó la internalización de la bacteria.

En este caso la persistencia no dependió de la etapa fenológica en que se hizo la inoculación, sino debido al daño físico que presentó la raíz al paso de los días en la estructura NFT.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abakpa, G. 2013. Microbial quality of irrigation water and irrigated vegetables in Kano State, Nigeria. *International Food Research Journal*. 20(5): 2933-2938.
- Abakpa, G., Umoh, V., Ameh, J., Yakubu, S., Kwaga, J. and Ibekwe, A. 2015. Occurrence of enteric pathogens on fresh produce grown on irrigated soils. *British Microbiology Research Journal*. 6(1): 13-23.
- Abdella, R. 2007. Hydroponics Removal of Wastewater's Contaminants for the Generation of Commercially Valuable Plants and Environmentally Sound Effluent for The Dead Sea Communities. *Jordan Journal of Civil Engineering*. 1(3): 1-16.
- Abdul, A. 2002. Evaluation of drinking water quality in Tiruchirappalli, Tamil Nadu. *Indian Journal of Environmental Health*. 44(2): 108–112.
- Alam, M. 2014. Microbial Status of Irrigation Water for Vegetables as Affected by Cultural Practices. Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science Department of Biosystems and Technology Alnarp. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp.
- Al-mohanna, M. 2011. *Escherichia coli* and *Klebsiella*. En línea. 12 p. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2018. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/315803952>.
- Amotey, P. and Bani, R. 2011. Wasterwater Management. En línea. Fecha de consulta: 8 de septiembre de 2019. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/221911472_Wastewater_Management
- Antony, A., Paul, M., Silvester, R., Anessa, P., Sureh, K., Divya, P., Simmy, P., Fathima, P. and Abdulla, M. 2016. Comparative Evaluation of EMB agar and hicrome *E. coli* and Typical *E. coli* colonies from food and enviromental samples. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 10(4): 1-9.
- AQUASTAT. 2016. Wastewater. En línea. Fecha de consulta: 9 de julio de 2019. Disponible en: http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/glossary/search.html?lang=es&keywords=Agu+a+residual&submit=Buscar&subjectId=-1&submitBtn=-1&_p=100&termId=-1

- Aguirre, S., Piraneque, N. y Vásquez, J. 2018. Características edáficas y su relación con usos del suelo. *Ciencias Agrícolas*. 14(1): 242-250.
- Bagginis. 2019. Las Enterobacterias (Parte I) Seguridad Alimentaria. Fecha de consulta: 25 de agosto de 2019. Disponible en: <https://bagginis.blogspot.com/2019/03/las-enterobacterias-parte-i.html>
- Balkhair, K. 2016. Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23: S83-S92.
- Barrantes, K. y Achí, R. 2011. Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 31: 31-36.
- Barberon, M. 2016. The endodermis as a checkpoint for nutrients. *New Phytologist*. 213: 1604-1610.
- Berney, M., Weilenmann, H., Simonetti, A. and Egli, T. 2006. Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae*. *Journal Applied Microbiology*. 101(4): 828–836.
- Brooks, G., Carrol, K., Butel, J., Morse, S. y Mietzner, T. 2010. *Microbiología Médica*. CDMX, México. 25ª edición MCGraw Hill.
- Bou, G. Fernández, A., García, C., Sáez, J. y Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29(8): 601-608.
- Bustamante, T., Monsalve, D. y García, R. 2008. Análisis de la calidad del agua en la cuenca media del río Quindío con base en índices físicos, químicos y biológicos. *Revista de Investigación Universitaria Quindío*. 1(18): 22-31.
- Caballero, C. 2012. Determinación de los Puntos susceptibles de Contaminación en la Cadena de Producción de Melón Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) Cultivado en la Región de Parras, Coahuila. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. Ed. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 103 p.
- Caicedo, O., Balmaseda, C., Tandazo, J., Layana, E., y Sánchez, V. 2019. Calidad para el riego de las aguas del río San Pablo, Cantón Babahoyo, Ecuador. *Revista Científica Técnica Agrícola*. 28(3): 1-8.

- Camacho, A., Giles, M., y Ortigón, A. 2009. Determinación de bacterias coliformes. En línea. 17p. Fecha de consulta: 18 de abril de 2019. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli NMP_6529.pdf
- Carrillo, M., Audisio, M., Bejarano, V., Gómez, S., Gustavo, E. y Benítez, M. 2007. Manual de la microbiología de los alimentos. Capítulo Frutas y hortalizas. Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina. 191 p.
- Carmentaty, C., Dannis, A., Pérez, N., Marañón, A. y Bajo, R. Caracterización físico-química de las aguas residuales de la planta galvánica, empresa conformadora “30 de noviembre”. *Resvista Cubana de Química*. 21(2): 22-28.
- CESAVEH. 2015. Programa de trabajo de la campaña de manejo fitosanitario de hortalizas, a operar con recursos del componente de sanidad del Programa Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria en el estado de Hidalgo. En línea. Fecha de consulta: 8 de junio de 2018. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/156341/Manejo_fitosanitario_de_hortalizas.pdf.
- Chengwei, S., Weiwei, S., Liang, D., Jialong, W., Jinxing, L. y Ruili, L. 2019. Development and chemical characterization of Casparian strips in the roots of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 33: 827-836.
- Cirelli, G.L., Consolia, S., Licciardello, F., Aiello, R., Giuffrida, F. and Leonardi, C., 2012. Treated municipal wastewater reuse in vegetable production. *Agricultural Water Management*. 104, 163-170.
- Clawson, M., Keen, E., Smith, T., Durso, L., McDaneld, T., Mandrell, R., Davis, M. and Bono, J. 2009. Phylogenetic classification of *Escherichia coli* O157:H7 strains of human and bovine origin using a novel set of nucleotide polymorphisms. *Genome Biology*. 10(5):56-68.
- CONAGUA. 2018. En línea. Fecha de consulta: 27 de enero de 2019. Estadísticas del agua en México. http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2018.pdf.

