**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.**

# EVALUACIÓN CUANTITATIVA DETERMINÍSTICA DEL RIESGO ASOCIADO AL CONSUMO DE TOMATE IRRIGADO CON AGUA RESIDUAL TRATADA CONTAMINADA CON *Salmonella*

---

Por:

**Aramís Gurrola Ramírez**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Culiacán, Sinaloa Enero 2020

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Aramís Gurrola Ramírez le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias.

LÓPEZ CUEVAS OSVALDO

Dr. Osvaldo López Cuevas
Director de tesis

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Integrante del comité

Dra. Nohelia Castro del Campo
Integrante del comité

JOSE A. MEDRANO

Dr. José Andrés Medrano Félix
Integrante del comité

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Evaluación Cuantitativa Determinística del Riesgo Asociado al Consumo de Tomate Irrigado con Agua Residual Tratada Contaminada con *Salmonella*" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Aramís Gurrola Ramírez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Culiacán, por todas las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de maestría.

Al Doctor Osvaldo López Cuevas por aceptar ser mi director de tesis, por estar al pendiente siempre de cualquier aspecto relacionado con lo académico, por sus sabios consejos brindados que me ayudarán también en la vida personal y profesional y por su grandiosa amistad.

A los miembros de mi comité Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, la Dra. Nohelia Castro del Campo y el Dr. José Andrés Medrano Félix, por sus consejos en las reuniones de comité por todo su apoyo muchas gracias.

Un agradecimiento muy grande al Dr. José Benigno Valdez Torres, por su valiosa colaboración en este trabajo, sobretodo en la parte de la evaluación de riesgo, muchas gracias.

A la Dra. María Tereza Pepe Razzolini y al Dr. Marcelo Lauretto de la Universidad de Sao Paulo, Brasil, por el asesoramiento en la parte metodológica del QMRA.

A la vez un enorme agradecimiento al Dr. Armando Navarro Ocaña de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su aceptación en su laboratorio para realizar la serotipificación de las cepas de *Salmonella* y a su equipo de trabajo por su asesoramiento en esta técnica, me quedo con un grato recuerdo.

A la Dra. Graciela Castro Escarpulli del Instituto Politecnico Nacional por conseguir el enlace con el Dr. Armando Navarro y pudiese realizarse la técnica de serotiificación de *Salmonella*.

A mis profesores que me impartieron clases: Dr. José Benigno Valdez, Dr. Raymundo Saúl García Estrada, Dr. José Andrés Medrano Félix, Dr. Juan Ramón Ibarra, M.C Armando Carrillo Fasio, Dra. Nohelia Castro del Campo que me impartieron clases y que me guiaron en el conocimiento para poder alcanzar mi título de Maestría en Ciencias.

A mis compañeros de generación (María José, Olympia, Arlet, Daizha, Rita Judith, Yudit Aimé, Lucía, Elizabeth, Juan Carlos, Manuel y Eduardo) muchas gracias por su valiosa amistad, su apoyo cuando se les solicitó, por las convivencias y fiestas, me llevo un hermoso recuerdo de cada uno de ustedes.

A los compañeros de laboratorio M.C. María Belia Contreras, M.C. Irvin González, M.C. Daniel Lira, Ricardo Vega, Hilary, Elvis, Marco, a los técnicos Q.F.B. Miriam y Célida Martínez Rodríguez, gracias por sus aportes de experiencia en laboratorio, sus consejos y regaños que verdad aportan mucho al conocimiento.

A compañeros de otras áreas M.C. Isidro Márquez del laboratorio de Fitopatología por su apoyo en facilitarme algunos reactivos, al Dr. Federico Soto del laboratorio de Biorrecursos , al Dr. Luis Alfonso Amarillas Bueno del laboratorio de Biotecnología y Genómica, al I.Q. Werner Rubio del laboratorio de Análisis Nutrimental, al M.C. Pedro Bastidas y Claudia Olmeda del laboratorio de Plaguicidas, al Dr. José Benigno Valdez por su apoyo y colaboración de la parte estadística de este trabajo, al personal de administración en especial a Víctor Arana por su apoyo cuando se le solicitó, a la IBQ. Evelia Araiza Lizarde, por su valioso apoyo como asistente de dirección y por su amistad, a la Lic. Libia Limón, al Ing. Marco Cesar Martínez y Jorge Manjarrez por su apoyo técnico y disponibilidad, a Leslie Flores por su apoyo en la biblioteca, al personal de mantenimiento en especial a Leticia Santillán por sus consejos y amistad, a Don Goyo por su amistad, a mis compañeros de otras generaciones, M.C. Luis Angel Cabanillas, M.C. Ana María López, Dra. Isabel Cruz Lachica, M.C. Dominique Moreno Ayala y a todo el CIAD en general, muchas gracias me llevo un grato recuerdo de todos.

## DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada especialmente a Martha Alicia Valdez Lizarraga, que en todo este tiempo, me ha brindado su compañía, amistad, amor y comprensión, que ha estado conmigo hasta el final de esta carrera y me ha apoyado en todo, por sus sabios consejos, su hermosa compañía, por todos los bellos recuerdos que me regalaste y me sigues regalando, esta tesis va dedicada a tí, que eres mi motor para seguir adelante. A mis padres Ernesto Gurrola Chavez y María de Jesús Ramírez Picos, a mis hermanos y familia en general, gracias totales por siempre estar conmigo apoyándome en todo en cualquier situación, padres y hermanos muchísimas gracias.

**CONTENIDO**

**APROBACIÓN** ..... 2
**DECLARACIÓN INSTITUCIONAL** ..... 3
**AGRADECIMIENTOS** ..... 4
**DEDICATORIA** ..... 6
**CONTENIDO** ..... 7
**LISTA DE FIGURAS** ..... 10
**LISTA DE CUADROS** ..... 11
**RESUMEN** ..... 12
**ABSTRACT** ..... 13
**1. INTRODUCCIÓN** ..... 14
**2. ANTECEDENTES** ..... 16
2.1. Agua de Uso Agrícola y su Problemática ..... 16
2.2 Uso de Agua Residual Tratada en Actividades Agrícolas ..... 16
2.3 Microorganismos Patógenos en el ART ..... 17
2.4 Brotes Epidemiológicos Asociados al Consumo de Productos Agrícolas Irrigados con ART ..... 18
2.5 Normatividad Sobre el Uso de ART como Agua de Riego ..... 19
2.6 Indicadores Biológicos de la Contaminación del Agua ..... 20
2.6.1 Coliformes Fecales ..... 20
2.6.2 *Escherichia coli* ..... 21
2.6.3 *Salmonella* spp. ..... 22
2.7 Análisis de Riesgo y Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiológico (QMRA) ..... 23
2.7.1 Conceptualización de QMRA ..... 24
2.7.2 Implementación de QMRA ..... 26
2.7.2.1 Formulación del problema ..... 26
2.7.2.2 Evaluación a la Exposición ..... 27
2.7.2.3 Evaluación de efectos a la salud ..... 29
2.7.2.4 Caracterización del riesgo ..... 30
**3. HIPÓTESIS** ..... 32
**4. OBJETIVOS** ..... 33
4.1 Objetivo General ..... 33
4.2 Objetivos Específicos ..... 33
**5. MATERIALES Y MÉTODOS** ..... 34
5.1 Área de Estudio y Cuantificación Microbiológica ..... 34
5.1.1 Descripción de la Zona de Estudio ..... 34
5.1.2 Recolección de Muestras ..... 36

**CONTENIDO (continuación)**


5.1.3 Cuantificación de Microorganismos Indicadores Coliformes Fecales y *E. coli* ..... 38
5.1.3.1 Prueba de confirmación para Coliformes fecales ..... 39
5.1.3.2 Prueba de confirmación para *Escherichia coli* ..... 39
5.1.4 Identificación y Cuantificación de *Salmonella* ..... 39
5.1.4.1 Pruebas bioquímicas ..... 40
5.1.4.2 Confirmación por PCR ..... 40
5.1.5 Serotipificación de las Cepas de *Salmonella* spp ..... 42
5.1.5.1 Reacciones con antisueros polivalentes para antígenos flagelares de *Salmonella*. ..... 43
5.1.5.2 Preparación para los antígenos somáticos de *Salmonella* ..... 43
5.1.5.3 Reacciones con sueros para antígenos específicos Spicer Edwards: ..... 44
5.1.5.4 Inoculación de los sueros Spicer-Edwardas para antígenos específicos de *Salmonella* y antisueros polivalentes "O": ..... 44
5.2 Formulación del Problema ..... 45
5.2.1 Identificación del Peligro (*Salmonella* spp.) ..... 45
5.2.1.1 Generalidades ..... 45
5.2.1.2 Clasificación ..... 46
5.2.1.3 Estructura Antigénica ..... 47
5.2.1.4 Ciclo de vida y diseminación en el ambiente ..... 47
5.3 Evaluación de la Exposición ..... 49
5.3.1 Ruta de Exposición ..... 49
5.3.2 Concentración de *Salmonella* en Agua Residual (*Cw*) ..... 50
5.3.3 Cantidad diaria de *Salmonella* liberada al suelo mediante riego por goteo (*Nr*) ..... 51
5.3.4 Cantidad Acumulada de *Salmonella* Sobreviviente en el Suelo ($N_s$) ..... 51
5.3.5 Concentración Final de *Salmonella* en el Suelo ($CF_{ss}$) ..... 52
5.3.6 Concentración de *Salmonella* en Tomate ($C_{tad}$) ..... 53
5.3.7 Concentración de *Salmonella* Después de Desinfección ($C_{tdd}$) ..... 53
5.4 Evaluación de Efectos en la Salud ..... 54
5.4.1 *Salmonella* spp. Patogenicidad y Virulencia. ..... 54
5.4.2 Dosis Diaria de *Salmonella* Ingerida *(d)* ..... 56
5.4.3 Evaluación Dosis-Respuesta ..... 56
5.5 Caracterización del Riesgo ..... 57
5.5.1 Riesgo Diario de Infección por *Salmonella* $P_i$ *(d)* ..... 57
5.5.2. Riesgo Anual de Infección *PA(d)* ..... 58

**6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... 59
6.1 Determinación de Parámetros Fisicoquímicos e Indicadores Microbiológicos de Contaminación Fecal en ART ..... 59
6.1.1 Parámetros Fisicoquímicos de las Muestras de Agua de los Drenes ..... 59
6.1.2 Cuantificación de Coliformes Fecales y *Escherichia coli* ..... 61
6.2 Evaluación de Riesgo Microbiológico Cuantitativo (QMRA). ..... 63
6.2.1 Formulación del Problema ..... 64
6.2.1.1 Cuantificación de *Salmonella* spp ..... 64

**CONTENIDO (continuación)**


6.2.1.2 Confirmación de *Salmonella* spp por PCR ..... 65
6.2.1.3 Serotipos de *Salmonella* aislados del ART ..... 67
6.2.2 Evaluación de la Exposición ..... 69
6.2.2.1 Concentración de *Salmonella* en agua residual tratada (*Cw*) ..... 69
6.2.2.2 Cantidad diaria de *Salmonella* liberada en el suelo *Nr* ..... 70
6.2.2.3 Cantidad acumulada de *Salmonella* sobreviviente en el suelo (*Ns*) ..... 71
6.2.2.4 Concentración final de *Salmonella* en el suelo (*CFss*). ..... 72
6.2.2.5 Concentración de *Salmonella* en tomate antes de desinfectar (*Ctad*). ..... 74
6.2.2.6 Concentración de *Salmonella* después de la desinfección con Cloro (*Ctdd*) ..... 76
6.2.2.7 Dosis ingerida diaria de *Salmonella* (*d*) por consumo de tomate irrigado con ART ..... 77
6.2.3 Evaluación de Efectos en la Salud ..... 79
6.2.4 Caracterización del Riesgo ..... 82
**7. CONCLUSIONES** ..... 85
**8. BIBLIOGRAFÍA** ..... 86

## LISTA DE FIGURAS


| Figura | | Página |
|---|---|---|
| 1. | Mapa del distrito No.10 que comprende la región agricola de Culiacán- Humaya.. | 36 |
| 2. | Mapa de los puntos de toma de muestra, y los drenes en estudio……. | 39 |
| 3. | Ciclo de vida de *Salmonella* ……..…….…….. | 49 |
| 4. | Ruta de *Salmonella* en el escenario de exposición al riesgo….……...……...…. | 51 |
| 5. | Invasión de *Salmonella* al epitelio intestinal y respuesta inmunológica…..... | 56 |
| 6. | Gel de electroforesis donde se identificaron cepas positivas para el gen *pfk* de *Salmonella* spp……..……..…….. | 67 |
| 7. | Prevalencia de serotipos de *Salmonella* en drenes de estudio …..…….....….. | 69 |
| 8. | Variación en las diferentes dosis infecciosas diarias de *Salmonella* estimadas por dren y periodo de riego…….…… | 80 |
| 9. | Probabilidad de infección con *Salmonella* por la ingesta de tomate irrigado con ART, en un evento de una sola exposición……..….. | 83 |
| 10. | Probabilidades de infección con *Salmonella* por año…….…...… | 86 |

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro** **Página**


1. Localización geográfica de los puntos para la toma de muestras……..…….... 38
2. Componentes de la mezcla maestra para PCR……..……. .42
3. Clasificación taxonómica de *Salmonella* spp. y origen de aislamiento…….…..... 47
4. Valores promedio de parámetros fisicoquímicos de las muestras de ART……..... 61
5. Concentración de Coliformes fecales presentes en el agua residual tratada de los drenes Cedritos y El Papachal…….. 63
6. Concentración de E .coli presente en el agua residual tratada de los drenes Cedritos y El Papachal …….…..... 64
7. Serotipos encontrados de las cepas aisladas de *Salmonella* en el ART……...……... 69
8. Concentración de *Salmonella* en las muestras de ART……..……...……. 71
9. Concentración de *Salmonella* liberada en el suelo……...……...…… 72
10. Cantidad acumulada de *Salmonella* sobreviviente en el suelo……..... 73
11. Concentración final de *Salmonella* en el suelo……. 74
12. Concentración de *Salmonella* en tomate antes de desinfectar…….. 75
13. Concentración de *Salmonella* en tomate después de desinfección……..….. 77
14. Dosis ingerida diaria de *Salmonella* por consumo de una porción de tomate…….. 79
15. Probabilidad de infección de un solo evento……..... 82
16. Probabilidades de infección con *Salmonella* por año…….....……..…… 84

## RESUMEN

El estado de Sinaloa es el estado con mayor producción y exportación de productos hortícolas en todo el país, con una producción de hasta 12, 160,000 de toneladas de alimentos del campo en una superficie sembrada de 1,118,000 hectáreas, siendo los municipios de Culiacán y Navolato de los mayores productores, con cerca de 2,900,000 y 1,600,000 ton respectivamente. Sin embargo, en la temporada de estiaje, el suministro de agua se ve limitado, por lo que los agricultores buscan alternativas viables para abastecer la demanda de los cultivos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad del agua residual tratada (ART) en dos drenes del Valle de Culiacán (Cedritos, El Papachal y su convergencia hasta la costa), y determinar el riesgo de infección por *Salmonella* spp. bajo un escenario de posible reúso del agua residual tratada para el riego de hortalizas. Se realizó la cuantificación de Coliformes fecales y *Escherichia coli* como organismos indicadores de contaminación, y a *Salmonella* como patógeno de alto riesgo. La cuantificación de Coliformes fecales y *E. coli* se llevó a cabo mediante los métodos de filtración por membrana de la NMX-AA-102-SCFI-2006, y para la cuantificación de *Salmonella* se utilizó el método 1200 de la EPA. Los valores más altos de CF, *E. coli* y *Salmonella* se encontraron en el dren Cedritos en el mes de noviembre ($4.85x10^{8}$UFC/100 mL, $1.0x10^{8}$ UFC/100 mL y 12.330 NMP/L, respectivamente). Se identificaron once serotipos de *Salmonella* en los puntos de muestreo: (Enteritidis, Oranienburg, Sandiego, Javiana, Give, Senftenberg, Muenchen, Agona, Saprha, Goerlitz y Gatineau), estos dos últimos no habían sido reportados en México. La evaluación del riesgo se llevó a cabo mediante un escenario determinístico en una sola exposición y riesgo anual por el consumo de tomates potencialmente irrigados con ART contaminadas con *Salmonella*. La probabilidad mayor de infección con *Salmonella* por el consumo de tomate irrigado con ART resultó en un valor de $8.7x10^{-11}$ en una sola exposición, en el dren Cedritos en el mes de noviembre y de $2.373 \times 10^{-8}$ en riesgo anual en el mismo punto. Las altas concentraciones de Coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* en el ART en el área de estudio, nos indica que existe una probabilidad de riesgo de infección por consumir hortalizas potencialmente irrigadas con el ART, por lo que se recomienda no utilizar dicha agua con fines agrícolas.



**Palabras claves:** *Salmonella*, riesgo, exposición, escenario, infección, serotipo

## ABSTRACT

The state of Sinaloa is the state with the highest production and export of horticultural products in the whole country, with a production of up to 12,160,000 tons of food from the field in a planted area of 1,118,000 hectares, being the municipalities of Culiacan and Navolato of the largest producers, with about 2,900,000 and 1,600,000 tons respectively. However, during the dry season, the water supply is limited, so that farmers are looking for viable alternatives to supply the demand for crops. The objective of this research was to evaluate the quality of treated wastewater (TWW) in two drains from the Culiacan Valley (Cedritos, El Papachal and its convergence to the coast), and to determine the risk of infection with *Salmonella* spp. under a scenario of possible reuse of treated wastewater for the irrigation of vegetables. The quantification of fecal coliforms and *Escherichia coli* (like contamination indicator organisms) was performed, and *Salmonella* as a high-risk pathogen. The quantification of fecal coliforms and *E. coli* was carried out by the membrane filtration methods from the NMX-AA-102-SCFI-2006, whereas for *Salmonella* the EPA method 1200 was used. The highest values of FC, *E. coli* and *Salmonella* were found in the Cedritos drain during november ($4.85x10^{8}$CFU/100 mL, $1.0x10^{8}$ CFU/100 mL and 12.330 MPN/L, respectively). Eleven *Salmonella* serotypes were identified at the sampling points: (Enteritidis, Oranienburg, Sandiego, Javiana, Give, Senftenberg, Muenchen, Agona, Saprha, Goerlitz and Gatineau), the latest two serotypes there were no reported previously in Mexico. The risk assessment was carried out through a deterministic scenario in a only exposure and yearly by consumption of tomatoes potentially irrigated with TWW contaminated with *Salmonella*. The probability of infection by the consumption of tomato irrigated with TWW resulted in a value of $8.7x10^{-11}$, at the drain Cedritos in the month of november, and of 2,373 x $10^{-8}$ at its annual risk point. The high concentrations of fecal coliforms, *E. coli* and *Salmonella* in TWW from the area of study, indicates that there is a probability of infection risk by the consumption of vegetables potentially irrigated with TWW, so it is recommended not to use this water for agricultural purposes.