- Coniglio, M., Faro, G. and Marranzano, M. 2016. The Importance of the microbiological quality of ready-to-eat salads from a public health perspective. *Journal of Food Processing Technology*. 7(4): 1-3.
- Cubillos, A. 2007. Parámetros y características de las aguas residuales. En línea. 62 p. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2018. Disponible en: <https://cidta.usal.es/cursos/etap/modulos/libro/Caracteristicas.PDF>
- Daghara, A., Al-Khatib, I. and Al-Jabari, M. 2019. Quality of drinking water from springs in Palestine: west bank as a case study. *Journal of Environmental and Public Health*. 1(2):1-7.
- Del Pilar, M. 2005. Microbiological indicators of contamination of the water sources. *NOVA Publicación Científica*. 3(4): 69-79.
- Delaide, B., Goddek, S., Gott, J., Soyeurt, H. and Haissam, M. 2016. Lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Sucrine) Growth Performance in Complemented Aquaponic Solution Outperforms Hydroponics. *Journal Water*. 8(10):1-11.
- Deng, W., Puente, J., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T. and Finlay, B. 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 101:3597-3602.
- Dong, Y., Iniguez, A., Ahmer, B. and Triplett, E., 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Applied Environment Microbiology*. 69(3):1783-1790.
- D'Alessandri, M. 2012. Caracterización y tratamiento de agua residual proveniente de las plantas de producción. Universidad Simón Bolívar. 98 p.
- Docplayer. 2018. En línea. Fecha de consulta: 17 de enero de 2020. Disponible en: <https://docplayer.es/>
- Edokpayi, J., Odiyo, J., Popoola, E. and Msagati, T. 2018. Evaluation of microbiological and physicochemical parameters of alternative source of drinking water: a case study of Nzhelele River, South Africa. *The Open Microbiology Journal*. 12(1): 18-27.
- Elhadidy, M., Elkhatib, W., Abo, E., Verstraete, K., Denayer, S., Barbau, E., Zutter, L., Verhaegen, B., De Rauw, K., Piérard, D., De Reu, K. and Heyndrickx, M. 2015. Genetic

diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 recovered from human and food sources. *Microbiology*. 161: 112-119.

Encyclopedia Britannica. 2019. Root. Botany. En línea. Fecha de consulta: 18 de octubre de 2019. Disponible en: <https://www.britannica.com/topic/Baigong-pipes>.

Farfan, M. and Torres, A. 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity*. 80(3):903-913.

Farfán, A., Ariza, S., Vargas, F. y Vargas, L. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*. 33(4): 438-450.

FDA. 2002. Manual de formación para instructores. En línea. Fecha de consulta: 27 de agosto de 2019. Disponible en:

http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/maryland_manual.pdf.

FAOSTAT. 2019. CROPS. En línea. Fecha de consulta: 8 de junio de 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.

FAO. 2019. Codex Alimentarius. Fecha de consulta: 9 de julio de 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>

FAOSTAT. 2017. Datos sobre alimentación y agricultura. En línea. Fecha de consulta: 8 de junio de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

FAOSTAT, 2019. En línea. Fecha de consulta: 9 de junio de 2019. Disponible en: http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es

Farfán, A., Ariza, C., Vargas, F. y Vargas, L. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*. 33(4):438-450.

Fenlon, D., Ogden, D., Vinten, A., Svoboda, I., 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Journal Applied of Microbiology*. 88(29):149-156.

Fernández, R., Miliwebsky, E., Mejías, M., Baschkier, A., Panek, C., Abrey, M., Cabrera, G., Ramos, M., Rivas, M. and Palermo, M. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 shows an increased pathogenicity in mice after the passage through the gastrointestinal tract of the same host. *Journal of Medical Microbiology*. 61(6): 852-859.

- Fernández, R., Yamaguchi, N., Tahoun, A., McAteer, S., Gillespie, T., Wang, D., Argyle, S., Palermo, M. and Gally, D. 2016. Type III Secretion-Dependent Sensitivity of *Escherichia coli* O157 to Specific Ketolides. *American Society Microbiology*. 60(1):459-470.
- Franke, R. 2015. Caspary's conductor. *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America*. 112(33):10084-10085.
- Fromm, H. 2019. Root plasticity in the pursuit of water. *Journal Plants*. 8(7): 236- 245.
- Gally, D. y Stevens, M. 2017. Microbe Profile: *Escherichia coli* O157: H7—notorious relative of the microbiologist's workhorse. *Microbiology*. 163:1-3.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J., Blanco, M., Jofre, J. and Blanch, A. 2005. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiology Letters*. 246: 55-65.
- García, P. y Mendoza, A. 2014. Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 48(2): 249-254.
- Gu, G.; Luo, Z.; Cevallos-Cevallos, J., Adams, P., Vellidis, G., Wright, A. and van Bruggen, A. 2013. Factors affecting the occurrence of *Escherichia coli* O157 contamination in irrigation ponds on produce farms in the Suwannee River Watershed. *Canadian Journal Microbiology*. 59(3):175-182.
- Goñi, M., Tomadoni, B., Audisio, M., Ibarguren, C., Roura, S., Moreira, M. and Ponce, A. 2016. Application of bacteriocins from *Enterococcus hirae* on butterhead lettuce seeds inoculated with *Escherichia coli* O157:H7. *International Food Research Journal*. 23(6): 2653-2660.
- Haley, B., Cole, D. and Lipp, E. 2009. Distribution, diversity, and seasonality of waterborne salmonellae in a rural watershed. *Applied Environment of Microbiology*. 75(5): 1248–1255.
- Hamilton, A., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A. and Hale, G. 2006. Quantitative Microbial Risk Assessment Models for Consumption of Raw Vegetables Irrigated with Reclaimed Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5): 3284-3290.

- Heijnen, L. and Medema, G. 2007. Quantitative detection of *E. coli* and other Shiga toxin producing *E. coli* in water using culture method combined with real-time PCR. *Journal of Water and Health*. 4(4): 487-498.
- Hernández, C., Aguilera, M. y Castro, G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31(4): 137-151.
- Hernández, E. 2011. Uso de aguas residuales en la agricultura. Estudio de caso; Distrito de Riego 028, Tulancingo, Hidalgo, México. Universidad Autónoma de Chapingo. 241 p. DOI: 10.13140/2.1.4299.8087
- Him, J. 2019. Calidad fisicoquímica y microbiológica del agua del Río Santa María en los alrededores del Ingenio la Victoria, Verugas, Panamá. *Revista científica Centros*. 8(1): 174-194.
- Ibekwe, A., Watt, P., Grieve, C., Sharma, V. and Lyons, S. 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and environmental microbiology*. 68(10): 4853-4862.
- INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. En línea. Fecha de consulta: 13 de marzo de 2018. Disponible en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/13/13030.pdf.
- INIFAP. 2011. Fertirrigación en el cultivo de lechuga en Guanajuato. En línea 32 p. Disponible en: www.inifap.gob.mx/circe/Documents/publigto/Lechuga.pdf. Fecha de consulta: 27 de marzo de 2017.
- INAFED. 2012. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Estado de Hidalgo. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM13hidalgo/municipios/13030a.html>
- Jablasone, J., Warriner, K. and Griffiths, M. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *Food microbiology*. 99(1): 7-18.
- Jamieson, R., Gordon, R., Sharples, K., Stratton, G. and Madani, A. 2002. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: a review. *Canadian Biosystems Engineering*. 44: 1.1-1.9.

- Jaramillo, M. and Restrepo, I. 2017. Wastewater Reuse in Agriculture: A Review about Its Limitations and Benefits. *Journal Sustainability*. 9(10): 1734-1743.
- Jiménez, M. 2018. Enfermedades transmitidas por alimentos. Secretaría de Salud. En línea: 52 p. Fecha de consulta: 23 de julio de 2019. Disponible en:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/334653/11._ETASMa._Eugenia_Jim_n ez-DGE.pdf
- Jung, Y. and Matthews, K. 2014. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*. 7(6): 517–527.
- Jyothilekshmi, S., Sajan, S., Anjali, P., Krishnan, Y., Kumar, A., Sudhakaran, R., Franklin, N. and Chandran, P. 2019. Physicochemical and microbiological analysis of well water samples collected from North of Punnapra village, Alappuzha district, Kerala state, India. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 6(6): 104-113.
- Kamran, M., Samreen, Z., Ling, J., Taj, I., Muhammad, T. and Yunlin, W. 2014. *Escherichia coli* as model organism. *Ijerst*. 3(2): 1-8.
- Karaye, G., Karaye, K. and Kaze, P. 2019. Detection of *Escherichia coli* in freshly harvested spinach samples collected from five different markets in Zaria. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 4(2): 112-115.
- Keller, R., Perim, K., Semionato, S., Zandonade, E. and Gonçalves, R. 2005. Hydroponic cultivation of lettuce (*Lactuca sativa*) using effluents from primary, secondary and tertiary+ UV treatments. *Water Science and Technology: Water Supply* 5(1): 95–100.
- Kendall, M., Rasko, D. and Sperandio, V. 2007. Global effects of the cell-to-cell signalling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a luxS mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 75: 4875-4884.
- Keraita, B., Konradsen, F., Drechsel, P. and Abaidoo, R. 2007. Effect of low-cost irrigation methods on microbial contamination of lettuce irrigated with untreated wastewater. *Tropical Medicine and International Health*. 12(2): 15-22.
- Kesseli, R. V., Ochoa, R. and Michelmore, W. 1991. Variation at RFL Ploci in *Lactuca* spp. and the origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). *Genome*. 34: 430-436.