**Keywords:** *Salmonella*, risk, exposure, stage, infection, serotype

# 1. INTRODUCCIÓN

En México, el agua se destina principalmente a las actividades del sector agrícola. Tan solo en el 2017 se emplearon 66,800 $hm^3$, de los cuales, el 66.3% correspondieron a aguas superficiales y 36.4% a aguas subterráneas, por lo que esta actividad agrícola convierte a México en el séptimo país productor de alimentos a nivel mundial, con una producción de 32 millones de toneladas al año, y con ganancias de 587 mil 200 millones de pesos, (FAO, 2017). El estado de Sinaloa es el estado con mayor producción y exportación de productos hortícolas en todo el país, con una producción de hasta 12, 160,000 de toneladas de alimentos del campo en una superficie sembrada de 1,118,000 hectáreas, siendo los municipios de Culiacán y Navolato de los mayores productores, con cerca de 2,900,000 y 1,600,000 ton respectivamente, (SAGARPA, 2018).

Entre los cultivos más importante a nivel mundial destaca en primer lugar el tomate (*Solanum lycopersicum*), siendo México el principal exportador a nivel mundial con 24% de las exportaciones totales (FIRA, 2017). Sinaloa es el estado de mayor producción de tomate a nivel nacional con casi 1,090,000 toneladas, aportando el 28.78 % a nivel nacional, así mismo el municipio de Culiacán ya que según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP-SAGARPA, 2017) tan solo en la temporada del 2016-2017 se obtuvo una producción de 368,041 toneladas y ganancias de hasta 1,843,213 millones de pesos.

No obstante en el distrito 10 (Culiacán-Humaya) que comprende los municipios de Culiacán, Navolato, Angostura, Mocorito y Salvador Alvarado, en épocas de sequía la disponibilidad de agua es limitada, por lo que los agricultores buscan nuevas alternativas de agua disponible para su uso, y en este contexto, el agua residual tratada (ART) de la región podría ser una alternativa potencial para el riego de cultivos.

El uso de ART en actividades agrícolas, supone un riesgo potencial para la salud de la población, ya que puede contener microorganismos patógenos y otros contaminantes que pueden llegar a los productos del campo, (Lemarchand y Lebaron, 2003; Xie et al., 2008); por lo que es necesario determinar los niveles de contaminación microbiana y evaluar el riesgo de infección bajo un escenario de consumo de hortalizas irrigadas con esta agua, ya que la presencia de microorganismos patógenos en ART ha sido ampliamente reportada. A pesar del buen razonamiento de los agricultores, el uso de ART puede dañar gravemente salud humana y medio

ambiente principalmente a los patógenos asociados (Qadir et al., 2007)

En particular las plantas de ART situadas en las sindicaturas de Culiacancito (PTAR-Norte) y Villa Adolfo López Mateos tratan la mayor cantidad de aguas residuales producidas por la ciudad de Culiacán y Villa Adolfo López Mateos, respectivamente, cuyos drenes que derivan de estas PTAR, descargan sus cauces hacia la región costera. A lo largo de sus cauces, existen fuentes puntuales y no puntuales de contaminación, las cuales incrementan la carga microbiana de los drenes, la cual si se llegase a aplicar el uso potencial de ART para la producción agrícola de la región, conllevaría a riesgos a la salud para los consumidores de estos productos agrícolas.

Una alternativa de monitoreo y cuantificación de este riesgo, ampliamente utilizada, es la metodología de "Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico" (QMRA, siglas en inglés), la cual permite estimar la probabilidad de un riesgo a la salud por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos.

El propósito del presente proyecto fue evaluar el riesgo cuantitativo microbiológico por consumo de tomate en fresco, irrigado con ART potencialmente contaminada con *Salmonella*.

# 2. ANTECEDENTES

## 2.1. Agua de Uso Agrícola y su Problemática

El agua es el recurso natural más indispensable para la humanidad. Del 100% de agua existente en el planeta, solo un 3% corresponde a agua dulce, que se distribuye en cuerpos de agua superficial o subterránea, y de ésta, solo el 1% está disponible para el consumo o actividades humanas. La agricultura es la actividad productiva que demanda la mayor cantidad del agua dulce disponible (OMS, 2015). El incremento en la población mundial ocasiona fuerte presión en la producción de alimentos, y en particular una mayor producción agrícola, que a su vez incrementa la demanda de agua de riego, llegando a ocasionar problemas de escasez de este recurso (FAO, 2017).

En la actualidad el agua de uso agrícola es afectada por dos grandes problemas a nivel mundial; por una parte problemas de sequías debido al cambio climático y en segunda instancia la contaminación producto de actividades humanas como: industria, producción agropecuaria, recreación y domésticas (Meehl et al., 2007). Estas actividades a menudo introducen contaminantes a los cuerpos de agua, incluyendo metales pesados, agroquímicos, medicamentos y microorganismos patógenos para los humanos (Avigliano y Schenone, 2015). Lo anterior tiene como consecuencia que cerca de 1,000 millones de personas en todo el mundo no tengan acceso a una fuente de agua segura para su consumo (Connor, 2015).

Debido a la escasez de agua en diversas regiones del mundo, los productores de alimentos vegetales han optado por el uso de fuentes de agua alternativas, como el aprovechamiento del agua de lluvia reciclada o bien, el uso de aguas residuales tratadas (Yin y Patel, 2018).

## 2.2 Uso de Agua Residual Tratada en Actividades Agrícolas

El agua residual (AR) es una combinación de efluentes domésticos, industriales, de centros comerciales e instituciones públicas, drenaje urbano, así como efluentes agrícolas y pecuarios, entre otros (Corcoran et al., 2010), la cual recibe un tratamiento de saneamiento convirtiéndola en agua residual tratada (ART), que posteriormente es liberada a los cuerpos de agua superficiales. La

descarga de efluentes de agua residual tratada sobre cuerpos de agua representa problemas potenciales tales como: ruptura del equilibrio ecológico de los ambientes acuáticos por la disminución de oxígeno disponible, causado por el incremento en la demanda química y biológica de oxígeno por presencia de microorganismos, los cuales pueden ser agentes causantes de enfermedades, así como la contaminación química de los mantos freáticos por lixiviación y eutrofización causada por nitrógeno y fósforo de estuarios, lagos y represas (Von Sperling, 2005).

Sin embargo, el ART con fines agrícolas se ha utilizado en regiones con escases de agua, especialmente en países de Asia y África. Por ejemplo, en China el 7% de las tierras agrícolas (4.1 millones de hectáreas) son irrigadas con ART (Xie, 2008). En Pakistán, el 26% de la producción de vegetales depende del riego con ART. En países como España, Francia, Italia y Grecia se ha permitido el uso de ART para el riego agrícola, siempre y cuando ésta no provoque contaminación química y biológica de las aguas superficiales (Pedrero et al., 2010; UE, 2007; CE, 2016).

En las últimas décadas, en algunas regiones de México se ha optado por el uso de ART y ARNT (agua residual no tratada) con fines agrícolas, las cuales provienen de plantas tratadoras de la Ciudad de México y se derivan al valle de Tula y al Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo. Esta agua ha sido empleada para el riego de 75,000 a 90,000 hectáreas de cultivos agrícola entre los que destacan, maíz, frijol y alfalfa, (Jimenez, 2005; Cifuentes et al., 1994).

## 2.3 Microorganismos Patógenos en el ART

El agua residual tratada (ART) o no tratada (ARNT), ha sido considerada como el principal vehículo de microorganismos patógenos por la alta carga de material fecal de humanos y de animales domésticos o de granja que se vierten en ésta (Lemarchand y Lebaron, 2003), y es considerado un factor de riesgo microbiano importante por su potencial transferencia hacia frutas y hortalizas cuando son irrigados con esta agua (Decol et al., 2017). El agua puede acarrear agentes infecciosos como bacterias, virus, protozoarios o huevos de helmintos (FAO, 2003), los cuales cada año ocasionan alrededor de 600 millones de casos de enfermedades y son responsables de aproximadamente 3.4 millones de muertes en todo el mundo (OMS, 2019). Entre los patógenos más comúnmente reportados en ART se encuentran *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., Norovirus, Adenovirus, Virus de Hepatitis A, *Cryptosporidium* spp,

*Cyclospora cayetanensis* y *Giardia lamblia* (Yin y Patel, 2018).

## 2.4 Brotes Epidemiológicos Asociados al Consumo de Productos Agrícolas Irrigados con ART

Los brotes de infección de origen alimentario asociados con el consumo de frutas y hortalizas han aumentado considerablemente en las últimas décadas (Harris et al., 2003). Se estima que en los Estados Unidos de América ocurren 48 millones de infecciones transmitidas por los alimentos y donde un 46% de éstos son atribuidos al consumo de alguna fruta u hortaliza contaminada (Painter et al., 2013). Es por eso que recientemente el Acta de Modernización de la Ley de Inocuidad Alimentaria de los Estados Unidos (FSMA) contempla criterios rigurosos de calidad del agua para el riego de cultivos (FDA, 2013).

Estudios realizados en México, específicamente en la región del "Valle del Mezquital" (Hidalgo), han reportado que el uso de aguas residuales sin tratar ha traído graves consecuencias para la salud. Entre los problemas más frecuentes están las infecciones parasitarias en las personas como la ascariasis (Cifuentes et al., 1994; Jimenez, 2005).

Un estudio realizado por Castro-Rosas et al. (2012) en restaurantes de Pachuca Hidalgo, donde se analizaron ensaladas preparadas con hortalizas irrigadas con agua residual no tratada proveniente de la zona del Valle del Mezquital, determinó la presencia de diversos patotipos de *Escherichia coli* incluyendo la productora de toxina shiga (STEC), hasta en un 99% y un 2.3 % de 129 y 3 /130 muestras respectivamente.En este contexto, durante un desastre natural sucedido en Mayo del 2000 en el Valle de Chalco (Estado de México), un canal con agua residual se desbordó inundando las parcelas agrícolas, donde se produjo un brote infeccioso en las personas que habitan esa zona por diversos patógenos, incluyendo *E. coli* productora de toxina shiga (STEC), así como *Salmonella* y *Shigella*, lo que evidencia el potencial de infección que pueden provocar las aguas residuales (Cortez-Ortiz et al., 2002).

## 2.5 Normatividad Sobre el Uso de ART como Agua de Riego

Aunque en México no exista una ley que permita, pero tampoco prohíba el uso o reuso de agua residual tratada (ART), teórica y científicamente se sabe que esta no puede ser destinada para los campos de cultivo, dado que ésta puede no estar en condiciones aptas para el uso agrícola, según la nueva modernización de la Ley de Seguridad Alimentaria (FSMA, por sus siglas en inglés), la cual pretende aplicar los instrumentos regulatorios de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en Inglés), donde se hace referencia al agua que es utilizada para la irrigación de los productos cubiertos por las normas, Esta también incluye al agua utilizada en actividades durante el cultivo (como es el caso del agua que se aplica en un método de contacto directo con la fruta o el vegetal), además del agua utilizada en la cosecha, envasado y almacenamiento (FDA, 2013).

El agua que se utiliza para la irrigación de los campos agrícolas en México, debe de cumplir con la normativa nacional en ciertos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos aceptables para su uso, tales como los establecidos en Normas Oficiales Mexicanas, como la NOM-001-SEMARNAT-1996 (MOD 2017), que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales hacia aguas y bienes nacionales; así como la NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las ART que se reúsen en servicios al público, ésta con el objetivo de proteger al medio ambiente y a la salud de la población, y establece valores máximos de 2,000 NMP/100 mL de Coliformes fecales (SEMARNAT, 1998).

Para evaluar los parámetros anteriormente mencionados, la NOM-210-SSA1-2014, establece los métodos de pruebas microbiológicas para la determinación de organismos indicadores y patógenos, tales como Coliformes fecales, *Escherichia coli, Salmonella, Staphylococcus aureus,* entre otros (SEMARNAT, 2014). La NMX-AA-42-SCFI 2015 establece los criterios para el análisis de aguas y la enumeración por el Numero Más Probable (NMP) de organismos Coliformes totales y fecales por el método de tubos múltiples de fermentación. Así como también la NMX-AA-102-SCFI-2006, establece los criterios de calidad del agua para la detección y enumeración de organismos Coliformes, organismos Coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* presuntiva por el método de filtración por membrana (SEMARNAT, 2015).

## 2.6 Indicadores Biológicos de la Contaminación del Agua

La calidad microbiológica del agua se evalúa generalmente monitoreando bacterias indicadoras de contaminación fecal, que se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente (Pinfold et al., 1993).

La identificación de los microorganismos patógenos en cualquier muestra representa un reto técnico, económico y de tiempo, por lo que las normativas nacionales e internacionales reconocen y utilizan a algunos grupos de microorganismos como indicadores de contaminación fecal en el agua, entre estos están los Coliformes fecales y totales, *Enterococcus* y *Streptococcus faecalis*, bacteroides y colifagos, los cuales se relacionan con la potencial presencia de patógenos, pero que ofrecen ventajas en los modos de identificación, tiempo y costos, por lo que son frecuentemente evaluados para determinar la calidad del agua (Reder et al, 2015; Sidhu et al, 2013).

Para que los laboratorios acreditados apliquen las normas oficiales y puedan evaluar la calidad microbiológica del agua y su correlación con microorganismos patógenos, las bacterias indicadoras fecales (BIF) son las más ampliamente utilizadas, entre las que destacan los Coliformes fecales y *E. coli* (Xue et al., 2017).

### 2.6.1 Coliformes Fecales

Los Coliformes fecales (CF) representan una amplia variedad de bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, y son comúnmente usados como indicadores de contaminación fecal (Collins y Rutherford, 2004). Se definen como organismos aerobios o anaerobios facultativos capaces de crecer en un medio líquido de lactosa, con producción de ácido y gas en un período de 24 h a 44,5 °C ± 0,2 °C (SSA, 2014). En México para determinar la contaminación por microorganismos patógenos en aguas superficiales, se toma como indicador a los Coliformes fecales. En este sentido, el límite máximo permisible de Coliformes fecales para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, es de 1,000 y 2,000 NMP/100 mL (como promedio mensual y diario, respectivamente) (SEMARNAT, 1996).

Aunque el uso de las BIF como indicadores muestra algunos inconvenientes tales como la carencia

de especificidad para discriminar entre los tipos de fuentes fecales (Animales o humanos), se emplean comúnmente en países en vías de desarrollo como indicadores de la posible presencia de patógenos, con la ventaja de ser identificados mediante metodologías simples, económicas y mantienen cierto nivel de confianza (Tran et al., 2015).

Es reconocido que algunas bacterias del grupo de Coliformes fecales como *Klebsiella, Enterobacter y Citrobacter* no son necesariamente de origen fecal (Doyle y Erickson, 2006), y aunque los estudios epidemiológicos han relacionado enfermedades asociadas con altos niveles de Coliformes fecales, éstas no son específicas de fuentes humanas y pueden no ser un indicativo de contaminación por aguas residuales humanas (Boehm et al., 2009). Por lo tanto, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en ingles), recomienda el uso de *Escherichia coli* como un indicador confiable para identificar la contaminación microbiana de fuente fecal humana en cuerpos de agua dulce.

### 2.6.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* se utiliza ampliamente como organismo indicador de contaminación en alimentos y agua, en los cuales se pueden presentar niveles inaceptables de contaminación fecal (Atlas.,1993), esto debido principalmente a que la mera presencia de *E. coli* en alimentos o agua no indica directamente la presencia de microorganismos patógenos, pero sí infiere en el riesgo de encontrar la posible presencia de bacterias y virus potencialmente patógenos como *Salmonella* spp. o el virus de la hepatitis (Brussow et al., 2004).

*Escherichia coli* es una bacteria en forma de bacilo (bastón), Gram negativa, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Puede ser aerobia o anaerobia facultativa, es oxidasa negativa y puede tener formas sin movilidad y móviles con flagelos perítricos, (Matthew et al., 2013).

Es una de las especies entéricas más predominantes en el intestino de los humanos y los animales de sangre caliente, como parte de la microbiota intestinal normal. Algunas variantes de *E. coli* proporcionan beneficios para la salud del huésped, sin embargo existen grupos de *E. coli* virulentos que pueden ocasionar enfermedades diarreicas (Lampel et al., 2012). Se conocen seis grupos de *E. coli* virulentas, donde cada uno, por sus características y propiedades de virulencia produce una enfermedad por mecanismos de infección diferentes. Estos grupos son: *E. coli* enterotoxigénica

(ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC). De estos patotipos, se sabe que los primeros cuatro se transmiten a través de alimentos o agua contaminados; EHEC, especialmente el serotipo O157:H7, a menudo está implicado en brotes de transmisión alimentaria en todo el mundo (Majowicz et al., 2014). Desde su descubrimiento en 1982, *E. coli* O157: H7 se ha convertido en un importante problema de salud pública a nivel mundial debido a su baja dosis infectiva, con un mínimo de hasta 10 células (Willshaw et al, 1994). Las toxinas Shiga de *E. coli* O157, que están codificadas por los genes *stx1* y/o *stx2*, son los principales factores de virulencia en la progresión de la enfermedad del síndrome hemolítico urémico (HUS), causado frecuentemente por *E. coli* O157:H7 (De la Torre et al, 2014). *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), incluidos el serotipo O157 y otros no O157 causan hasta 2,800,000 infecciones agudas al año en los Estados Unidos de América, y de éstas, una parte conduce a unos 4,000 casos de Síndrome Hemolítico Urémico (HUS), 270 casos de enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), y aproximadamente 230 muertes (Majowicz, 2014).

### 2.6.3 *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas y móviles mediante flagelos perítricos, a excepción de los serotipos Pullorum y Gallinarum. Se clasifica en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Grimont y Weill, 2007) y en ambas especies se han identificado más de 2,500 serotipos, todos considerados patógenos para animales y humanos, aunque en la mayoría de las infecciones en humanos, sólo 16 serotipos ocasionan más del 90 % de los casos, y dentro de éstos, los serotipos Typhimurium y Enteritidis ocasionan alrededor del 50% de los casos (Tennant et al., 2016).

*Salmonella* es el género bacteriano que ocupa el primer lugar a nivel mundial como causante de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) ocasionando alrededor de 180 millones de casos y 298 mil muertes en todo el mundo (Besser, 2017), tiene una dosis de infección que va desde 10 a 100,000 células (Murray et al., 2015) y en el 52% de los casos corresponden a infecciones por *Salmonella* no tifoidea y 37% a casos son tifoideos.

SNT ha sido reconocida como una de las principales causas de infecciones bacterianas invasivas en niños pequeños y personas con Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en África subsahariana, así como en ancianos y personas inmunocomprometidas en todo el mundo (Majowicz et al., 2010; Reddy et al., 2010). Por otra parte, *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi A y B causan la fiebre entérica, que es una enfermedad sistémica febril y que se presenta específicamente en humanos (Tanner y Kingsley, 2018).

*Salmonella* es un patógeno para los humanos ubicuo en la naturaleza. Se encuentra como comensal y patógeno en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, causando casos asintomáticos y sintomáticos en animales de granja y los humanos (Perron et al., 2008). La naturaleza ubicua de *Salmonella* puede facilitar un estilo de vida cíclico pasando del hospedero al ambiente y regresar a un nuevo hospedero (Winfield y Groissman, 2003). *Salmonella* es introducida en el medio ambiente a través de las heces de humanos y animales, y su dispersión hacia los bienes de uso humano y al realizar prácticas inadecuadas en granjas para la depuración de las heces, o por la práctica del fecalismo al aire libre.