- Kessler R., Nisa, S., Hazen, T., Horneman, A., Amoroso, A., Rasko, D. and Donnenberg, M. 2015. Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes. *Pathogens and Disease* 73(8):1-6.
- Kljujev, I., Raicevic, V., Andrews, S., Jackson, R., Lalevic, B. and Dorati, F. 2015. Transmission of *E. coli* from contaminated irrigation water and soil to plant tissue. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 68(1):397-400.
- Krishnakumar, T. 2019. HACCP plant for food products. En línea. 18 p. Fecha de consulta: 15 de octubre de 2019. Disponible en: DOI: 10.13140/RG.2.2.16340.24961
- Kistemann, T., ClaBen, T., Koch, C., Dagerdorf, F., Fischeder, R. and Gebel, J. 2002. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2188–2187
- Kuete, V. 2017. Medicinal spices and vegetables from vegetable. Dschang, Cameroon: Academic Press. 437 p.
- Lamendella, R. 2008. Biodobacteria in feces and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(3): 575-584.
- Lai, Y., Rosenshine I., Leong, J. and Frankel, G. 2013. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 15:1796-1808.
- Lang, N. and Smith, S. 2007. Influence of soil type moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *Journal Applied Microbiology*. 103: 2122-2131.
- Larrea, J., Rojas, M., Romeu, B., Mercedes, N. y Heydrich, M. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 44(3): 24-34.
- Lawan, M., Bello, M., Kabir, J., Grande, L. and Morabito, S. 2015. Detection of pathogenic *Escherichia coli* in samples collected at an Abattoir in Zaria, Nigeria and at different points in the Surrounding Enviroment. *International Journal of Enviroment Research and Public Health*. 12: 679-691.

- Li, P., Yang, M., Chang, J., Wu, J., Zhong, F., Rahman, A., Qin, H. and Wu, S. 2018. Spatial Expression and Functional Analysis of Casparian Strip Regulatory Genes in Endodermis Reveals the Conserved Mechanism in Tomato. *Frontiers in Plant Science*. 1(9):1-15.
- Libuttia, A., Gattaa, G., Gagliardia, A., Vergineb, P., Polliceb, A., Beneducea, L., Disciglioa, G. and Tarantino, E. 2018. Agro-industrial wastewater reuse for irrigation of a vegetable cropsuccession under Mediterranean conditions Department of Science of Agriculture, Food and Environment, University of Foggia, ItalybIRSA CNR, Viale F. De Blasio, 5-70132 Bari, Italya.
- Ling, T., Achberger, E., Drapcho, C. and Bengtson, R. 2002. Bacteria in a soil-water system. *Trans. ASAE* 45: 669–674.
- Liu, X., Gao, C., Ji, D., Walker, S., Huang, Q. and Cai, P. 2017. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in various soil particles: importance of the attached bacterial phenotype. *Biology and Fertility of Soils*. 1(53): 209–219.
- Llamosas, M. 2016. Serotipificación de cepas de *Escherichia coli* aisladas de neonatos de alpaca (*Vicugna pacos*) con diarrea en Cerro de Pasco. Universidad Nacional de San Marcos. Lima, Perú. 68 p.
- Lobarda, R. 2008. Métodos de Evaluación. En línea 1-13 p. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2017. Disponible en: <https://cropprotection.files.wordpress.com/2008/12/mc3a9todos-de-evaluacic3b3n-en-proteccic3b3n-de-cultivos.pdf>
- Loebenstein, G. and Lecoq, H. 2012. Viruses and virus diseases of vegetables in the Mediterranean Basin. Elsevier. San Diego, USA.
- López, W. y Guevara, J. 2002. Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*. 3(1): 38-41.
- Loukiadis, E., Kérourédan, M., Beutin, L., Oswald, E., Brugère. H. 2006. Characterization of Shiga Toxin Gene (stx)-Positive and Intimin Gene (eae) Positive *Escherichia coli* Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5): 3245-3251.

- Luna, J., Arenas, M., Martínez, C., Silva, J. and Luna, M. 2019. The Role of Pathogenic *E. coli* in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive Measures. *International Journal of Microbiology*. doi.org/10.1155/2019/2894328
- Luo, Z.; Gu, G., Ginn, A., Giurcanu, M., Adams, P., Vellidis, G., van Bruggen, A.H., Danyluk, M. and Wright, A. 2015. Distribution and Characterization of *Salmonella enterica* Isolates from Irrigation Ponds in the Southeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(13): 4376-4387.
- Luque, R. y Estrada, J. 2004. Características de la endodermis en la raíz de *Cospeletia* (*Asteraceae*). Characteristics of the endormis of the root of *Coespeletia* (*Aesteraceae*). *Revista Universidad Nacional de Colombia*. 26(2): 53-60.
- Lux, A., Abe, J., Luxová, M. and Morita, S. 2004. Root cortex: Structural and functional variability and responses to environmental stress. *Root Research*. 13(3): 117-131.
- Macarisin, D., Patel, J., Sharma, V. 2014. Role of curli and plant cultivation conditions on *Escherichia coli* O157:H7 internalization into spinach grown on hydroponics and in soil. *International Journal of Food Microbiology*. 173: 48-53.
- Maganhotto, C. and Francisconi, E. 2014. Effect of salinity on soil microorganisms. *Soil Health and Land Use Management*. Intech Open. 177-198 p.
- Makkaew, P., Miller, M., Cromar, N. and Fallowfield, H. 2017. The influence of the microbial quality of wastewater, lettuce cultivars and enumeration technique when estimating the microbial contamination of wastewater-irrigated lettuce. *Journal of Water and Health* 15(2): 228-238.
- Malorny B. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella*. *Food Applied Environmental Microbiology* 70: 7046-7052.
- Martínez, N., Villalobos, L., Castillo, L. 2015. *Escherichia coli* diarreogénicas procedentes de aguas marinas recreacionales caracterizadas por reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Científica*. 25(3): 248-254.
- Morales, N., de la Torre, A., García, V. y Chávez, C. 2018. Estudio de la calidad bacteriológica y parámetros fisicoquímicos del agua del Distrito de Riego 023. *Tecnología y Ciencias del Agua*. 9(1): 53-67.

- Mora, J., Calvo, G. 2011. Estado actual de contaminación con coliformes fecales de los cuerpos de agua de la Península de Osa. *Revista Tecnología en Marcha*. 23(5):34-40.
- Muirhead, R., Collins, R. and Bremer, P. 2006. Interaction of *Escherichia coli* and soil particles in runoff. *Applied Environment Microbiology*. 72(5): 3406–3411.
- Muñoz, S. 2005. Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expandidas en cuatro mercados de Lima Metropolitana. En línea. 146. Fecha de consulta: 31 de enero de 2019. Tesis para obtener Médico Veterinario. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/744/Munoz_js.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Muñoz, M. 2017. *Escherichia coli* O157:H7 en hortalizas de fundos agrícolas en la periferia de la ciudad de Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Tesis para obtener el grado de Magíster en Microbiología. Lima, Perú. 61 p.
- Narsimha, A., Narsimha, C., Srinivasulu, P. and Sudarshan, V. 2013. Relating apparent electrical conductivity and pH to soil and water in Kanagal surrounding area, Nalgonda district, Andhra Pradesh. *Der Chemica Sinica*. 4(2): 25-31.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C. and Franke, R. 2012. Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. 109(25): 1-6.
- Navarro, F., Ruiz, F., Cataldi, A. and Larzábal, M. 2019. Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01965>
- NMX-AA-003-1980 Aguas residuales. Muestreo. Norma Mexicana. En línea. 8p. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2018. Disponible en:
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166762/NMX-AA-003-1980.pdf>
- NOM-001-SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Para determinar la contaminación por patógenos se tomará como indicador a los coliformes fecales. En línea. 35 p. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2018. Disponible en:
<https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3290/1/nom-001-semarnat-1996.pdf>

- NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Norma Oficial Mexicana. En línea. Fecha de consulta: 13 de diciembre de 2019. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- NOM-112-SSA1-1994. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número más Probable. Norma Oficial Mexicana. En línea. Fecha de consulta: 13 de diciembre de 2019. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html>
- NOM-210-SSA1-2014. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Norma Oficial Mexicana. En línea. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2018. Disponible en:
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015
- NOM-251-SSA1-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Norma Oficial Mexicana. Fecha de consulta: 13 de febrero de 2019. Disponible en: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>
- NOM-EM-034-FITO-2000. Requisitos y especificaciones para la aplicación y certificación de buenas prácticas agrícolas en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas. Norma Oficial Mexicana. En línea. 17 p. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2018. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/fito/fito034em.pdf>
- NOM-FF-51-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Hortalizas en estado fresco. Lechuga. Norma Oficial Mexicana. En línea. Fecha de consulta: 16 de enero de 2020. Disponible en:
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4791830&fecha=13/01/1983
- NOM-069-ECOL-1994, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de componentes eléctricos y electrónicos. En línea. Fecha de consulta: 16 de enero de 2020. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4866041&fecha=09/01/1995
- NOM-093-SSA1-1994, Practicas de higiene y sanidad en la preparacion de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. En línea. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2020. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>

NOM-CCA-033-ECOL-1993, que establece las condiciones bacteriológicas para el uso de aguas residuales de origen urbano o municipal o de la mezcla de estas con la de los cuerpos de agua, en el riego de hortalizas y productos hortofrutícolas. En línea. Fecha de consulta: 18 de enero de 2020. Disponible en:

http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4794222&fecha=18/10/1993

Núñez, A. 2015. Caracterización de la problemática de las aguas residuales en Ixmiquilpan, Hidalgo. Universidad Autónoma Metropolitana División de Ciencias Sociales y Humanidades. Licenciatura en Geografía Humana. En línea 1-95 p. Fecha de consulta: 8 de junio de 2018. Disponible en:

http://desh.izt.uam.mx/licenciaturas/geografia_humana/wpcontent/uploads/2015/09/Tesis-Ana-Laura-Nu%C3%B1ez-2015.pdf

NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. En línea. Fecha de consulta: 11 de junio de 2018. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>

Obayomi, O., Bernstein, N., Edelstein, M., Vonshak, A., Ghazayarn, L., Ben-Hur, M., Tebbe, C. and Gillor, O. 2019. Importance of soil texture to the fate of pathogens introduced by irrigation with treated wastewater. *Science of the Total Environment*. 653: 886-896.