*Salmonella* se encuentra frecuentemente en aguas residuales tratadas (ART) y no tratadas (ARNT), es una de las bacterias más predominantes en este tipo de agua y generalmente están presentes en grandes cantidades en ARNT ($10^3$-$10^4$ UFC/L) y todavía puede estar presente en el efluente de ART después de un avanzado tratamiento secundario, que incluye coagulación, filtración y desinfección (Maier et al., 2000; Wéry et al., 2008).

## 2.7 Análisis de Riesgo y Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiológico (QMRA)

El análisis de riesgos es un método que se utiliza para elaborar una estimación de los riesgos en la salud y la seguridad humana, además de identificar y aplicar medidas adecuadas para controlar los riesgos y comunicarse con las partes interesadas para notificarles estos riesgos. Puede utilizarse para respaldar y mejorar la elaboración de normas, así como para abordar cuestiones de inocuidad de los alimentos resultantes de los nuevos peligros o de desajustes en los sistemas de control de los alimentos (OMS, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), describe al análisis de riesgo como un proceso compuesto por tres elementos: Evaluación del riesgo, gestión del riesgo y comunicación del riesgo.

La evaluación de riesgos es la etapa más compleja, consiste en utilizar tres herramientas de información científica para describir la probabilidad y magnitud de un daño atribuido a un peligro específico. Por otra parte la gestión del riesgo incluye todas las actividades realizadas para controlar un peligro, mientras que la comunicación de riesgos es el intercambio de información y opiniones acerca de un peligro entre los interesados (Deniis et al., 2002).

Una de las metodologías más empleadas para estudiar la problemática derivada de la contaminación microbiológica por el uso de ART en actividades agrícolas es QMRA. Esta metodología permite cuantificar el riesgo a la población por manipulación o ingesta de productos contaminados con microorganismos patógenos. Además de servir como una herramienta de investigación, aporta información pertinente para la aplicación de distintas normas relacionadas con la calidad de los alimentos y para la toma de decisiones cuando ocurren casos de brotes epidemiológicos asociados a alimentos.

Para poder realizar un QMRA, las evaluaciones de riesgo microbiológico requieren modelos de predicción matemática de dosis-respuesta validados, esto para asegurar la precisión y valoración de la incertidumbre.

Al emprender un QMRA, se debe considerar la carga tanto de morbilidad como de mortalidad del patógeno en estudio, para construir una imagen completa del impacto de ese patógeno en la salud humana. La utilización de datos de los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) o (DALY, siglas en inglés) es un enfoque aceptado para definir las cargas en la salud de una población dada. Al calcular una puntuación DALY a diferentes resultados, se les asigna una ponderación de gravedad entre 0 (sin efecto) y 1 (muerte), para reflejar el deterioro de la salud causado a una persona infectada. Cuanto mayor sea el peso de la gravedad, mayor será el deterioro de la salud, los pesos de gravedad para muchas enfermedades y lesiones se pueden encontrar en Murray y López (1996).

### 2.7.1 Conceptualización de QMRA

Para estimar el riesgo de eventos patológicos en los humanos ocasionados por microorganismos, se ha implementado la evaluación cuantitativa de riesgo microbiano (QMRA, siglas en inglés), está comprendida en la primera fase del análisis de riesgos, y consiste en evaluar la probabilidad de

ocurrencia de un peligro específico, y se refiere al cálculo de riesgo en términos de probabilidades de infección o de la contaminación microbiana de alimentos o el agua. Actualmente el QMRA se está aplicando para la protección del agua potable y los alimentos mediante la conceptualización y cuantificación de algún patógeno de interés (Soller et al., 2006).

La conceptualización de QMRA requiere de la definición de ciertos conceptos, tales como: peligro, evento peligroso, exposición y riesgo.

Se refiere a "Peligro" al agente causal de un impacto adverso en la salud de las personas. El uso de QMRA para estudiar a la utilización, suministro y consumo de agua o alimentos irrigados con agua de origen residual, se contemplan como peligros a los microorganismos patógenos que pueden tener un impacto adverso en la salud, (OMS, 2016). Así mismo "Evento peligroso" hace referencia a eventos que pueden introducir patógenos en el suministro de agua o no eliminarlos. Estos pueden ocurrir en cada paso de la cadena de suministro de agua, por ejemplo dependiendo la fuente; (ejemplos, eventos de lluvia que acareen detritos o material con contaminantes a cuerpos de agua superficiales, desechos fecales humanos o animales en el suministro de agua; en tratamiento (por ejemplo, fallas en la filtración o desinfección); en la red de distribución (por ejemplo, trabajos de reparación inadecuados que introducen contaminación microbiana) y en los hogares (ejemplos; manejo de contenedores de almacenamiento con manos sucias), (OMS, 2016). Por otra parte se considera a la "Exposición" como la situación en donde un individuo pueda estar expuesto al peligro, para esto se requiere de un escenario, donde se presentan las diferentes rutas que el peligro (llámese agente patógeno) pueda tener contacto con el agua y/o bien en sí directamente con el individuo provocando un riesgo a la salud (OMS, 2016).

En este contexto, "Riesgo", se define en un sentido teórico y estadístico como "la probabilidad de que ocurra un fenómeno indeseado o un daño". El daño puede ser la aparición o existencia de un proceso patológico o de complicaciones de un evento, ocasionado por un "Peligro". Por tanto, el riesgo es la probabilidad de que ese evento o su complicación ocurra por la presencia del "Peligro", y en microbiología, ese peligro es representado por microorganismos capaces de desencadenar el daño (Plaut, 1984).

Por lo tanto, QMRA es una herramienta de apoyo a la decisión que proporciona al administrador de riesgos una imagen objetiva y racional de lo que se sabe (o se supone, según el juicio de expertos) sobre los riesgos asociados con el suministro de agua. El resultado del proceso de QMRA es una evaluación de la seguridad del sistema de suministro de agua, basada en la comprensión de los peligros, los eventos peligrosos y la validez de las medidas de control en el sistema de

suministro de agua y su importancia relativa, (OMS, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) están desempeñando un papel importante en las deliberaciones internacionales para organismos de normalización (como el *Codex-Alimentarius*) en la aplicación de QMRA para abordar problemas complejos de seguridad alimentaria (Dennis et al., 2002). El QMRA es una herramienta valiosa para estimar estadísticamente la probabilidad de que un evento dañino que se presente, según los modelos de exposición y dosis-respuesta. Este tipo de evaluación proporciona información sobre la identidad y la caracterización de los riesgos que se pueden utilizar para desarrollar estrategias de control (Rose et al., 1995).

### 2.7.2 Implementación de QMRA

La aplicación del QMRA como herramienta para estimar un riesgo para la salud humana, se lleva a cabo a través de las siguientes etapas: (1) identificación del peligro, (2) evaluación de la exposición, (3) evaluación dosis-respuesta, y (4) caracterización del riesgo (Ahmed et al., 2010).

2.7.2.1 Formulación del problema. Las evaluaciones estadísticas de brotes epidemiológicos ocasionados por el consumo de alimentos o agua, son el principal enfoque para determinar la importancia de los peligros, donde pocas veces se identifica el agente etiológico, y por lo tanto, hay una investigación inadecuada y escasos informes para llevar a cabo el primer paso en la evaluación de riesgos. En la formulación del problema, se sientan las bases de la investigación del problema a evaluar y se toman en cuenta aspectos importantes como el origen del problema a investigar, oportunidades de gestionar el riesgo, impactos que puedan surgir aparte de la salud, el tiempo requerido para hacer la evaluación, así como los recursos necesarios para realizar la evaluación (OMS, 2016).

Un elemento clave a considerar en la formulación del problema es la identificación del peligro que es la determinación del patógeno más importante para contribuir a la carga general de la enfermedad, así mismo, la descripción de su virulencia, prevalencia y su relación con el ambiente y la población en el área de estudio (OMS, 2016).

La identificación de peligros se logra observando y definiendo los tipos de efectos adversos para la salud en humanos, asociados con la exposición de agentes infecciosos en los alimentos. Estos incluyen los índices de morbilidad, la gravedad de la enfermedad y los índices de mortalidad. Además de la evidencia epidemiológica que vincula las diversas enfermedades con lo particular, determinando la ruta de exposición que es un componente importante de esta identificación (Rose et al., 1995), y generalmente estos datos son obtenidos de casos históricos y de literatura científica. También se determina la vía de exposición general, incluyendo en ésta, la fuente de exposición y del patógeno, además de las actividades humanas que puedan conducir a diferentes niveles de exposición (OMS, 2016).

Además, datos importantes a considerar e incluir en la identificación del peligro, son los resultados de salud humana que son de interés, esto dependiendo del propósito de la evaluación de riesgos. En este contexto, los resultados de salud humana pueden incluir: infección, enfermedad, secuelas, o medidas generales de la carga de enfermedad que agreguen el impacto de todos estos resultados, esto con el objetivo de comparar el riesgo calculado con un objetivo regulatorio, los requisitos de la regulación (probabilidad anual de infección o AVAD) impulsarán la salud seleccionada de los resultados (OMS, 2016).

2.7.2.2 Evaluación a la Exposición. En esta etapa se lleva a cabo la recopilación de la mayoría de los datos del estudio, se describen las vías a través de las cuáles una población puede estar expuesta al peligro (un microorganismo en este caso), y se identifican escenarios (rutas de exposición) que describen la forma de exposición, distribución y consumo de agua o alimentos que contengan el patógeno (Lammerding y Paoli, 1997).

La estructura fundamental de la evaluación a la exposición incluye cualquier posible evento o escenario peligroso que debe considerarse en la evaluación dentro de la ruta general de exposición, esto para cumplir con los objetivos de gestión de riesgos identificados puede ser útil construir un diagrama que identifique todos los componentes del sistema que deben cuantificarse en la evaluación de riesgos (OMS, 2016).

La evaluación de la exposición puede comenzar con determinar la prevalencia de patógenos en las materias primas (por ejemplo, de la granja a la mesa), cabe señalar que los datos derivados de esta etapa, generalmente se obtienen de manera empírica, donde se realiza la búsqueda (preferentemente cuantitativa) del patógeno de interés, por lo que cada caso de estudio ofrecerá diferentes grados de

exposición, también puede comenzar con la descripción de la población (datos obtenidos de censos o encuestas).

Para simplificar el sistema ambiental a una ruta de exposición definida y cuantificable, en la evaluación de la exposición, la magnitud y la frecuencia de la exposición de cada uno de los patógenos identificados y cuantificados se correlacionan a las vías de exposición durante cada combinación de condiciones del evento (OMS, 2016).

Una vez determinada la vía de exposición, el patógeno a cuantificar y el método a utilizar para la cuantificación, se elige qué descriptores o parámetros se estimarán, tomándose en cuenta que el valor a estimar depende del propósito de la evaluación, los escenarios de exposición y cómo se caracterizará el riesgo (OMS, 2016). Las estimaciones puntuales pueden incluir la concentración de patógeno (media, mediana, cuantil 95 o máxima), alternativamente se puede ajustar una distribución de probabilidad paramétrica a los datos para describir la variabilidad en la concentración, por lo tanto, sea cual sea el método aplicado, se debe probar el impacto en la concentración y los resultados de la evaluación de riesgo posterior (OMS, 2016).

Las unidades cuantificables es otro factor a considerar, por ejemplo; las concentraciones informadas basadas en la inferencia de NMP son concentraciones predichas de datos de presencia o ausencia, y con frecuencia incluyen resultados censurados a izquierda y derecha. Las unidades en NMP a menudo se suponen para representar datos continuos; sin embargo, cuando se basa en una tabla NMP estándar (por ejemplo, 3 × 3 o 5 × 5), los datos

son categóricos, es decir, solo es posible un número discreto de resultados, dependiendo de la presencia o ausencia). La importancia de esta simplificación depende del contexto de la evaluación de riesgos y de la precisión requerida para el análisis estadístico (OMS, 2016).

En pasos subsecuentes se incluyen la cantidad del patógeno presente en el alimento ingerido, las frecuencias de exposición al peligro (alimento ingerido), así como el consumo per-cápita de cada alimento a evaluar (Ferrer et al., 2012; Tauzene et al., 2018).

En general, la evaluación de la exposición implica tres pasos: (1) definir las vías de exposición, (2) cuantificar cada componente de las vías de exposición y (3) caracterizar la exposición, considerando las unidades de dosis. En cualquier caso, la intención u objetivo principal de la evaluación de la exposición, es rastrear el riesgo de la población a patógenos y estimar la probabilidad de ser ingerido por el consumidor (OMS, 2016).

2.7.2.3 Evaluación de efectos a la salud. En esta etapa, las enfermedades se identifican y se evalúan para cada patógeno de referencia, así mismo se estima la probabilidad y consecuencia de varios problemas de salud y se evalúan los resultados (que potencialmente incluyen infección, enfermedad y/o impactos en la salud a largo plazo).

Este paso describe la relación entre el número de patógenos que se ingieren en una cantidad de alimento dado (dosis), así como de la infección potencial (respuesta), del hospedador, y estos datos provienen de estudios de alimentación humana, infección, colonización bacteriana y excreción del microorganismo, generalmente obtenidos de literatura previamente desarrollada para cada microorganismo en particular (Rose et al., 1995).

La evaluación de dosis-respuesta se utiliza para traducir la exposición final a una cantidad de patógenos y la respuesta en la salud de una población de consumidores, es importante que las unidades de dosis sean consistentes con las seleccionadas en el modelo dosis-respuesta.

La mayoría de las evaluaciones de riesgos utilizan información de dosis-respuesta de la literatura publicada, se debe tener cuidado de qué modelo se va a seleccionar, además de cuáles valores de los parámetros son apropiados para el estudio de riesgos y eso al interpretar los cálculos, se consideran las implicaciones de los supuestos subyacentes a los números seleccionados.

Los principios clave deben ser considerados para la aplicación de modelos de dosis-respuesta en QMRA:

- Los parámetros dosis-respuesta de los estudios publicados deben evaluarse a la luz de los datos de observación, algunos modelos se basan en pruebas científicas más sólidas que otros.
- Los datos de dosis-respuesta también deben evaluarse a la luz de la población de la que han sido recopilada y cuán representativa es esta población de la población general y de cualquier subpoblación sensible dentro de la población general.
- Aunque la incertidumbre de los parámetros asociada con el modelo de dosis-respuesta es una consideración importante dentro de QMRA, muchas otras formas de incertidumbre (por ejemplo, idoneidad del modelo, representatividad de la cohorte y del patógeno) también deben abordarse explícitamente.
- Las aproximaciones de dosis bajas deben evaluarse para determinar su idoneidad en un contexto de exposición dado.
- Las unidades de dosis son diferentes entre los patógenos y deben tenerse en cuenta en la aplicación práctica de los modelos para evaluación de riesgos (OMS, 2016).

En ausencia de información de infectividad específica del patógeno o para estimar el peor de los

casos de una cepa de un patógeno particularmente virulento, la curva de riesgo máximo se puede utilizar como límite superior, cuando la dosis se calcula como el número discreto de patógenos ingeridos (en lugar de la dosis media en el medio de exposición), es apropiado usar un modelo condicional de dosis-respuesta en lugar del "Exponencial" o el "Beta-Poisson" que son los modelos frecuentemente más utilizados (Haas, 2002).

La evaluación dosis-respuesta es dependiente de los datos existentes sobre patógenos específicos y las respuestas históricamente descritas, estos dependen sobre todo del estado inmune del huésped (consumidor), por lo que hay patógenos en los que su evaluación dosis-respuesta aun no es completamente dilucidada. En el caso de *Salmonella* no existen restricciones, ya que es uno de los microorganismos más estudiados en este campo de la ciencia, por lo que los criterios de evaluación están disponibles en el acervo literario. Las diferencias en la respuesta entre varias poblaciones susceptibles son características importantes en este paso (Gerba et al., 1996).

La mayoría de los modelos de dosis-respuesta comúnmente aplicados dependen de la dosis media por evento de exposición, esto es cuantificado como dosis de exposición ($C\ q$),

dónde: "$C$" es la concentración de patógenos en el medio de exposición y "$q$" es la cantidad de material ingerido o inhalado por evento. Las unidades de "$C$" y "$q$" dependen de la vía de exposición y pueden basarse en la masa para la ingestión de tierra o alimento (mg, g) y volumen para consumo de agua (mL, L) o inhalación ($m^3$) por exposición (OMS, 2016). La dosis media, es una variable que puede tomar cualquier valor mayor o igual a 0; sin embargo, en los microorganismos son unidades discretas, y el número de organismos a los que está expuesto un individuo siempre será un número discreto (0, 1, 2, 3... etc.), (OMS, 2016).

2.7.2.4 Caracterización del riesgo. En la caracterización del riesgo, la información de la evaluación de la exposición y la evaluación de los efectos en la salud son combinados para generar una medida cuantitativa de riesgo (OMS, 2016). Al combinar esta información de las evaluaciones de exposición y efectos sobre la salud, es esencial tener en cuenta la consistencia del estudio y se toman factores importantes que influyen en la probabilidad de riesgo tales como: (1) las evaluaciones de exposición y los efectos sobre la salud se centran en los mismos peligros, (2) la misma población o subgrupos de población y (3) el mismo marco de tiempo (OMS, 2016). La caracterización del riesgo ha sido bien documentada en brotes de infección alimentaria, donde el consumo de una sola ración ha provocado enfermedades, por lo tanto, variarán dependiendo de las

concentraciones de microorganismos en el alimento, la distribución en toda la comida, la cantidad consumida y cuanto mayor sea la exposición será mayor el riesgo (Rose et al., 1995).

Las medidas cuantitativas de riesgo deben combinar, de alguna forma, con una expresión de los dos componentes cuantitativos de riesgo, es decir, alguna medida de la probabilidad de que ocurra el riesgo, así como también el tamaño del impacto en caso de que ocurra ese riesgo. Las medidas cuantitativas de riesgo pueden ser deterministas (es decir, valores únicos o estimaciones puntuales) o probabilísticas (lo que significa que las distribuciones de probabilidad se utilizan para describir las variables y los resultados del modelo). Para fines de la evaluación, se pueden aplicar diferentes estadísticas para cuantificar el riesgo, además puede definirse por una variedad de resultados, que incluyen infección, enfermedad y AVAD (años de vida ajustados por discapacidad) que pueden definirse para diferentes escalas de tiempo, incluida una sola exposición o exposición durante un año (OMS, 2016). La medida de riesgo anual tiene dos ventajas claras sobre una sola exposición o medida de riesgo diaria. En primer lugar, cuando las exposiciones son menos frecuentes (por ejemplo, algunas veces al año en comparación con la exposición diaria) existe una mayor probabilidad de que la infección puede ser tolerada por evento. En segunda, un objetivo anual reconoce la variabilidad del riesgo y permite un mayor riesgo de ser tolerado en algunas ocasiones (por ejemplo, debido a factores estacionales o impulsados por eventos) siempre que el riesgo anual está por debajo del objetivo de salud. No obstante, si el objetivo de gestión es contener brotes potenciales, un objetivo de salud diario podría ser ventajoso (Signor y Ashbolt, 2009).