Ocaña de Jesús, R., Gutiérrez, A., Sánchez, J., Mariezcurrena, M., Eslava, C. y Laguna, A. 2018. Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Argentina de Microbiología*. 50(4): 408-416.

Ochoa, T. 2011. Brote severo de *E. coli* productora de Shiga toxina (STEC) en Alemania: ¿Es el resultado de la promiscuidad de la *E. coli*? *Revista Médica Herediana*. 22(2): 45-46.

Olubanjo, O. and Adebolu. A. 2018. Evaluation of Irrigation Water Quality from Major Water Sources in Ondo and Osun States, Nigeria. *Journal of Experimental Agriculture International*. 24 (2): 1-12.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Inocuidad de los alimentos, Centro de prensa. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>. Fecha de consulta: 2 de diciembre 2017.

- OMS. 2019. Agua. Fecha de consulta: 23 de junio de 2019. Disponible en:
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- OMS. 1989. Directrices sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Ginebra: Organización Mundial de la Salud (Serie de informes técnicos) 778 p.
- OMS. 2017. *E. coli*. En línea. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> Fecha de consulta: 30 de marzo de 2018.
- OMS, 2018. *Escherichia coli*. En línea. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2018. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Ortega, H., Chocano, L., Palma, C. y Samanez, I. 2010. Biotas acuáticas en la Amazonia Peruana: diversidad y usos como indicadores ambientales en el Bajo Urubamba (Cusco-Ucayali). *Revista Peruana de Biología*. 17(1):29-35.
- Osorio, J. y Lobo M. 1983. Hortalizas. Manual de asistencia técnica No. 28. Instituto Colombiano Agropecuario. En línea. Fecha de consulta: 7 de febrero de 2018. Disponible en:
<https://books.google.com.mx/books?id=XpfGDwAAQBAJ&pg=PA14&lpg=PA14>
- Palamuleni, L. and Akoth, M. 2015. Physico-chemical and microbial analysis of selected borehole water in Mahikeng, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12(8): 8619-8630.
- Palomino, C. y González, Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 31(3): 535-546.
- Pathak, C., Chopra, A., Kumar, V. and Sharma, S. 2011. Effect of sewage-water irrigation on physico-chemical parameters with special reference to heavy metals in agricultural soil of Haridwar city. *Journal of Applied and Natural Science*. 3(1):108-113.
- Posadas, E., Bochon, S., Coca, M., García-González, M., García-Encina, P. and Muñoz, R. 2014. Microalgae-based agro-industrial wastewater treatment: a preliminary screening of biodegradability. *Journal of Applied Phycology*. 26(6):1-12.

- Prieto, C., Alfaro, R., Valencia, E. y Santoyo, G. 2017. Efecto de la estacionalidad y parámetros fisicoquímicos sobre las comunidades bacterianas de tapetes microbianos de manantiales termales de Araró, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 88(3): 616-624.
- Prieto, F., Lucho, C., Poggi, H., Alvarez, M. y Barrado, E. 2005. Caracterización fisicoquímica y extracción secuencial de metales y elementos trazas en suelos de la región Actopan-Ixmiquilpan del distrito de riego 03, Valle de Mezquital, Hidalgo, México. *Ciencia Ergo Sum*. 14(1): 69:80.
- Prodhan, S., Islam, S., Islam, M., Haque, N. and Islam, M. 2018. Effect of soil and environment on winter vegetables production. *Food Processing & Technology*. 6(4): 384–389.
- Puhar, A. and Sansonetti, P. 2014. Type III secretion system. *Current Biology*. 24(17): R784-R791.
- Puig, Y. Leyva, V., Rodríguez, A., Carrera, J., Molejón, P., Pérez, Y. y Dueñas, O. 2014. Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 13(1):111-119.
- Ramírez, Y., Loera, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelarz, F., Harel, J., and Guerrero, L. 2015. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*. 4(2): 307–334.
- Rasheed, M., Kaiser, J., Thajuddin, N., Mukesh, P., Parveez, A. and Muthukumaresan, K. 2014. Distribution of the stx1, stx2 and hlyA genes: Antibiotic profiling in Shiga-toxigenic *E. coli* strains isolated from food sources. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(5): 348-361.
- Ravindra K. and Garg V.K. 2007. Hydro-chemical survey of groundwater of Hisar city and assessment of defluoridation methods used in India. *Environmental Monitoring Assessment*. 132(1-3): 33-43.
- Reuben, R., Gyar, S. and Aliyu, Y. 2018. Physicochemical and microbiological parameters of water from Rivers in Keffi, Central Niveria. *Microbiology Research Journal International*. 24(3): 1-12.
- Retamozo, B., Shabahang, S., Johnson, N., Aprecio, R. and Torabinejad, M. 2010. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *Journal Endodontics*. 36(3):520-523.

- Rich, M., Schorderet, M. and Switzerland, D. 2014. The role of the cell Wall compartment in mutualistic symbioses of plants. *Frontiers in Plant Science*. 2(5):238-247.
- Riggio, G., Jones, S. and Gibson, K. 2019. Risk of Human Pathogen Internalization in Leafy Vegetables During Lab-Scale Hydroponic Cultivation. *Horticulturae*. 5(25): 1-22.
- Ríos, S., Agudelo, R. y Gutiérrez, L. 2017. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Nacional de Salud Pública*. 35(2): 236-247.
- Rivera, J., Rodríguez, J. y López, R. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la Ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 26(1): 45-48.
- Rochus, B. 2015. Caspary's conductor. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 112(33): 10084-10085.
- Rodríguez, A. 2015. Determinación de *Escherichia coli* en ensaladas a base de lechuga preparadas en restaurantes de comida rápida. Tesis para obtener el título de Química Farmaceutica. Universidad de San Carlos. Guatemala. 57 p.
- Rodríguez, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública México*. 44(5): 464-475.
- Rogbesan, A., Eniola, K. and Olayemi, A. 2002. Bacteriological Examination of some Boreholes within University of Ilorin (PS). *Nigeria Journal of Pure and Applied Science*. 17: 1223-1226.
- Rojas, M. 2011. Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Rev. Colom. Biotecnol*. 8(2): 135-143.
- SAGARPA, 2014. En línea. Fecha de consulta: 12 de marzo de 2018. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/Documents/AgriculturaF/LECHUGA.pdf>
- Salazar, M., Aguilera, P., Maldonado, P. y Arce, M. 2010. Las bacterias. La forma de vida más antigua. Capítulo: Bacterias. 192 pp.
- Salomón, E., Brandl, M. and Mandrell, R. 2008. Papel de las buenas prácticas agrícolas en la inocuidad de las frutas y verduras. En: Matthews KR. *Microbiología de frutas y verduras*. Zaragoza: Ed. Acribia, S.A.

- Sharma, M., Ingram, D., Patel, J., Millner, P., Wang, X., Hull, A. and Donnenberg, M. 2009. A novel approach to investigate the uptake and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. *Journal of food protection*. 72(7):1513-1520.
- Sánchez-Pérez, J. and Trémolières, T. 2003. Change in groundwater chemistry as a consequence of suppression of floods: the case of the Rhine floodplain. *Journal of Hydrology*. 270:89-104.
- Seramix. 2013. Método de siembra en estría. Fecha de consulta: 17 de enero de 2020. Disponible en: <https://seramix.blogs.uv.es/2013/05/02/metodo-de-siembra-en-estria/>
- SENASICA. 2015. Manual Técnico de Muestreo de Productos Agrícolas y Fuentes de Agua para la Determinación de Contaminantes Microbiológicos del SENASICA. En línea. 43 p. Fecha de consulta: 24 de marzo de 2018. Disponible en: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Manual+Técnico+de+Muestreo+de+Productos+Agrícolas+y+Fuentes+de+Agua+para+la+Determinación+de+Contaminantes+Microbiológicos+del+SENASICA>
- SENASICA. 2016. Sistemas de reducción de riesgos de contaminación. En línea. Fecha de consulta: 19 de julio de 2019. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/sistemas-de-reduccion-de-riesgos-de-contaminacion>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. De diversos colores y texturas, la lechuga es protagonista de frescura. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/de-diversos-colores-y-texturas-la-lechuga-es-protagonista-de-frescura> Fecha de consulta: 8 de junio de 2018.
- SIAP. 2019. *Lactuca sativa* L: tipos y variedades que se producen en México. En línea. Fecha de consulta: 18 de septiembre de 2019. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/es/articulos/lactuca-sativa-l-tipos-y-variedades-que-se-producen-en-mexico?idiom=es>
- Singh, A., Das, S., Singh, S., Pradhan, N., Gajamer, V., Kumar, S., Lepcha, Y. and Tiwari, H. 2019. Physicochemical parameters and alarming coliform count of the potable water of Eastern Himalayan State Sikkim: an indication of severe fecal contamination and immediate health risk. *Environmental Health*. 7: 1-7.

- Sharma, V. and Casey, T. 2014. *Escherichia coli* O157:H7 Lacking the qseBC-Encoded Quorum-Sensing System Outcompetes the Parental Strain in Colonization of Cattle Intestines. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(6): 1882–1892.
- Siller, J., Báez, M., Sañudo, A. y Báez, R. 2002. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. SAGARPA. En línea: 71 p. Fecha de consulta: 21 de julio de 2019. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/120191/Manual_de_Buenas_Practicas_Agricolas.pdf
- SlideShare. 2014. Los procesos de nutrición en las plantas. Disponible en: <https://es.slideshare.net/juanjovazquez/presentacin-ud11-32915962> Fecha de consulta: 14 de enero de 2020.
- Soodb, Sahotap and Hunjanm. 2018. Contaminated irrigation water: a source of human pathogens on growing vegetables. *International Journal of Cell Science and Molecular Biology*. 3(5):1-3.
- Solomon, E., Yaron, S. and Matthews, K. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization. *American Society for microbiology*. 1(68): 397-400.
- Soares, J., da Silva, V., Miler, T., Fernandes, W. and Pereira, J. 2018. Production of lettuce with brackish water in NFT hydroponic system. *Ciências Agrárias, Londrina*. 39(3): 947-962.
- Solís-Castro, Y. y Zuñiga-Zuñiga. L. 2017. La conductividad como parâmetro predictivo de la dureza del agua em pozos y nacientes de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. 31(1):35-46.
- Song, C., Shen, W., Du, L., Wen, J., Lin, J. and Li, R. 2019. Development and chemical characterization of Casparian strips in the roots of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Trees*. 33: 827:836.
- Soto, Z., Pérez, L. y Estrada, D. 2016. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*. Barranquilla. 32(1): 105-122.
- Stevik, T., Ausland, G. and Hanssen, J. 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Research*. 38: 1355–1367.