Un principio clave dentro de la caracterización del riesgo es evaluar el impacto de la incertidumbre y la variabilidad en los parámetros de entrada en la estimación general del riesgo, en particular, cómo pueden influir en las recomendaciones para la gestión del riesgo que se deriva de la evaluación. Aquí un paso importante es garantizar que se identifiquen las fuentes relevantes de incertidumbre y variabilidad, incluida la medida en que cada factor se contabiliza cuantitativamente en los cálculos. Para aquellos factores que no se han incorporado cuantitativamente, es importante revisar si se espera que influyan en el resultado y de qué manera (OMS, 2016).

## 3. HIPÓTESIS

1. Las concentraciones de Coliformes fecales y *Escherichia coli* en ART rebasan los límites permisibles por la NMX-AA-102-SCFI-2006 alcanzando valores de hasta $1x10^{6}$ UFC/100 mL.

2. La concentración de *Salmonella* spp. se encuentra entre 15 y 20 NMP/L.

3. Existen al menos dos serotipos de *Salmonella* en las muestras analizadas que han sido implicados anteriormente en brotes infecciosos causados por el consumo de frutas y hortalizas consumidas en fresco.

4. El riesgo de infección por consumo de tomate irrigado con ART de la zona de muestreo contaminada por *Salmonella* es menor a $1x10^{-7}$.

# 4. OBJETIVOS

## 4.1 Objetivo General

Estimar el riesgo de infección con *Salmonella* por el consumo de tomate irrigado con ART.

## 4.2 Objetivos Específicos

1.- Cuantificar a los Coliformes fecales y *Escherichia coli* en agua residual tratada de los drenes analizados.

2.- Cuantificar a *Salmonella* spp. en el agua residual tratada de los drenes en estudio.

3.- Determinar los serotipos de *Salmonella* presentes en las muestras analizadas del agua de los drenes en estudio.

4.- Evaluar el riesgo de infección con *Salmonella* por el consumo de tomate potencialmente irrigado con ART en el área de estudio.

# 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología se dividió en dos etapas una cuantificación de microorganismos indicadores de contaminación y patógenos en la zona de estudio y la otra en una evaluación de riesgo microbiológico cuantitativa (QMRA) , aplicada y contextualizada con base a las cuatro etapas establecidas para la aplicación de esta metodología: 1) Definición del problema; 2) Evaluación de la exposición; 3) Evaluación de los efectos a la salud; y, 4) Caracterización del riesgo.

## 5.1 Área de Estudio y Cuantificación Microbiológica

### 5.1.1 Descripción de la Zona de Estudio

El estado de Sinaloa es considerado el estado con mayor producción agrícola del país, ya que en 2017, de acuerdo con datos de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, se produjeron 892,016.07 toneladas de alimentos del campo, en una superficie sembrada de 91,429.70 hectáreas (SEMARNAT, 2017), y para ello se consignó un volumen superior a 9,005.4 $hm^3$ de agua. Esto trajo como aporte económico más de 48 mil 448 millones de pesos, donde el distrito de riego No. 10 (Figura 1), que comprende al Valle de Culiacán-Humaya, representa la segunda zona de mayor producción en el país, con una superficie sembrada de 194,038.6 hectáreas y que cada año requiere de más de 1,650,763.8 metros cúbicos de agua para abastecer dicha producción (CONAGUA, 2017).

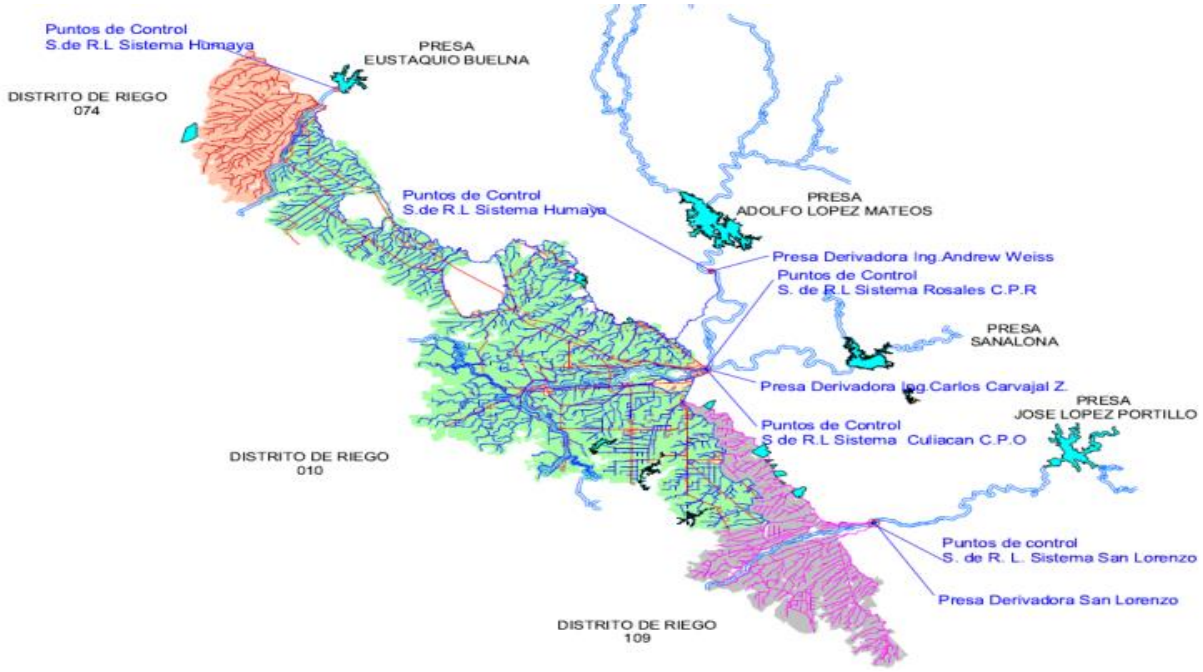


**Figura 1**. Mapa del distrito de riego No. 10 (en color verde claro), donde está incluída la región agrícola Culiacán- Humaya.

En el estado de Sinaloa, específicamente en el distrito de riego número 10, que comprende la región del valle de Culiacán-Humaya, la mayor parte del agua que se utiliza para riego proviene de una red de canales que son abastecidos de los ríos San Lorenzo (derivado de la presa "El Comedero"), así como los ríos Tamazula y Humaya (derivados de las presas "Sanalona" y "Adolfo López Mateos" respectivamente). Estos dos últimos forman el río Culiacán, el cual ha servido para abastecer una red de canales de riego en la región del distrito 10 Culiacán-Humaya. Aunque no se conoce de manera oficial el uso de aguas residuales tratadas para la irrigación de campos de cultivo en el valle de Culiacán, en este estudio se ha considerado al distrito 10 (Culiacan-Humaya), como zona propensa al peligro, debido a que en época de estiaje el abastecimiento de agua es limitado y porque en dicha zona se encuentran dos drenes donde se vierte el agua proveniente de plantas de tratamiento de agua residual (PTAR), los cuales pudiesen en algún momento servir como opción para irrigación en las actividades agrícolas aledañas a estos drenes.

Esta zona está comprendida en las sindicaturas de Culiacancito y Villa Adolfo López Mateos (El Tamarindo). En la primera (PTAR-Norte) ubicada en, la sindicatura de Culiacancito (24°, 49', 27" N; 107°, 33' 08" W), existe una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) que utiliza un

sistema primario avanzado en el que se llevan a cabo los tratamientos de ( Desbaste grueso, desbaste fino, medición de flujo, coagulación, desarenador y desnatado, floculación, sedimentación, desinfección, espesado, digestión, deshidratación), la cual capta un influente de hasta 1700 L/s y genera un efluente de 1533 L/s, y que recibe casi un 85% del agua residual proveniente de la Ciudad de Culiacán. La segunda PTAR, localizada en la comunidad de Villa Adolfo López Mateos (El tamarindo) (24°, 53', 26" N; 107°, 38', 16" W), es una planta de laguna de oxidación (Estabilización) y proceso biológico anaerobio facultativo con un influente de 13 L/s y un efluente de 12 L/s, tratando un volumen diario de 1,123 $m^3$. El agua derivada de estas dos plantas de tratamiento es vertida hacia dos drenes; El dren Cedritos en la sindicatura de Culiacancito, y El Papachal ubicado en Villa Adolfo López Mateos. Estos dos drenes siguen su cauce hacia la zona baja de la región, convergen y se fusionan en el poblado "El Paraíso", y continúa su cauce hasta su desembocadura en la bahía de Santa María, Navolato. Cabe señalar que a través de todo el cauce de los drenes existen pequeños poblados con actividades agrícolas e industriales donde se ha detectado el aporte de aguas pluviales, escorrentías, drenajes de los poblados y de las actividades agropecuarias adyacentes a los drenes, lo que puede representar un riesgo de aumentar la carga de contaminación de dichos drenes, dado que el agua de este origen puede contener altos niveles de microorganismos indicadores como *Escherichia coli* y Coliformes fecales, pero también microorganismos patógenos de alto riesgo como *Salmonella* spp.

### 5.1.2 Recolección de Muestras

El período de muestreo y análisis microbiológico de ART abarcó 6 meses (noviembre de 2018-abril de 2019), en los que se desarrolla la mayor actividad de producción agrícolas, y por lo tanto, la mayor demanda de agua para la irrigación de cultivos, los cuales incluyen a granos y hortalizas. La toma de muestras se llevó a cabo siguiendo una periodicidad mensual a lo largo de 10 puntos de muestreo estrategicamente seleccionados y referenciados geográficamente a lo largo de los dos drenes, su convergencia y hasta su desembocadura en la región costera de Navolato, dando un total de 60 muestras analizadas (Cuadro 1). En cada uno de los 10 puntos de muestreo se recolectó 1 litro de agua, y con el uso de un medidor multiparamétrico (Tracer pocketesterse Mod-1756,

LaMotte Company, Maryland, USA), se midieron parámetros fisicoquímicos, tales como: pH, Conductividad, Salinidad y Solidos Suspendidos Totales. Una vez medidos los parámetros fisicoquímicos, las muestras de ART se colocaron en hieleras a 4 °C y se trasladaron al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), coordinación regional Culiacán, para ser procesadas dentro de las primeras 24 h después de su recolección.

**Cuadro 1**. Localización geográfica de los puntos para la toma de muestras.

| Punto de muestreo | Localidad | Coordenadas | | Numero de muestras |
|---|---|---|---|---|
| **A** | **Culiacancito** | N 24°, 21', 13" | W 107°, 31', 23.9" | 6 |
| **B** | **La Palma** | N 24°, 50', 56.6" | W 107°, 39', 18.4" | 6 |
| **C** | **Lagunilla** | N 24°, 49', 24.5" | W 107°, 40', 9.86" | 6 |
| **D** | **El paraíso** | N 24°,49', 46.9" | W 107, 41', 50.8" | 6 |
| **E** | **El Tamarindo** | N 24°, 52'37.9" | W 107°, 37', 53.4" | 6 |
| **F** | **San Blas** | N 24°,51', 52.1" | W 107°, 39',16.9" | 6 |
| **G** | **Canal** | N 24°,51',35.5" | W 107°, 40',6.4" | 6 |
| **H** | **Caballitos** | N 24°, 50',3.07" | W 107°,41', 37.8" | 6 |
| **I** | **Convergencia** | N 24°,50', 11.5" | W 107°, 42', 13.3" | 6 |
| **J** | **Manglar** | N 24°, 51', 57.5" | W 107°, 52.2', 18.8" | 6 |

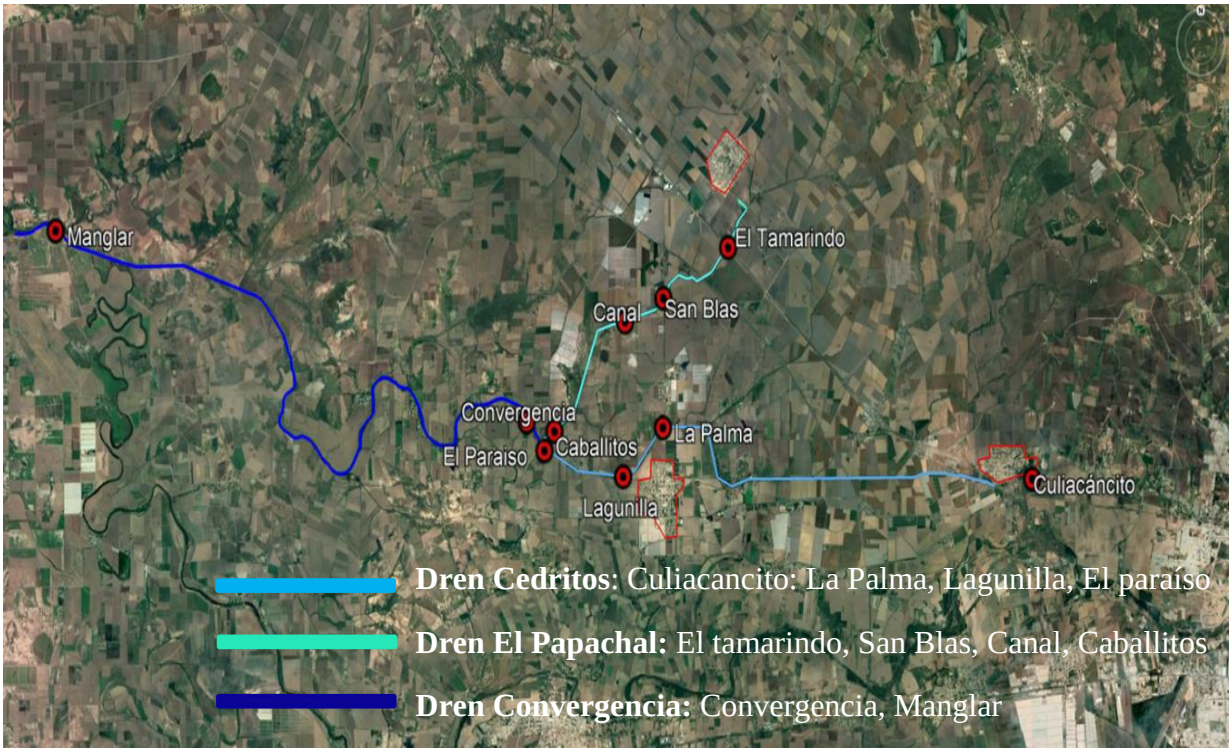


**Figura 2**. Mapa representativo de los puntos de toma de muestra en los drenes en estudio.

### 5.1.3 Cuantificación de Microorganismos Indicadores Coliformes Fecales y *E. coli*

Para la determinación de la calidad del agua y con el fin de detectar los niveles de contaminación del agua proveniente de los drenes Cedritos y El Papachal se realizó la cuantificación de Coliformes fecales y *E. coli*. Se utilizó el método establecido según la NMX-AA-102-SCFI-2006 establecida en el LANIIA bajo un sistema de gestión de la calidad. Brevemente, las muestras fueron sometidas a diluciones seriadas (1:10) empleando una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.2), esto debido a que el agua estaba muy concentrada en materia orgánica, por lo cual se tomó 1 mL de agua y se vertió en 9 mililitros de PBS en series de (.1, -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8). De las series anteriormente realizadas, se tomó para la filtración 1 mL de cada dilución (-2, -3 y -4) de agua para el caso del Dren Cedriros, que era el más cargado de material sólido, mientras que para el dren de El Papachal, las diluciones evaluadas fueron (1 mL directo, -1 y -2) y se filtraron a través de membranas de Nitrocelulosa esteriles (GN-6 Metricel, Pall corp., NY, EUA) de 47 mm de diámetro

y tamaño de poros de 0.45 µm, en la cual los microorganismos quedaron retenidos. Posteriormente cada membrana se colocó en una caja Petri conteniendo medio cromogénico ECC (CHROMagar$^{TM}$ ECC, Paris, Francia) y se incubaron por 24 h a 44 °C, para la posterior cuantificación simultánea de *E. coli* y Coliformes fecales.
Finalmente, se llevó a cabo la cuenta directa de las colonias con características desarrolladas sobre la membrana de color morado para Coliformes fecales y azúl para *Escherichia coli*.

5.1.3.1 Prueba de confirmación para Coliformes fecales. A partir de las cajas de Petri previamente contabilizadas, se transfirieron de 2 a 3 colonias presuntivas (moradas) a cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva a un tubo de 16 x 150 mm, con Caldo Lactosa-Peptona (PLB Medio, Difco, Madrid, España) conteniendo la una campana de Durham cada tubo. Se agitaron los tubos para su homogeneización y se incubaron a 44.5 ± 0.1 °C en incubadora de 24 a 48 h. Se confirmaron como positivas aquellas muestras donde se observó crecimiento y producción de gas después del período de incubación y se registraron los datos de los valores obtenidos en la bitácora de trabajo.

5.1.3.2 Prueba de confirmación para *Escherichia coli*. De las colonias azules observadas en el medio ECC, se tomó una colonia representativa de cada caja y se inoculó en un tubo con medio (EC, Difco, Madrid, España) para la producción de gas y se incubaron a 37 °C por 24 ± 2 h. Sucesivamente, se tomó una colonia y se resuspendió en caldo de triptona para observar la producción de indol, y enseguida se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas. Finalmente, pasadas las 24 h de incubación, se agregó entre 0.2 y 0.3 mL del reactivo de Kovacs, donde la presencia de una coloración roja en la superficie superior del tubo indicó una prueba positiva.

### 5.1.4 Identificación y Cuantificación de *Salmonella*

El estudio se realizó siguiendo el protocolo No. 1200 propuesto por la Agencia de Protección al

Medio Ambiente de los Estados Unidos, (USEPA, siglas en inglés) y que utiliza medio semisólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV-Medio, Difco Madrid, España) para la enumeración de *Salmonella* según la técnica del número más probable (NMP). Se prepararon una serie de tubos con medio TSB, por cada muestra a analizar y se realizaron tres series de tubos por triplicado, los cuales contenían 10 y 5 mL de Caldo Soya y Tripticaseina (TSB 3x), así como 10 mL de (TSB 1x), en los cuales se colocó un volumen de 20, 10 y 1 mL de muestra, respectivamente; los tubos se incubaron a 36 °C ± 1.5 °C durante 24 horas. Posteriormente, de los tubos que presentaron desarrollo bacteriano, se tomaron alícuotas, las cuales se inocularon mediante seis gotas de 30 µL en cajas Petri conteniendo medio Agar semisólido Rappaport-Vasiliadis (MSRV, siglas en inglés) y se incubaron a 42 °C por 24 h. El medio MSRV contiene novobiocina y verde malaquita para inhibir especies que no pertenecen al género *Salmonella.* Se examinaron las placas para ver la motilidad que rodea las inoculaciones, evidenciada por un "halo blanquecino" de crecimiento a aproximadamente 2 cm de diámetro. Las colonias presuntamente identificadas se aislaron y sembraron por estriado en el medio Agar-Xilosa-Lisina Desoxicolato (XLD-Medio, Bioxon, México)) e incubaron durante 24 horas a 37 °C, de las cuales al presentarse colonias negras características de *Salmonella* spp, por la producción de Ácido Sulfhídrico, se tomó una colonia y se estrió en Agar-Tripticaseína (TSA-Medio Bioxon, México)) y se incubaron a 37 °C por 24 horas para su posterior análisis de confirmación.

5.1.4.1 Pruebas bioquímicas. Las colonias que mostraron características de la bacteria *Salmonella* en el agar TSA con periodo de incubación durante 24 horas a 37 °C. Una vez crecidas las colonias se realizó la identificación bioquímica utilizando un conjunto de pruebas que incluyeron Agar-Hierro-Lisina, (LIA-Medio Difco, Madrid, España), Agar hierro triple-azúcar y (TSI-Medio, Difco, Madrid, España) y Caldo de Urea (Urea Broth, Difco Madrid, España). En los medios LIA y TSI se inocularon mediante el método de punción con aguja bacteriológica, en el medio caldo de Urea se resuspendió una colonia presuntiva y se mezcló en el caldo utilizando un asa bacteriológica. El juego de pruebas bioquímicas se incubó a 37 °C por 24h.

5.1.4.2 Confirmación por PCR. La confirmación del género *Salmonella* se realizó por medio de la reacción de la cadena de polimerasa en punto final (PCR, siglas en ingles). Los oligonucleótidos

utilizados fueron para el gen pfk sentido 5´-ACACCTCCTCTTCTCACCAGCGTATC-3´ y antisentido 5´-CGGCTTTGATTTCCGCCACCAGA-3´ (Sigma-Aldrich, E.U.A) con una amplificación esperada de entre 170-180 pares de bases.

*Extracción de DNA.* Se tomó una colonia pura del cepario del LANIIA que previamente se determinó presuntivamente como del género *Salmonella* y se inoculó en 100 µL de agua nanopura estéril (PISA, México) en tubos estériles de 0.6 mL. La mezcla de la colonia con el agua inyectable se homogenizó por medio de vortex y pasado un tiempo de reposo se introdujeron en un termociclador para su posterior lisis a 94 °C por 15 minutos, utilizando el programa EXTRAC-J.

*Condiciones para PCR*. La mezcla de reacción de PCR se realizó con un kit para PCR, (termhofisher, Waltham, Massachusetts, USA) para obtener un volumen final de 10 µL. Los reactivos, la concentración y el volumen de los componentes se muestran en el Cuadro 3. Una vez realizada la mezcla, la amplificación del ADN bacteriano se realizó en un termociclador en gradiente (Eppendorf, USA), donde se programaron las distintas etapas del proceso, incluyendo un ciclo por 5 min a 95 °C, para la desnaturalización del ADN. Posteriormente, se realizaron 30 ciclos de 50 s a 95 °C, para la desnaturalización del ADN; 50 s a 60 °C, para el alineamiento de los oligonucleótidos y 1 min a 72 °C para la elongación. Finalmente, un ciclo de 5 min a 72 °C para la extensión final y la reacción se estabilizó a 4 °C. Los productos obtenidos fueron inmediatamente analizados a través de electroforesis en geles de agarosa o almacenados a -20 °C hasta su análisis.

**Cuadro 2**. Componentes de la mezcla maestra para PCR

| **Reactivos** | **Concentración inicial** | **Volumen** | **Concentración final** |
|---|---|---|---|
| Master Mix | | 5.0 µL | |
| DNA Polimerasa | 0.05 $U\mu L^{-1}$ | | 0.5 U |
| Tampón | 10.00 X | | 1.0 X |
| $MgCl_2$ | 4.00 mM | | 1.5 mM |
| DNTPs | 0.40 Mm c/u | | 400 µM |
| Oligonucleotido 1 | | 0.5 µL | 200 µM |
| Oligonucleotido 2 | | 0.5 µL | 200 µM |

| | |
|---|---|
| Agua nanopura | 2.0 µL |
| Lisado bacteriano | 2.0 µL |

µM; Micromolar, mM; Milimolar, $U\mu L^{-1}$; Unidades $microlitro^{-1}$, µL; Microlitro

*Electroforesis en gel de agarosa.* Los productos obtenidos de la amplificación por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para ello se procedió a pesar 2 g de agarosa y se agregó a 100 mL de buffer TAE 1X. Posteriormente, se disolvió en una placa de calentamiento, después se agregó 5 µL de gel-red a una concentración de 10 mg $mL^{-1}$. Se depositaron sobre el molde para la cámara de electroforesis (Thermo EC, 230, USA) con su respectivo peine para formar los pocillos, donde se depositaron 4 µL en la mezcla de reacción de cada producto de PCR, adicionada con 1 µL de colorante Orange-Blue (Promega, USA). Se colocó el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Promega, USA) como patrón de referencia para visualizar las bandas generadas, seguido del control positivo que contenía material genético de *Salmonella*, seguido de un control blanco con agua nanopura y el control negativo con ADN de una cepa de *Bacillus* y *Clavibacter*.

La separación del ADN en los geles de agarosa se llevó a cabo empleando una fuente de poder (Thermo EC 150) a un voltaje de 70 V durante 2 h y 20 min. Una vez efectuada la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. La prueba se consideró positiva, cuando se observó una banda de 178 pb, la cual se comparó con el marcador de 100 pb.

### 5.1.5 Serotipificación de las Cepas de *Salmonella* spp.

Las muestras que resultaron positivas por PCR fueron sometidas a serotipificación, donde se volvieron a crecer cada una de las cepas en tubos de 1.5 mL con agar nutritivo, se almacenaron a 4 °C y se transportaron en hieleras para su posterior procesamiento. Para la técnica de serotipificación, se realizó una estancia en el laboratorio de serología, edificio de investigación de la Facultad de Medicina, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) durante un mes.

Esta sección se dividió en etapas y cada una de ellas se describió en pasos realizados y enumerados según la secuencia de la técnica.

1. Se prepararon 800 mL de TSA con caldo casoy y agar-agar. Posteriormente, se vertieron 4 mL del medio a 45 tubos con rosca de 13X100 mm y otros 45 tubos sin rosca de la misma medida, se esterilizaron y se dejaron reposar inclinados durante 18 h a temperatura ambiente, para refrigerarse hasta su posterior uso.
2. Se preparó 1 L de caldo "infusión cerebro corazón" (BHI-Broth Bioxon, México)) y se esterilizó para alicuotar en volúmenes de 10 mL a cada uno de los tubos 16X50 mm con tapa de algodón.

5.1.5.1 Reacciones con antisueros polivalentes para antígenos flagelares de *Salmonella.*

1. Se crecieron todas las cepas en agar MacConkey (Bioxon, México) a 37 °C por 24 horas, transfiriendo una asada de las que crecieron en agar nutritivo, en tubos de 1.5 mL y se estriaron en las placas de agar MacConkey.
2. De las mismas colonias aisladas, se estriaron en tubos de TSA (13X100 mm), con rosca para el antígeno flagelar y sin rosca para el antígeno somático, y a la par con una misma asada se inoculó el tubo con agar semi-sólido introduciéndo el asa en medio del tubo hueco hasta la mitad y se levantó el pozo al tubo.
3. Se incubaron todos los tubos por 24 h a 37 °C y los semi-sólidos se incubaron de 20-40 h. (Para observar la migración de la bacteria).

5.1.5.2 Preparación para los antígenos somáticos de *Salmonella*:

1. Previamente rotulados los tubos 13mmX100mm con TSA (sin rosca), se extrajeron del cuarto frio y se dejaron a temperatura ambiente.
2. Se les agregó 3 mL de solución salina y se cubrió con plástico parafilm, se agito para su homogenización y combinación entre la bacteria y la solución salina.
3. En tubos estériles (rotulados) se vertió el contenido con la bacteria y solución salina y así mismo se dispone a precipitar.
4. Los tubos con la bacteria en solución salina se esterilizaron a 100 °C por 1 hora (Esto para

que las células se lisaran y solo quedara el antígeno que es un lipopolisacárido resistente a temperaturas altas).

5. Se dejaron los tubos a temperatura ambiente y se vertieron 30 µL de formaldehído, y se introdujeron al cuarto frio a 4 °C para su posterior uso.
6. Los tubos con BHI y la bacteria crecida se les agregó formalina para preservar el Antígeno flagelar, se colocó tapa con parafilm y se agitaron para homogenizar bien la bacteria.

5.1.5.3 Reacciones con sueros para antígenos específicos Spicer Edwards:

1. Se prepararon los sueros Spicer-Edwars (A, B, C, D, L, EN, I y Poly H), donde se agregó 200 µL de suero a 4 mL de solución salina y glicerina en relación 1:20.
2. Se tomaron placas de 96 pozos para serología y se inocularon de forma vertical (izquierda-derecha) los primeros ocho sueros (1, 2, 3, 4, L, EN, I y Poly H), a las 12 placas con 96 pocillos y de los tubos con el antígeno flagelar de arriba hacia abajo se introdujeron 4 controles positivos (*S*. Thyphimurium, *S*. Muenster, *S*. Newport y *S*. Derby).
3. Se realizó el mismo paso con los sueros polivalentes para Ag somático, se envolvieron las placas en papel de hule y se incubaron a 50 °C por 2 horas.
4. Al finalizar las 2 horas se visualizaron en una lámpara y se interpretaron para observar si hubo aglutinación para interpretar resultados en las tablas correspondientes.

5.1.5.4 Inoculación de los sueros Spicer-Edwardas para antígenos específicos de *Salmonella* y antisueros polivalentes “O”:

1. Para los tubos que contenían BHI con la bacteria crecida y formalina se extrajeron 85 µL y se inocularon en las placas que contenían 15 µL del antisuero (A, B, C, D, E, F y G) previamente puesta en la placa.
2. En la línea de letras verticales se introdujeron los antisueros y de forma horizontal al borde de los números se colocaron las mismas cepas.
3. En el caso de los sueros que reaccionaron con el Antígeno somático, de igual manera se inocularon con 25 µL del antisuero polivalente “O” somático y 25 µL del antígeno que está en los tubos de TSA con la bacteria crecida y la formalina.

## 5.2 Formulación del Problema

La formulación comprendió aspectos del contexto general, tales como: la región de estudio, las rutas de exposición, los patógenos de referencia, la identificación del peligro, los eventos peligrosos e impactos en la salud.

### 5.2.1 Identificación del Peligro (*Salmonella* spp.)

En la identificación del peligro, se toma como objeto de estudio el agua residual tratada de los drenes "Cedritos" y "El Papachal", provenientes de las PTAR de Culiacancito y Villa Adolfo López Mateos respectivamente, así como la convergencia de ambos hasta su desembocadura en la región costera de Navolato, Sinaloa, esto por ser considerada el agua residual tratada un vehículo de transporte y transmisor de patógenos hacia los alimentos (hortalizas). En este estudio se tomó al tomate como un modelo de estudio y susceptible a la irrigación con esta agua residual tratada (ART) que potencialmente tendría una carga de *Salmonella.* Este microorganismo se considera un patógeno de alto riesgo para la salud de los consumidores de productos frescos, debido a que es el principal causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) a nivel mundial, ocasionando aproximadamente 180 millones de casos anualmente; de los cuales, el 52% corresponden a infecciones por *Salmonella* no tifoidea y 37% a casos son tifoideos. Además, alrededor de 298 mil muertes (41%) asociadas a enfermedades diarreicas se atribuyen a *Salmonella* (Besser, 2017).

5.2.1.1 Generalidades. El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas y con una dosis de infección que va desde 10 a 100,000 células; son móviles debido a que tienen flagelos perítricos, a excepción de los serotipos Pullorum y Gallinarum, las cuales son inmóviles (Murray et al., 2015). *Salmonella* ocupa el primer lugar a nivel mundial como responsable de enfermedades transmitidas

por alimentos (ETA), ocasionando aproximadamente 180 millones de casos anualmente, de los cuales, el 52% corresponden a infecciones por *Salmonella* no tifoidea y 37% a casos son tifoideos. Además, alrededor de 298 mil muertes (41%) asociadas a enfermedades diarreicas se atribuyen a *Salmonella* (Besser, 2017). La *Salmonella* no tifoidea (NTS, siglas en inglés) infecta a una gran variedad de huéspedes animales y generalmente tiene un comportamiento zoonótico (Feasey et al., 2012). Existen más de 2,500 serotipos de NTS, de los cuales, Typhimurium y Enteritidis representan aproximadamente el 50% de todos los aislados en infecciones humanas a nivel mundial (Tennant et al., 2016). *Salmonella* no tifoidea (SNT) ha sido reconocida como una de las principales causas de infecciones bacterianas invasivas en niños pequeños y personas con Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en África subsahariana, así como en ancianos y personas inmunocomprometidas en todo el mundo (Majowicz et al., 2010; Reddy et al., 2010). Por otra parte, *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi A y B causan la fiebre entérica, que es una enfermedad sistémica febril y que se presenta específicamente en humanos (Tanner y Kingsley, 2018).

5.2.1.2 Clasificación. La clasificación más reciente del género *Salmonella* fue determinada con base en la técnica de hibridación del ADN de sus aislados, y se ha concluido que este género está conformado por más de 2,500 serotipos, clasificados en dos especies: *Salmonella* enterica y *Salmonella* bongori (Grimont y Weill, 2007), *Salmonella* spp. también se puede clasificar desde el punto de vista epidemiológico en tres grupos: 1) ninguna afinidad por hospedero, 2) que afecten únicamente al ser humano y 3) adaptadas a un hospedero animal únicamente (Stanchi, 2007; Terragno et al., 2003).

**Cuadro 3**. Clasificación taxonómica de *Salmonella* spp. y origen de aislamiento

| ***Salmonella* especies y subespecies** | **Grupo** | **Numero de serotipos** | **Origen del Aislamiento** |
|---|---|---|---|
| *S. enterica* subespecie *enterica* | I | 1531 | Humanos y Animales de sangre caliente |
| *S. enterica* subespecie *salamae* | II | 505 | Animales de sangre fría y del ambiente |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *S. enterica* subespecie *arizonae* | III a | 99 | Animales de sangre fría y del ambiente |
| *S. enterica* subespecie *diarizonae* | III b | 336 | Animales de sangre fría y del ambiente |
| *S. enterica* subespecie *houtenae* | IV | 73 | Animales de sangre fría y del ambiente |
| *S. enterica* subespecie *indica* | VI | 13 | Animales de sangre fría y del ambiente |
| *S. bongori* | V | 22 | Animales de sangre fría y del ambiente |
| **Total** | | **2579** | |

Adaptado de Grimont y Weill, (2007); y Stanchi, (2007).

5.2.1.3 Estructura Antigénica. La estructura antigénica de *Salmonella* es similar a la de otras enterobacterias, presenta una pared celular constituida principalmente por una delgada capa de peptidoglicano y recubierta por una membrana externa de lípidos y proteínas insertadas en esta capa por medio del lípido A. Esta última es una molécula compleja de lipopolisacárido, cuyo lado externo está formado por sub-unidades repetidas de oligosacáridos que son los que portan los antígenos O (somáticos), y que son los componentes principales de la membrana externa de la pared celular de bacterias Gram negativas. Además las cepas de *Salmonella* poseen antígenos H que se encuentran en los flagelos, mismos que les permiten movilidad (Jawetz et al., 2005). En algunas cepas se encuentra un tercer tipo de antígenos de superficie denominado "K" (capsulares), el cual, al estar relacionado con la virulencia de las cepas se le denomina Vi, que puede interferir con la aglutinación por antisueros O y que se relacionan con invasividad (Jawetz et al., 2005).

5.2.1.4 Ciclo de vida y diseminación en el ambiente**.** *Salmonella* es uno de los patógenos para los humanos más ubicuos en la naturaleza. Se encuentra como comensal y patógeno del tracto intestinal de animales de sangre caliente, incluyendo el humano, incluso causando un amplio espectro de casos asintomáticos en animales de granja que pueden ser perjudiciales al humano causando salmonelosis, (Perron et al., 2008). La naturaleza ubicua de *Salmonella* puede facilitar un estilo de vida cíclico pasando del hospedero al ambiente y regresar a un nuevo hospedero (Figura

3) (Winfield y Groissman, 2003). *Salmonella* es introducida en el medio ambiente a través de las heces de humanos y animales, y su dispersión hacia los bienes de uso humano y al realizar prácticas inadecuadas en granjas para la depuración de las heces, o por la práctica del fecalismo al aire libre. Se ha reportado que *Salmonella* se encuentra en concentraciones de 2 $Log_{10}$ UFC/g de heces en personas infectadas (Fegan et al. 2005). En un estudio realizado por Morisse y Cotte. (1994) en animales bovinos, se cuantificó a *Salmonella* en una concentración de hasta $1x10^8$ UFC/g. Dentro de los serotipos frecuentemente aislados de infecciones en humanos están Typhimuriun y Enteritidis, los cuales no siempre son aislados de ambientes acuáticos. Este hecho puede explicarse de dos formas: la primera es que estos serotipos no resisten las condiciones ambientales, precisamente por habitar comúnmente el tracto digestivo de humanos y animales de sangre caliente; o bien, porque no siguen la misma ruta de trasmisión (OMS, 2010). Dentro de los serotipos de *Salmonella* aislados en el ambiente y más frecuentemente reportados en casos de infección en México se encuentran Oranienburg, Saintpaul y Give (Contreras-Soto et al., 2019).

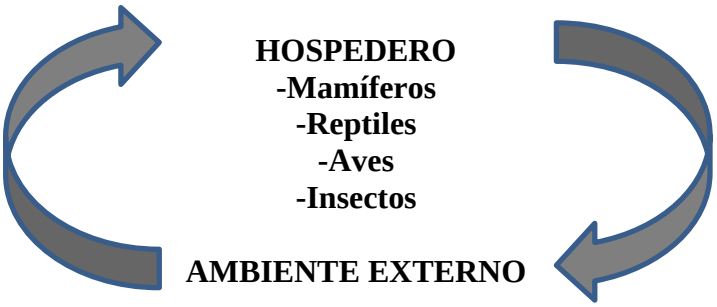


**Figura 3.** Ciclo de vida de *Salmonella* (Winfield y Groisman, 2003).

Los seres humanos adquieren la infección por *Salmonella* posteriormente a la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria; sin embargo, la infección también puede trasmitirse de persona a persona, o por vía fecal-oral directa. Aun así, los animales de granja (aves de corral, ganado vacuno y porcino), al ser el principal reservorio de esta bacteria, son vectores muy importantes para la trasmisión (Foley et al., 2008). Finalmente, las prácticas higiénicas deficientes

durante la producción de alimentos y su manejo a gran escala, aunado a los cambios en hábitos de consumo, han facilitado una diseminación mayor de *Salmonella* en frutas y hortalizas frescas y en productos cárnicos (Bell y Kyriakides, 2002). Los factores que favorecen esta contaminación son la alta concentración de nutrientes en ecosistemas tropicales, el aire caliente y la temperatura constante del suelo y del agua; estas condiciones proveen un hábitat ideal para la supervivencia, crecimiento y proliferación de *Salmonella* ya que se parecen al ambiente del hospedero (Lynch et al. 2009).

## 5.3 Evaluación de la Exposición

Esta etapa consistió en describir la ruta de exposición al peligro, en este caso a *Salmonella*, y donde se determinaron las concentraciones de este patógeno en cada uno de los pasos de la ruta de exposición; iniciando con la concentración de *Salmonella* en la fuente de contaminación (ART utilizada para riego) y terminando con la concentración de *Salmonella* en el fruto de interés, considerando al tomate como modelo de estudio (Figura 4).