- Sousa, A., Pereira, M. and Lourenço, A. 2015. MorphoCol: An ontology-based knowledgebase for the characterisation of clinically significant bacterial colony morphologies. *Journal of Biomedical Informatics*. 55: 55-63.
- Souza, V. 2015. Normatividad vigente en México aplicada a la inocuidad de alimentos. En línea. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2018. Disponible en: <https://www.legiscomex.com/BancoConocimiento/N/normatividad-mexico-inocuidad-alimentos-virginia-perez-actualizacion/normatividad-mexico-inocuidad-alimentos-virginiaperez-actualizacion.asp?CodSeccion>.
- Stenutz, R., Wildmalm, G. and Weintraub, A. 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*. 30(3): 382-403.
- Tarr, G., Stokowski, T., Shringi, S., Tarr, P., Freedman, S., Oltean, H., Rabinowitz, P. and Chui, L. 2019. Contribution and Interaction of Shiga Toxin Genes to *Escherichia coli* O157:H7 Virulence. *Toxins (Basel)*. 11(10): 607-617.
- Tomás, L. 2015. Comparación de métodos de siembra en análisis microbiológico de pescado. Máster Universitario en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias. En línea. Fecha de consulta: 12 de noviembre de 2019. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/306019365_COMPARACION_DE_METODOS_DE_SIEMBRA_EN_ANALISIS_MICROBIOLOGICO_DE_PESCADO
- Torres, A., Milflores, L., García, J., Patel, S., Best, A., La Ragione, R., Martínez, Y. and Woodward, M. 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157: H7. *International Journal of Medical Microbiology*. 297: 177-185.
- Torres, V., Manjarrez, C., Acosta, C., Guerrero, V., Parra, R., Noriega, L. and Ávila, G. 2016. Interactions between *Escherichia coli* O157:H7 and food plants. Has this bacterium developed internalization mechanisms. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34(1): 64-83.
- UN WATER. 2017. Aguas Residuales. El recurso desaprovechado. Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los Recursos Hídricos. En línea. Fecha de consulta: 1 de mayo de 2019. Disponible en: <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/>
- USDA. 2017. Danger Zone. Fecha de consulta: 25 de octubre de 2018. Disponible en:

<https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/danger-zone-40-f-140-f/> CT_Index. Fecha de consulta 1 de marzo de 2020.

Varghese, N., Soumaya, K., Aswathy, C., Divya, B. 2016. Microbiological and chemical testing of parameters of foods. Fecha de consulta: 17 de marzo de 2019. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/306037462> Fecha de consulta: 15 de agosto de 2019.

Wan-Ying, X., Jian, S. and Yong, Z. 2015. Phyllosphere bacterial community of floating macrophytes in paddy soil environments as revealed by illumine highthroughput sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 522-532.

Wang, W., Perepelov, A., Feng, L., Sergei, D., Wang, Q., Senchenkova, S., Han, Y., Yayue, L., Shashkov, A., and Wang, L. 2007. A group of *Escherichia coli* and *Salmonella* entérica O antigens sharing a common backbone *Structure Microbiology* 153: 2159–2167.

WHO. 2015. Inocuidad de los alimentos. Fecha de consulta: 17 de agosto de 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.

WHO. 2018. *Escherichia coli*. Fecha de consulta: 15 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.

Wijaya, I., Soedjono, E. 2018. Physicochemical Characteristic of Municipal Wastewater in Tropical Area: Case Study of Surabaya City. *Earth and Environmental Science*. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2019. Disponible en: doi.org/10.1051/e3sconf/201910000089

Wyczarska-Kokot, J., Lempart, A. and Marciniak, M. 2019. Research and evaluation of water quality in outdoor swimming pools. *E3S Web of conferences*. DOI: 10.1051/e3sconf/201910000089.

Yacarini, A., Arriaga, E., Alvarado, R. y Fupuy, J. 2019. Genes de virulencia de *Escherichia coli* detectados en muestras diarreicas de niños de la Región Lambayeque. *Horizonte Médico*. 19(1): 7-12.

Yedeme, K., Legese, M., Gonfa, A. and Girma, S. 2017. Assessment of physicochemical and microbiological quality of public swimming pools in Addis Ababa, Ethiopia. *The open microbiology journal*. 11(1): 98-104.

Zaidi, M. B., Calva, J. J., Estrada-Garcia, M. T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G. and Tollefson, L. (2008). Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3): 429–43.

Zhou, M., Guo, Z., Duan, Q., Hardwidge, P. y Zhu, G. 2014. *Escherichia coli* type III secretion system 2: a new kind of T3SS? *Veterinary Research*. 45(1): 1-5.