### 5.3.1 Ruta de Exposición

Se consideró un escenario hipotético, planteando la ruta de exposición de acuerdo al origen de la fuente de contaminación, que es el agua proveniente de las plantas de tratamiento de agua residual en Culiacán (PTAR-Norte) y la planta de tratamiento del poblado de Villa Adolfo López Mateos. Se cuantificaron microorganismos indicadores como Coliformes fecales y *E. coli*, así como también patógenos de alto riesgo reconocido como *Salmonella*, suponiendo que en época de estiaje, esta agua pudiera utilizarse para riego agrícola, utilizando el método de riego por goteo. Posteriormente la concentración de *Salmonella* vertida en el suelo y la supervivencia de esta misma en el primer día de irrigación (considerando un riego diario). Finalmente se estima la adherencia de *Salmonella* al fruto (tomate) y su reducción al pasar por un proceso de desinfección con

hipoclorito de sodio, para culminar con la concentración diaria ingerida de *Salmonella* por tomate ingerido.

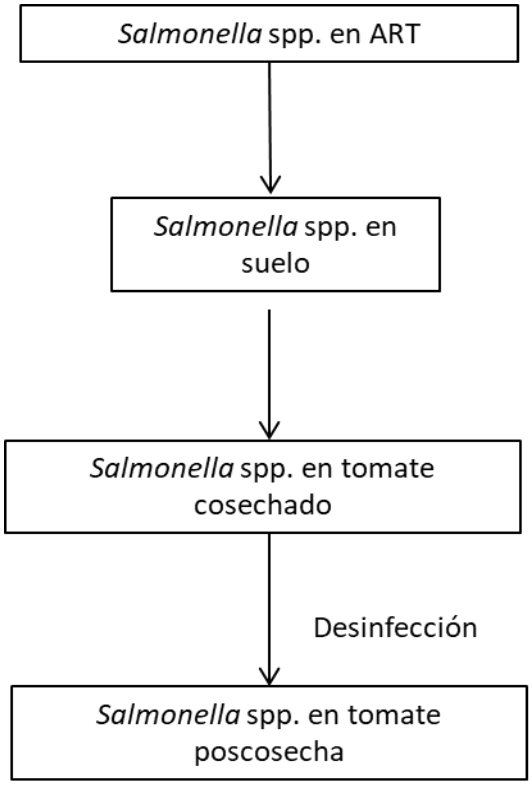


**Figura 4**. Ruta de *Salmonella* en el escenario de exposición al riesgo.

### 5.3.2 Concentración de *Salmonella* en Agua Residual (*Cw*)

La concentración de *Salmonella* presente en el ART está representada por Cw y esta fue cuantificada en NMP/L en todas las muestras por el método 1200 de la EPA. Para fines de nuestro estudio, los valores de concentración de *Salmonella* se promediaron para cada dren y se representaron por periodos, los cuales resultaron de la siguiente manera: (1) Enero, (2) Febrero, (3) Marzo y (4) Abril.

### 5.3.3 Cantidad diaria de *Salmonella* liberada al suelo mediante riego por goteo (*Nr*)

La cantidad diaria de *Salmonella* liberada al suelo, $N_r$ (en NMP/planta/día), fue estimada usando la ecuación (1):

$$N_r = C_w.V \qquad (1)$$

donde *V* es el volumen de agua requerido por planta (L/día) y $C_w$ es la concentración de *Salmonella* (NMP/L) en ART, (Villafáfila y Wyss, 2009).

### 5.3.4 Cantidad Acumulada de *Salmonella* Sobreviviente en el Suelo ($N_s$)

Esta cantidad es representada mediante $N_s$ y medida en NMP/planta. Este parámetro tiene en cuenta tanto el efecto acumulativo de las liberaciones diarias de *Salmonella* en el suelo, como la extinción después de su incorporación al suelo. En este trabajo se asumió un modelo de muerte exponencial propuesto por Crane y Moore, (1986) y expresado por la ecuación:

$p_t = e^{-kt}$, donde $p_t$ es la proporción de *Salmonella* que ha sobrevivido t días después de la liberación en el suelo y k es la tasa de mortalidad de *Salmonella*.

El valor de k se tomó del trabajo de Nicholson et al., (2005), sobre la supervivencia de *Salmonella* en los lodos residuales de ganado vacuno aplicada a un suelo de pastizales franco arcilloso. Estos autores ajustaron los datos de supervivencia (concentraciones de *Salmonella* $Log_{10}$ UFC/mL) con los números de días respectivos después de la aplicación del estiércol, mediante un modelo de regresión lineal. La tasa de mortalidad k se calculó como $k = -\beta \ln 10$, donde β es la pendiente estimada de la ecuación de regresión.

La cantidad acumulada en el suelo, $N_s$, de células de *Salmonella* sobrevivientes liberadas, a partir

de $t$ = 0, viene dada por la ecuación (2), obtenida a continuación como una serie geométrica convergente:

$$N_s = N_r \sum_{t=0}^{\infty} p_t = N_r \sum_{t=0}^{\infty} e^{-kt}$$
$$= N_r \sum_{t=0}^{\infty} \left(e^{-k}\right)^t \qquad (2)$$
$$N_s = N_r \left(\frac{1}{1-e^{-k}}\right)$$

En el desarrollo anterior, $N_r$ se considera constante a lo largo del tiempo. Este es el caso más simple, asume que las plantas son irrigadas a diario y que la cantidad de *Salmonella* en cualquier tiempo es igual a la concentración del tiempo 0, por lo tanto, el valor de *Ns* tampoco cambia. Esto equivale a asumir que durante el regado diario con ART, la *Salmonella* que muere en el tiempo previo es repuesta y su concentración no decrece.

### 5.3.5 Concentración Final de *Salmonella* en el Suelo ($CF_{ss}$)

Este parámetro se expresa en NMP/g y representa la cantidad de *Salmonella* sobreviviente en el suelo que rodea cada planta. Se consideró un escenario simplificado, donde el agua liberada se extiende uniformemente en un volumen de suelo en forma cilíndrica; con radio (r), profundidad máxima (dpt) y densidad de suelo (dens) (Andreoli et al., 2001). Teniendo en cuenta estos factores, $C_s$ se calcula mediante la siguiente ecuación (3):

$$CF_{ss} = \frac{N_s}{\pi r^2 dpt.dens} \qquad (3)$$

### 5.3.6 Concentración de *Salmonella* en Tomate ($C_{tad}$)

La concentración de *Salmonella* en tomate está representada por $C_{tad}$ y medida en NMP/tomate. Esta concentración se refiere a la cantidad de bacterias transportadas por el suelo que se adhieren a la superficie del tomate, y se calcula mediante la ecuación (4)

$$C_{tad} = \frac{CF_{ss} . SA}{W} \qquad (4)$$

Donde $SA$ es la cantidad (g) de suelo unido a la superficie del tomate debido a diferentes rutas (como viento, moscas, manos de los trabajadores y salpicaduras de agua promovidas por la lluvia o el riego) y $W$ es el peso del tomate (g), (Krzyzanowski Jr et al., 2016).

Hasta esta parte se plantea un escenario, considerándolo como el peor de los casos, en que un tomate pudiera llegar a ser ingerido sin haber pasado por el proceso de desinfección a nivel empaque, aunque se sabe que todo el tomate cosechado es llevado hacía los empaques para sus posteriores tratamientos, esto antes de ser exportados o comercializados local o nacionalmente.

### 5.3.7 Concentración de *Salmonella* Después de Desinfección ($C_{tdd}$)

Para la Evaluación de la exposición, el resultado de la concentración de *Salmonella* después de someterse la superficie del tomate a un proceso de desinfección, el cual fue estimado de acuerdo con lo reportado por Chaidez et al., (2007), quienes evaluaron experimentalmente la reducción de *Salmonella* utilizando como desinfectante el cloro a 200 ppm, el cual pudo reducir hasta 2 $Log_{10}$ UFC (96 %). Obtuvimos un valor de 0.324 que representa un factor derivado de la reducción de *Salmonella*.

## 5.4 Evaluación de Efectos en la Salud

En esta etapa se determinaron los valores de la dosis infectiva diaria ingerida que fue representada como *d*, además de datos obtenidos de la literatura para la sustitución en la ecuación de Beta-poisson en la determinación de probabilidad de infección en una sola exposición $P_i$ *(d*) y probabilidad de infección por año $P_A(d)$.

### 5.4.1 *Salmonella* spp. Patogenicidad y Virulencia.

Las infecciones por *Salmonella* ocurren principalmente a través de la ingestión de alimentos y/o agua contaminados; una vez ingeridos, las bacterias deben sobrevivir al ambiente gástrico hostil con pH por debajo de 2 y evitar la lisis por sales biliares en el intestino delgado superior. Posteriormente, estas bacterias se adhieren e invaden el íleon distal y el colon proximal causando así una enfermedad sintomática (Jawetz, 2005). Las respuestas iniciales del huésped implican la infiltración de neutrófilos, seguida de la llegada de los linfocitos y macrófagos (Figura 5). Las infecciones por *Salmonella* pueden propagarse más allá de la mucosa gastrointestinal hasta drenar los ganglios linfáticos mesentéricos. La adenitis generada puede simular apendicitis aguda. La diseminación puede continuar al hígado, bazo, y sistemáticamente, vía el torrente sanguíneo (Crum-Cianflone, 2008).

*Salmonella* es productora de una enterotoxina termolábil, que produce pérdida de fluidos intestinales causando diarrea. Esta enterotoxina está estrechamente relacionada funcional, inmunológica y genéticamente con la toxina de *Vibrio cholerae* y la toxina termolábil de *Escherichia coli* patógena. La mayoría de las cepas de *Salmonella* también producen citotoxinas termolábiles que pueden causar daño en la superficie de la mucosa intestinal, generando síntomas entéricos e inflamación. La infección con *Salmonella* no tifoidea se limita generalmente a un evento intestinal localizado; sin embargo, la presencia de plásmidos de virulencia ha sido asociada con *Salmonella* no tifoidea, sobreviviendo en fagocitos y extendiéndose desde el intestino delgado hasta el bazo y el hígado (FSANZ, 2013).

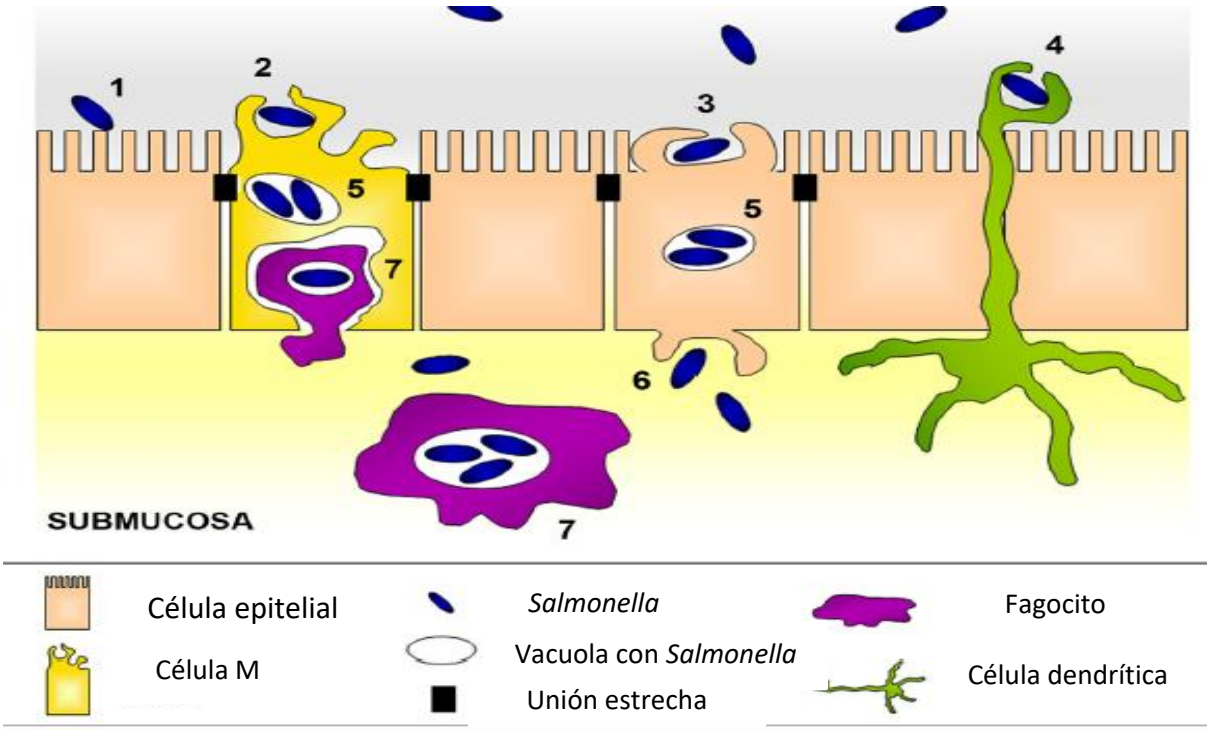


**Figura 5.** Invasión de *Salmonella* al epitelio intestinal y respuesta inmunológica del hospedero (Fábrega y Vila, 2013).

Los seres humanos adquieren la infección por *Salmonella* posteriormente a la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria; sin embargo, la infección también puede trasmitirse de persona a persona, o por vía fecal-oral directa. Aun así, los animales de granja (aves de corral, ganado vacuno y porcino), al ser el principal reservorio de esta bacteria, son vectores muy importantes para la trasmisión (Foley et al., 2008). Finalmente, las prácticas higiénicas deficientes durante la producción de alimentos y su manejo a gran escala, aunado a los cambios en hábitos de consumo, han facilitado una diseminación mayor de *Salmonella* en frutas y hortalizas frescas y en productos cárnicos (Bell y Kyriakides, 2002). Los factores que favorecen esta contaminación son la alta concentración de nutrientes en ecosistemas tropicales, el aire caliente y la temperatura constante del suelo y del agua; estas condiciones proveen un hábitat ideal para la supervivencia, crecimiento y proliferación de *Salmonella* ya que se parecen al ambiente del hospedero (Lynch et al. 2009).

### 5.4.2 Dosis Diaria de *Salmonella* Ingerida *(d)*

Representado por "*d*" y medido en (NMP/día), se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$d = C_{ds}.I \qquad (5)$$

Donde *I* es la tasa de ingestión de tomate (g/día). Aquí, se considera a *I* = 55 g, con base en lo propuesto por Krzyzanowski Jr et al. (2016).

### 5.4.3 Evaluación Dosis-Respuesta

El QMRA puede usarse para estimar los riesgos de enfermedad e infección para cualquier patógeno siempre que haya datos de dosis-respuesta disponible para ello; los riesgos de enfermedad e infección pueden estimarse utilizando ecuaciones de respuesta a la dosis de QMRA (OMS, 2016). Una de las más utilizadas para los QMRA donde se estima la probabilidad de infección con virus y bacterias, es un modelo Beta-Poisson propuesto por (Haas et al. 1999)

$$P_i(d) = 1 - \left[1 + \frac{d}{N_{50}}\left(2^{\frac{1}{\alpha}} - 1\right)\right]^{-\alpha} \qquad (6)$$

Donde $P_i$ (*d*) es el riesgo de infección en un individuo por una sola exposición (es decir ingestión de una dosis única de patógeno "*d*"); N50 es la dosis infecciosa mediana (es decir, la que causa infección en el 50% de la población expuesta); y "α" es la constante de infectividad del patógeno en estudio (Scheierling et al., 2010).

Estos valores de N50 y α, se han obtenido con base en diferentes estudios de dosis-respuesta en diferentes organismos incluyendo al humano, y con diferentes patógenos incluyendo a la *Salmonella* (Blaser y Newman, 1982), por lo que para cada microorganismo existen diferentes valores de dosis miníma infecciosa y dosis media de infección, (Rose et al., 1995).

Al evaluar los datos de dosis infecciosas "ID", (dosis que afecta al 50% de infección en la población expuesta) a menudo se utiliza un mínimo de dosis infecciosa, ya que se supone que cada microorganismo tiene una dosis mínima inherente en el hospedero, debajo del cual no se producirá alguna infección. Sin embargo, si las exposiciones son mayores que este umbral de concentraciones de microorganismos, una respuesta será observado en el hospedero (Rose et al., 1995).

## 5.5 Caracterización del Riesgo

### 5.5.1 Riesgo diario de infección por *Salmonella* $P_i$ *(d)*

Representado por *P*, se calcula a través de un modelo de dosis-respuesta Beta-Poisson, dado por la fórmula:

$$P_i(d) = 1 - \left[1 + \frac{d}{N_{50}}\left(2^{\frac{1}{\alpha}} - 1\right)\right]^{-\alpha} \qquad (6)$$

Los valores de α y N50 fueron extraídos de la primera guía completa para la evaluación cuantitativa de los riesgos para los humanos, y que plantea agentes infecciosos en todos los medios ambientales, donde α = 0.3126 y N50 = 2.36 x $10^4$ son los parámetros para Beta-Poisson correspondientes a *Salmonella* (Haas et al., 1999).

### 5.5.2. Riesgo anual de Infección *PA(d)*

Representado por $P_A$, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$P_A = 1 - \left[1 - P_i(d)\right]^F \qquad (7)$$

Donde *F* es la frecuencia anual de consumo de tomate, aquí se supone *F* = 365 días. Un dato muy importante a considerar en este paso de la Evaluación dosis-respuesta es el de consumo per-cápita de tomate rojo en México, que es de 15 kg por persona al año según datos de FIRA (2017).

# 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo presenta los resultados más relevantes del trabajo y su interpretación. En la sección 6.1, se describen los parámetros fisicoquímicos en el ART de los drenes en estudio. Adicionalmente se presentan las concentraciones de organismos indicadores de contaminación fecal (Coliformes fecales y *Escherichia coli*) en las muestras de ART evaluadas. Las secciones 6.2-6.5 corresponden a la evaluación del riesgo microbiológico.

## 6.1 Determinación de Parámetros Fisicoquímicos e Indicadores Microbiológicos de Contaminación Fecal en ART

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas del agua de los drenes en estudio con el objetivo de determinar qué condiciones son las que favorecen o influyen en la supervivencia de los microorganismos cuantificados y evaluados, así como también en la carga microbiológica de dicha agua (Coliformes fecales y *E. coli*) como indicadores de contaminación.

### 6.1.1 Parámetros Fisicoquímicos de las Muestras de Agua de los Drenes

Se realizó la evaluación de cinco parámetros fisicoquímicos *in situ* en cada uno de los puntos de muestreo, los cuales fueron: temperatura, pH, conductividad, salinidad y solidos suspendidos totales, en el periodo comprendido de enero a Abril (cuatro meses en los diez puntos de muestreo). Registrando un promedio en el valor de pH de 7.43 a 7.75 para el dren Cedritos, mientras que para El Papachal el pH varió desde 7.35 hasta 8.10, la Conductividad varió de 550 a 845 µS/m (Microsiemens sobre metro) en el dren Cedritos y de 460 a 720 S/m en el dren Papachal. Para el caso de la Salinidad el valor más alto se registró en el punto de muestreo de El Manglar con un valor de 4450 psu (Unidades Prácticas de Salinidad) y el valor más bajo fue de 220 psu, en el punto de muestreo de Él Tamarindo. El valor máximo de Sólidos Suspendidos Totales (STS) fue de 5040 mg/L y se registró en el punto de muestreo de El Manglar en el mes de marzo, y el valor menor de

(SST) fue de 310 mg/L en El Tamarindo. Estos valores se encuentran representados en la figura 6. Las muestras presentaron un pH con tendencia alcalina debido a que el agua es tratada con cloro y esto hace que suba la consistencia básica en el agua. Los valores de los parámetros fisicoquímicos en general se mantuvieron relativamente conservados, a excepción del último punto (El Manglar), dado que se encuentra muy cercano a la costa y su agua está mezclada con agua de mar, por esta razón los valores de sólidos suspendidos totales y de salinidad aumentaron considerablemente en dicho punto. Para el agua residual tratada, los valores de pH resultaron con niveles alcalinos debido a que el agua tuvo un tratamiento con una sal básica, Cloruro férrico; ($FeCl_3$) y/o Sulfato de Aluminio; $Al_2(SO_4)_3$, la cual favorece la disminución de acidez en el agua. Los resultados de los sólidos suspendidos totales (STS) se redujeron debido al conjunto de operaciones unitarias que se manejan en el proceso, tales como la floculación, coagulación, aireación, decantación y precipitación (Bukhari, 2008). En cuanto a los valores de conductividad, también disminuyen de un agua cruda a un agua tratada por las cargas de partículas (Chen, 2004). Se sabe que *Salmonella* puede crecer en condiciones de pH entre 4.5 a 9 con una condición óptima de 6.5 a 7.5, por lo que se vuelve tolerante al pH encontrado en el agua de estudio (Winfield y Groissman, 2003). Además de que el agua residual contiene una alta carga de materia orgánica, lo que la hace rica en fuentes de carbono que pueden ser aprovechados para el metabolismo de los microorganismos presentes como los Coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella*.

**Cuadro 4.** Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de ART

| Punto de muestreo | pH | Conductividad µS/m$^3$ | Salinidad psu | STS mg/L |
|---|---|---|---|---|
| Culiacancito | 7.55 | 836 | 390 | 560 |
| La Palma | 7.6 | 784 | 380 | 540 |
| Lagunilla | 7.45 | 810 | 390 | 570 |
| El Paraíso | 7.58 | 826 | 410 | 590 |
| El Tamarindo | 8.05 | 570 | 280 | 410 |
| San Blas | 7.89 | 695 | 310 | 380 |
| Canal | 7.60 | 640 | 290 | 420 |
| Caballitos | 7.56 | 610 | 430 | 490 |
| Convergencia | 7.75 | 590 | 380 | 590 |
| Manglar | 7.90 | 7.45 | 4450 | 4870 |

**STS =** Solidos suspendidos totales, **µS/m** = microsiemens por metro cubico, **psu** = unidades prácticas de salinidad, **mg/L** = miligramos sobre litro.

### 6.1.2 Cuantificación de Coliformes Fecales y *Escherichia coli*

En los puntos de muestreo correspondientes al dren "Cedritos" se encontró la mayor cantidad de carga microbiana en comparación con el dren "El Papachal", esto debido a que la planta tratadora de agua residual (PTAR-Norte) ubicada en Culiacancito, recibe más agua residual proveniente de un amplio sector de la ciudad de Culiacán y por lo tanto, la cantidad de agua vertida hacia el dren Cedritos es mayor y más diversa en su contenido por la descarga de algunas industrias del ramo agroalimentario, en comparación de la planta tratadora ubicada en Villa Adolfo López Mateos, que solo trata el agua residual de esta comunidad. Los resultados obtenidos mostraron una alta concentración de Coliformes fecales y *Escherichia coli* en los puntos del dren "Cedritos", con los valores más altos en el mes de noviembre en el punto de muestreo "Culiacancito", ya que está más cercano a la planta de tratamiento de agua residual y que se registró un valor de ($4.85x10^8$ UFC/100 mL) de Coliformes fecales y ($1.0x10^8$ UFC/100 mL) de *E. coli*. Los valores más bajos registrados en el dren Cedritos fueron en el punto de muestreo de El Manglar en el mes de enero, con ($6x10^2$ UFC/100 mL) de Coliformes fecales y de ($2.5x10^2$ UFC/100 mL) para el caso de *E. coli* en el mes de diciembre. Estos resultados podrían deberse principalmente a dos razones; la primera, es que las condiciones fisicoquímicas del agua en este punto son extremas debido a la alta salinidad, que afecta directamente la proliferación y sobrevivencia de las poblaciones bacterianas; y la segunda, a las bajas temperaturas y las condiciones climáticas registradas en esas fechas, ya que en diciembre se muestreó después de una precipitación pluvial que se originó por frente frío, la cual pudo diluir las concentraciones de Coliformes fecales y *E. coli*, y por otra parte, las bajas temperaturas registradas en los meses de invierno, que disminuyen el crecimiento óptimo de las bacterias en estudio. Las concentraciones de Coliformes fecales están representadas en el cuadro 5 y las concentraciones de *E. coli* están representadas en el cuadro 6 respectivamente.

Las concentraciones de Coliformes fecales y *Escherichia coli* encontradas en ambos drenes sobrepasan los límites permitidos por la Organización de las Naciones Unidas, (ONU), para utilización en riego agrícola, que es de $1x10^3$ UFC/100 mL de Coliformes fecales y la Comunidad Económica Europea (CEE), menos de 2,000 Coliformes fecales por 100 mL, y con fines que se utilicen para riego de cultivos que comúnmente se consumen crudos, campos de deporte, parques públicos, por lo que la calidad de esta agua no es apta para la irrigación de hortalizas (OMS, 1989).

**Cuadro 5.** Concentración de Coliformes fecales presentes en el agua residual tratada de los drenes Cedritos y El Papachal.

| Punto de muestreo | Localidad | Meses de muestreo/concentración de Coliformes fecales (UFC/100 mL) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Nov** | **Dic** | **Ene** | **Feb** | **Mar** | **Abr** |
| A | Culiacancito | $4.85x10^8$ | $9.6x10^7$ | $6.6x10^7$ | $8.5x10^7$ | $1.5\ x10^8$ | $1.56x10^8$ |
| B | La Palma | $1.16x10^8$ | $2.8x10^7$ | $6.0x10^7$ | $8.1x10^7$ | $6.25\ x10^7$ | $8.2\ x10^7$ |
| C | Lagunilla | $1.03x10^8$ | $3.4x10^7$ | $5.5x10^7$ | $1.29x10^8$ | $8.0\ x10^7$ | $1.26\ x10^8$ |
| D | El paraíso | $1.2x10^8$ | $5.9x10^7$ | $1.53x10^8$ | $7.1x10^7$ | $1.25\ x10^8$ | $1.08\ x10^8$ |
| E | El Tamarindo | $1.5x10^5$ | $3.37x10^5$ | $6.2x10^5$ | $4.4x10^3$ | $8.0\ x10^2$ | $1.05\ x10^3$ |
| F | San Blas | $1.2x10^5$ | $8.59x10^5$ | $1.0x10^4$ | $4.8x10^3$ | $1.5\ x10^3$ | $1.1\ x10^3$ |
| G | Canal | $3.3x10^5$ | $3.55x10^5$ | $9.0x10^5$ | $1.0x10^3$ | $9.5\ x10^2$ | $8.2\ x10^2$ |
| H | Caballitos | $9.0x10^5$ | $1.2x10^6$ | $3.7x10^5$ | $6.1x10^3$ | $4.4x10^3$ | $2.4\ x10^3$ |
| I | Convergencia | $3.05x10^8$ | $2.57x10^7$ | $6.8x10^7$ | $2.7x10^7$ | $1.35\ x10^8$ | $1.11\ x10^8$ |
| J | Manglar | $6.2x10^3$ | $7.85x10^3$ | $5.0x10^2$ | $6x10^2$ | $8.5x10^2$ | $1.0\ x10^3$ |

Los puntos de muestreo del dren Cedritos mostraron una alta carga de *Escherichia coli* en comparación con el dren El Papachal, esto debido a que *E. coli* es más afín al tracto gastrointestinal de los humanos y se encuentra en las heces, y por ende, en las aguas residuales municipales, como es este el caso. En tanto que en el dren El Papachal se encontraron valores más bajos de Coliformes fecales y *E. coli* y esto puede deberse a que la planta de tratamiento trata menos agua residual y la carga microbiana de este dren puede estar más influenciada por microbiota de otras fuentes animales silvestres o de granja. Si bien se cuantificó a los Coliformes fecales y *E. coli* como modelos indicadores de la calidad del agua, algunos autores reportan que no siempre es confiable la medición de estos organismos para predecir la presencia de materia fecal u organismos patógenos, debido a que tienen algunos inconvenientes, tales como: No siempre se correlacionan con patógenos en el agua, como pueden ser los virus, los Coliformes fecales no siempre provienen de fuentes humanas, sino que también pueden ser arrojados por otros animales, además pueden sobrevivir en el ambiente, e incluso replicarse continuamente. La ocurrencia de Coliformes fecales en el medio ambiente no siempre indica riesgos para la salud pública, incluso en los límites máximos de concentración (LaBelle et al., 1980; Griffin et al., 2001), además que la mayoría de las bacterias Coliformes fecales no causan enfermedades, sin embargo, algunas cepas de *E. coli*, como el serotipo O157:H7, puede causar enfermedades graves, ya que con tan solo 10 células puede desencadenar procesos infectivos graves o incluso la muerte (Liu et al., 2007). Aun así, los

Coliformes fecales se siguen utilizando a nivel mundial como indicadores de contaminación, esta información nos da una explicación referente a la magnitud de la contaminación y de las consecuencias que pueden derivarse al utilizar esta agua para usos agrícolas. Por esta razón, se deben realizar evaluaciones precisas donde se identifique el nivel de calidad del agua y el riesgo para la salud pública, así como un ensayo de detección que sea sensible y específico, es decir, uno que pueda determinar de manera confiable un bajo número de especies objetivo (Griffin et al., 2001).

**Cuadro 6.** Concentración de *Escherichia coli* presentes en el agua residual tratada de los drenes Cedritos y El Papachal.

| **Punto de muestreo** | **Localidad** | **Meses de muestreo/concentración de *Escherichia coli* (UFC/100 mL)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Nov** | **Dic** | **Ene** | **Feb** | **Mar** | **Abr** |
| A | Culiacancito | $1.0x10^8$ | $4.4x10^7$ | $3.1x10^7$ | $7.5x10^7$ | $8.25x10^7$ | $7.4\ x10^7$ |
| B | La Palma | $5.2x10^7$ | $2.25x10^7$ | $4.65x10^7$ | $7.5x10^7$ | $2.25x10^7$ | $3.2\ x10^7$ |
| C | Lagunilla | $4.6x10^7$ | $2.95x10^7$ | $4.4x10^7$ | $5.4x10^7$ | $3.0x10^7$ | $3.4\ x10^7$ |
| D | El paraíso | $5.4x10^7$ | $3.6x10^7$ | $7.8x10^7$ | $6.8x10^7$ | $4.0x10^7$ | $4.5\ x10^7$ |
| E | El Tamarindo | $7.5x10^2$ | $2.1x10^3$ | $4.0x10^4$ | $1.95x10^3$ | $4.0x10^2$ | $5.2\ x10^2$ |
| F | San Blas | $5.5x10^3$ | $8.5x10^5$ | $5.5x10^2$ | $2.9x10^3$ | $7.0x10^2$ | $7.3\ x10^2$ |
| G | Canal | $3.3x10^3$ | $3.5x10^5$ | $1.3x10^6$ | $1.0x10^3$ | $5.5x10^2$ | $4.8\ x10^2$ |
| H | Caballitos | $7.5x10^2$ | $6.7x10^5$ | $1.65x10^3$ | $3.45x10^3$ | $3.0x10^3$ | $4.0\ x10^2$ |
| I | Convergencia | $4.05x10^7$ | $2.45x10^7$ | $5.1x10^7$ | $2.55x10^7$ | $6.0x10^7$ | $5.7x10^7$ |
| J | Manglar | $4.55x10^3$ | $2.5x10^2$ | $3.5x10^2$ | $5.0x10^2$ | $8.5x10^2$ | $7.0\ x10^2$ |

## 6.2 Evaluación de Riesgo Microbiológico Cuantitativo (QMRA).

*Salmonella* se consideró como el microorganismo (peligro) de interés, debido a que es considerado el principal patógeno bacteriano encontrado en agua residual, así como uno de los principales causantes de enfermedades gastrointestinales en el mundo.

### 6.2.1 Formulación del Problema

6.2.1.1 Cuantificación de *Salmonella* spp. Los resultados para *Salmonella* spp. en ART, presentó niveles altos en ambos drenes, aunque con una diferencia marcada en mayor concentración del dren Cedritos donde el valor promedio fluctuó entre (8.9 NMP/L) mientras que para el Dren Papachal los valores de NMP son significativamente menores en un promedio de (2.02 NMP/L). *Salmonella* se encuentra frecuentemente en aguas residuales y es una de las bacterias más predominantes en este tipo de muestras, generalmente están presentes en grandes cantidades en las aguas residuales sin tratar (103-104 UFC/L) y todavía puede estar presente en el efluente de aguas residuales después de un avanzado tratamiento secundario que incluye coagulación, filtración y desinfección (Maier et al., 2000; Wéry et al., 2008), los mismos tratamientos que se utilizan en la (PTAR-Norte) de Culiacancito, donde deriva el dren Cedritos.

En el mes de noviembre se obtuvieron las concentraciones más altas de *Salmonella* (16.14 NMP/L). La presencia de *Salmonella* en los efluentes de aguas residuales es de carácter aleatorio, y la concentración que se encuentre en un determinado momento dependerá de la cantidad y el origen de sus descargas, y ocasionalmente se ve afectado por eventos naturales, como las precipitaciones pluviales, donde se reducen tanto la frecuencia de aislamiento, como las concentraciones encontradas. Por ejemplo, este fue el caso donde en los primeros días del mes de diciembre, se realizó un muestreo, y se presentó un evento de precipitación pluvial de aproximadamente 150 $mm^3$ en la región de estudio, donde consideramos que la baja incidencia y concentraciones del patógeno pudieron estar influenciadas por el arrastre de escorrentías y arroyos cuesta abajo hacía los drenes, los cuales pudieron diluir las concentraciones de *Salmonella*. En este sentido, ocurrió el mismo fenómeno con las concentraciones de Coliformes fecales y *E. coli*, las cuales disminuyeron en al menos 1 $Log_{10}$ UFC/100 mL.

Estudios previos han demostrado una correlación positiva entre las concentraciones de bacterias indicadoras fecales (BIF), en especial *E. coli* y Coliformes fecales, que resultaron ser los indicadores más apropiados de presencia de *Salmonella* en comparación con *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* y Coliformes totales, identificando un nivel de umbral de *E. coli* que dio la mayor probabilidad de detección del patógeno, que fue de 89 UFC/100 mL. Este umbral de *E. coli* fue determinado a correlacionarse con la identificación del 89% de *Salmonella* en las

muestras positivas (Wilkes et al., 2009). Sin embargo, en el presente estudio sugerimos que las bajas temperaturas registradas en ese mes fueron el factor clave para la disminución en la concentración de *Salmonella*, ya que la temperatura baja impide el crecimiento de este microorganismo (Levantesi et al., 2012), o bien pudiesen estar en un estado viable pero no cultivable. Existe un dato sobresaliente en el punto de San Blas en el mes de marzo con un valor más alto que los puntos del dren Cedritos en ese mes, esto puede ser debido a que cuando se tomó la muestra era un mes más caluroso y el agua en este punto no tiene fluidez y está estancada por lo que facilitó la proliferación de *Salmonella.* En el último punto de muestreo referente a Manglar no se encontró *Salmonella* en tres meses (diciembre, marzo y abril) y un valor muy bajo en febrero. Se sabe que la salinidad afecta considerablemente el crecimiento de *Salmonella* en el agua o que puede estar en estado viable no cultivable, y este punto está muy cercano al mar, por lo que las propiedades fisicoquímicas como la salinidad, pueden influir en la presencia del microorganismo. En las tomas de muestra pueden ocurrir eventos de actividades antrópicas, tales como las descargas puntuales de agua de riego en agrícolas, que favorecen la dilución de microorganismos en el agua. En el caso del punto Lagunilla, en el mes de marzo, debido a que una escorrentía de agua de riego se mezcló con el agua residual, provocó una dilución de ésta y disminuyendo la concentración hasta 0.

El punto de Convergencia, entre los dos drenes, también mostró altos niveles de concentración de *Salmonella*, muy similares a los que se obtuvieron a los puntos del dren Cedritos, esto se explica en virtud de que la mayor cantidad de agua proviene de este dren en comparación con el de El Papachal y por esto se encuentra más cargada de *Salmonella*.

Para fines de este estudio, la cuantificación de *Salmonella* se consideraron cuatro periodos (noviembre, diciembre, enero-febrero y marzo-abril) representados en el cuadro 6 como 1,2,3 y 4 respectivamente. Los altos valores de *Salmonella*, así como de Coliformes fecales y *Escherichia coli* encontrados en el ART de los drenes en estudio, nos indica que esta agua no es apta para el riego agrícola, ya que pudiera contaminar a dichos cultivos y consecuentemente generar casos de infección en individuos por la ingesta de un alimento irrigado con esta agua.

6.2.1.2 Confirmación de *Salmonella* spp por PCR. Un total de 52 cepas que previamente resultaron presuntivas de *Salmonella* por pruebas bioquímicas se analizaron, y de las cuales 45 resultaron

positivas confirmándose por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniéndose así un 86.5 % de *Salmonella* positiva. cabe aclarar que no en todos los muestreos resultaron cepas presuntivas, en el primer muestreo todos los puntos resultaron positivos para *Salmonella*, con excepción del punto D que probablemente correspondía a una cepa de otro género bacteriano como pudiera ser Proteus o Enterobacter que también producen ácido sulfhídrico y se pueden confundir con *Salmonella* (Clarke, 1953). Para el ensayo de las muestras de diciembre donde solamente dos puntos del dren Cedritos resultaron presuntivas, y en la confirmación por PCR resultaron positivas, esto puede deberse a que *Salmonella* pudiese estar en las muestras analizadas, sin embargo por las condiciones ambientales que se presentaron en dicho mes la bacteria pudo presentarse en un estado viable pero no cultivable. En los meses de febrero, marzo y abril, no todos los puntos de muestreo resultaron con muestras presuntivas hasta bioquímicas, por lo que solo se analizaron algunas cepas correspondientes a cada mes y punto de muestreo, los resultados se muestran en la Figura 6, para las muestras positivas en el mes de noviembre-diciembre.

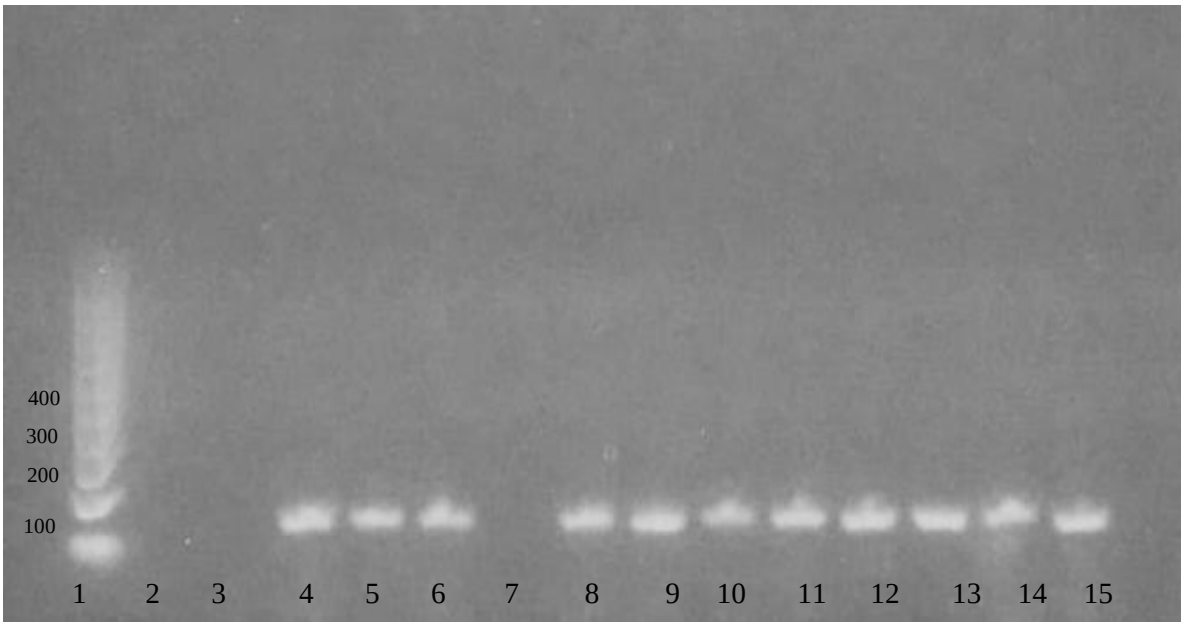


**Figura 6.** Gel de electroforesis para la identificaron de *Salmonella* spp. por PCR (gen *pfk*) en los meses de noviembre y diciembre. 1) Marcador de tamaño molecular, 2) Control blanco, 3) Control negativo, 4) Control positivo, 5-15) Cepas analizadas.

6.2.1.3 Serotipos de *Salmonella* aislados del ART. De las 45 cepas confirmadas como Salmonella, 5 no reaccionaron con el antisuero polivalente, ni con los de serogrupo somático "O" (A, B, C, D, E, F y G) y 1 más no reaccionó con los sueros Spicer-Edwards y el flajelar H, es posible que se trate de cepas rugosas no serotipables, o bien, serotipos atípicos o raros que no pertenecen a los serogrupos que fueron evaluados en la presente investigación. Se pudo identificar un total de 11 serotipos de las 39 cepas restantes analizadas. Los serotipos identificados fueron: Enteritidis (2), Senftenberg (3), Agona (5), Goerlitz (4), Give (7), Muenchen (4), Saphra (2), Oranienburg (2), Javiana (1), Sandiego (3) y Gatineau (1).

Los serotipos Muenchen y Senftenberg se encontraron en ambos drenes (Cedritos y El Papachal) mientras que el serotipo Gatineau solo se encontró en el dren de convergencia en el punto de Manglar, sin ser encontrado en los demás puntos de muestreo. Cabe aclarar que las condiciones de salinidad son altas en este punto de muestreo y que los serotipos Senftenberg, Sandiego y Gatineau se encontraron en este punto de muestreo por lo que se puede considerar que son resistentes a la salinidad.

Un dato interesante en la presente investigación, es que los serotipos Goerlitz y Gatineau no han sido previamente reportados en México. Esta información es de valor, ya que aporta conocimiento nuevo sobre la presencia y distribución de serotipos de *Salmonella* en los diferentes ambientes, en este caso, el agua residual tratada en Sinaloa. *Salmonella* Gatineau ha sido reportada en expulsores de canola orgánica en Italia (RASFF, 2017), mientras que *Salmonella* Goerlitz ha sido reportada en un caso de enfermedad nosocomial por el contacto con un sigmoidoscopio contaminado, (Hawkey et al., 1981), en un estudio por Newell et al., (1959) se reportó un caso de *Salmonella* Goerlitz en Belfast, Irlanda del norte, aislado de harina de pescado proveniente de Angola.

En una investigación realizada por Mohle–Boetani et al. (1999), reportaron que el brote de salmonelosis ocurrido en California en 1997 fue por *Salmonella* Saphra, donde se asoció al consumo de melón Cantaloupe, cultivado y empacado en Altamirano, Guerrero, México.

*Salmonella* Enteritidis es uno de los serotipos más reportados en casos de aislados hospitalarios, eso significa que es un serotipo altamente virulento que frecuentemente ocasiona infecciones en humanos.

*Salmonella* Sandiego se reportó como la responsable de un brote con 25 personas en 10 estados de la unión americana, reportados desde el 21 de junio de 2018 hasta el 7 de agosto de 2018 y veinticinco personas fueron hospitalizadas por la ingesta de ensalada con pasta de primavera comprada en las tiendas de comestibles Hy-Vee que era una fuente probable del brote (CDC, 2018). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, siglas en inglés)

reportó que enfermaron 12 personas con *Salmonella* Agona y 3 con *Salmonella* Senftenberg, indicando que las papayas maradol de la granja Carica de Campeche en Tenabo, Campeche, México fueron la fuente probable de este brote en 23 estados de la unión americana (CDC, 2017). En 2016 *Salmonella* Oranienburg en huevos de concha al igual que *Salmonella* Muenchen en Alfalfa. La alta concentración y la gran diversidad de serotipos de *Salmonella* es una indicación de que el agua residual de los drenes en estudio es una potencial fuente de patógenos. Los serotipos encontrados se muestran en el (Cuadro 7) y su frecuencia en cada dren en la (Figura 8).

**Cuadro 7.** Serotipos de *Salmonella* identificados en el ART.

| | **Antisueros *Spicer-Edwards*** | | |
|---|---|---|---|
| **Antisuero Polivalente O** | **Fase 1** | **Fase 2** | **Serotipo** |
| 3, 10 | l, v | 1, 7 | Give |
| 4, 12 | g, s, f | - | Agona |
| 3, 10 | e, h | 1, 2 | Goertlitz |
| 6, 8 | d | 1, 2 | Muenchen |
| 3, 19 | g, s, t | - | Senftenberg |
| 4, 5, 12 | e, h, x | Z, 15 | Sandiego |
| 9, 12 | g, m | - | Enteritidis |
| 6, 7 | m, t | - | Oranienburg |
| 16 | y | 1, 5 | Saphra |
| 9, 12 | l.z2, 8 | 1, 5 | Javiana |
| 3, 19 | y | 1, 5 | Gatineau |

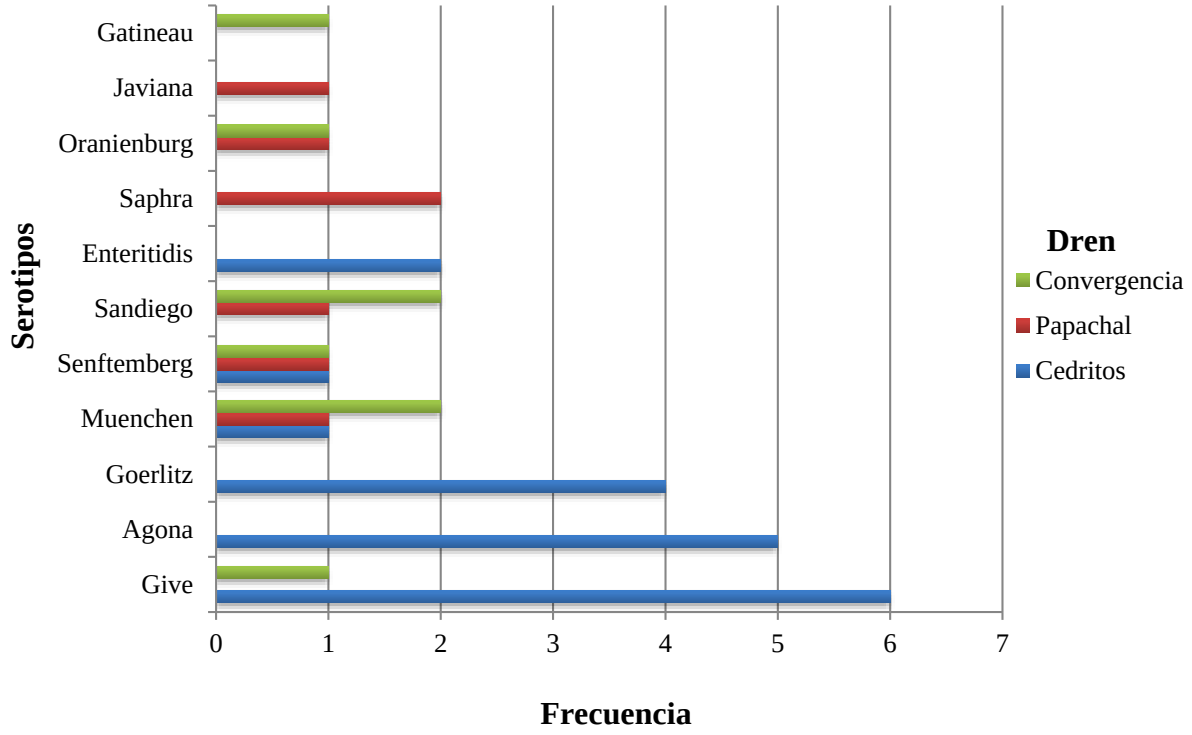


**Figura 7**. Prevalencia de serotipos de *Salmonella* en drenes de estudio.

### 6.2.2 Evaluación de la Exposición

La concentración de *Salmonella* en tomate se estimó siguiendo un escenario hipotetizado, siguiendo las recomendaciones sugeridas en la literatura y para aplicaciones de QMRA en diferentes patógenos y escenarios, que contemplan el uso de ART en la irrigación de productos agrícolas. A continuación se presentan los procedimientos y resultados obtenidos para las diferentes etapas de la ruta de exposición definida siguiendo los métodos de la literatura arriba indicada.

6.2.2.1 Concentración de *Salmonella* en agua residual tratada (*Cw*). Las concentraciones de *Salmonella* en ART, expresadas en NMP/L, se estimaron promediando los valores de *Salmonella* determinados en cada dren, durante los cuatro periodos de muestreo, (Cuadro 8).

**Cuadro 8**. Concentración de *Salmonella* en las muestras de ART.

| Dren | Período | $C_w$ |
|---|---|---|
| Cedritos | 1 | 12.330 |
| | 2 | 0.370 |
| | 3 | 6.280 |
| | 4 | 2.680 |
| El Papachal | 1 | 1.530 |
| | 2 | 0.065 |
| | 3 | 6.930 |
| | 4 | 1.570 |
| Convergencia | 1 | 11.200 |
| | 2 | 0.065 |
| | 3 | 2.440 |
| | 4 | 2.210 |

$C_w$ = Concentración promedio de *Salmonella* por litro de ART (NMP/L).

6.2.2.2 Cantidad diaria de *Salmonella* liberada en el suelo *Nr*. Las cantidades diarias de *Salmonella* liberadas en el suelo, por dren y periodo, aparecen en el Cuadro 9 y fueron calculadas mediante la fórmula (1) Los valores de Nr (concentración de *Salmonella* en el suelo) aparecen en el Cuadro 9. El volumen irrigado por goteo en cada planta de tomate se tomó como V = 8.64 L/planta/día (Villáfila y Wyss, 2009).

$$Nr = Cw \bullet V \quad (1)$$

Tomamos como ejemplo el cálculo del primer periodo en el dren Cedritos**:**

*Nr*= (12.33 NMP/L) (8.64 L/planta/día) = 106.53 NMP/planta/día

**Cuadro 9**. Concentración de *Salmonella* liberada al suelo.

| **Dren** | **Período** | $N_r$ |
|---|---|---|
| Cedritos | 1 | 106.53 |
| | 2 | 3.22 |
| | 3 | 54.25 |
| | 4 | 23.18 |
| El Papachal | 1 | 13.29 |
| | 2 | 0.56 |
| | 3 | 59.95 |
| | 4 | 13.53 |
| Convergencia | 1 | 96.77 |
| | 2 | 0.56 |
| | 3 | 21.07 |
| | 4 | 19.07 |

$N_r$ = Cantidad de *Salmonella* liberada al suelo (NMP/planta/día)

6.2.2.3 Cantidad acumulada de *Salmonella* sobreviviente en el suelo (*Ns*). Las cantidades de *Salmonella* que sobrevive en el suelo, por lugar y periodo de muestreo, Cuadro 10, se calcularon usando la fórmula:

$$N_s = N_r\left(\frac{1}{1-e^{-k}}\right) \quad (2)$$

Tomando los parámetros $\beta \cong$ -0.108, k ≅ -(-0.108) ln(10) = 0.249 propuestos por Nicholson et al. (2005), la ecuación (2) se simplifica en:

$$Ns = 4.55\ Nr$$

A continuación se presentan los resultados obtenidos de $N_s$ (Cuadro 10), para los valores de *Nr* en el cuadro 9.

**Cuadro 10**. Cantidad acumulada de *Salmonella* sobreviviente en el suelo.

| Lugar de muestreo | Período | $N_s$ |
|---|---|---|
| | 1 | 484.71 |
| Dren | 2 | 14.65 |
| Cedritos | 3 | 246.83 |
| | 4 | 105.47 |
| | 1 | 60.47 |
| Dren | 2 | 2.55 |
| El Papachal | 3 | 272.77 |
| | 4 | 61.56 |
| | 1 | 440.30 |
| Dren | 2 | 2.55 |
| Convergencia | 3 | 95.86 |
| | 4 | 86.77 |

$N_s$ = Cantidad acumulada de *Salmonella* sobreviviente en el suelo (NMP/planta/día).

Los resultados obtenidos muestran una alta concentración en el dren Cedritos, con una tendencia de ocho veces mayor que en el dren El Papachal en el periodo 1, correspondiente a noviembre, y el periodo 3 a enero y febrero respectivamente. El dren Convergencia mostró valores más altos de aportación de *Salmonella* al suelo respecto al de El Papachal, esto debido a que está más cargado con agua derivada del dren Cedritos, sin embargo, los valores disminuyen en el último punto (Manglar), debido a la naturaleza salobre del agua de este punto, que por una parte diluye la concentración de la bacteria, pero que también aporta otras cualidades fisicoquímicas, como lo es la salinidad.

6.2.2.4 Concentración final de *Salmonella* en el suelo (*CFss*). Esta parte del escenario se evaluó, para cada sitio de muestreo y periodo de estudio, según la fórmula:

$$CF_{ss} = \frac{N_s}{\pi r^2 dpt.dens} \quad (3)$$

Siguiendo la recomendación de Andreoli et al. (2001), se asumió que en cualquier día de riego, el agua liberada se extiende uniformemente en un radio *r* = 15 cm, a una profundidad máxima *dpt* = 30 cm y una densidad de suelo *dens* = 1.5g/cm$^3$.

$$CF_{ss} = \frac{484.71}{(3.1416)\ (225)\ (30)\ (1.5)}$$

$CF_{ss}$= 0.01500 NMP/g / planta

Los valores calculados de $CF_{ss}$, calculados para los valores de $N_s$ del Cuadro 10, se muestran en el Cuadro 11.

**Cuadro 11**. Concentración final de *Salmonella* en el suelo

| Lugar de muestreo | Período | $CF_{ss}$ |
|---|---|---|
| Dren Cedritos | 1 | 0.01500 |
| | 2 | 0.00046 |
| | 3 | 0.00776 |
| | 4 | 0.00330 |
| Dren Papachal | 1 | 0.00190 |
| | 2 | 0.00008 |
| | 3 | 0.00850 |
| | 4 | 0.00190 |
| Dren Convergencia | 1 | 0.01400 |
| | 2 | 0.00008 |
| | 3 | 0.00300 |
| | 4 | 0.00270 |

$CF_{ss}$ = Concentración final de *Salmonella* en el suelo (NMP)

6.2.2.5 Concentración de *Salmonella* en tomate antes de desinfectar (*Ctad*). La concentración de *Salmonella* en tomate antes de desinfectar, $C_{tad}$, se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$C_{tad} = \frac{CF_{ss}.SA}{W} \quad (4)$$

La cantidad (g) de suelo unido a la superficie del tomate se tomó como $SA$ = 0.3g, esto debido a una transferencia de factors bióticos y abióticos tales como: el acarreado en las manos de los trabajadores, insectos, viento, salpicaduras, entre otros. También se estimó el peso del tomate en $W$ = 100g siguiendo la propuesta de Krzyzanowski Jr et al. (2016), los valores de $C_{tad}$,, se muestran en el Cuadro 12.

$$C_{tad} = (0.01500) \quad 0.3 / 100$$

$C_{tad}$ = 0.0000450

**Cuadro 12**. Concentración de *Salmonella* en tomate antes de desinfectar

| Lugar de muestreo | Período | $C_{tad}$ |
|---|---|---|
| Dren Cedritos | 1 | 0.0000450 |
| | 2 | 0.0000014 |
| | 3 | 0.0000230 |
| | 4 | 0.0000099 |
| | 1 | 0.0000057 |

| | | |
|---|---|---|
| Dren Papachal | 2 | 0.0000002 |
| | 3 | 0.0000260 |
| | 4 | 0.0000057 |
| Dren Convergencia | 1 | 0.0000420 |
| | 2 | 0.00000024 |
| | 3 | 0.0000090 |
| | 4 | 0.0000081 |

$C_{tad}$ = Concentración de *Salmonella* en tomate antes de desinfección (NMP/tomate)

Un estudio realizado por Guo et al., (2002) determinó que *Salmonella* sobrevivió durante al menos 45 días en el suelo húmedo y que la población de *Salmonella* en tomates en contacto con el suelo aumentó en 2.5 $\log_{10}$ UFC por tomate durante el almacenamiento a 4 días a 20 °C y se manteniéndose constante durante 10 días adicionales.

Aunque los valores de NMP/tomate fueron relativamente bajos, se sabe que *Salmonella* puede sobrevivir en la superficie del tomate, incluso crecer hasta 9.5 $\text{Log}_{10}$ cuando son almacenados de 20 a 25 °C. En el estudio de Wei et al., (1995) se comprobó que las células de *Salmonella* Montevideo tenían una velocidad de muerte más lenta a 25 °C que a 20 °C, además se comprobó que al inocular *S.* Montevideo en heridas de 2 mm en diferentes dosis (3.16, 4.16 y 7.16 $\text{Log}_{10}$ UFC), las poblaciones de *S.* Montevideo aumentaron de 1 a 3 $\text{Log}_{10}$ durante un periodo de 2 días, o bien, permanecieron estables durante 24 h, ya que la madurez (del tomate rojo y verde) no inhibía el crecimiento bacteriano.

Esto se puede simular en campo, que una vez cosechado el tomate pueda existir un crecimiento de la población de *Salmonella* al estar el tomate expuesto con pequeñas fisuras que permitan a la *Salmonella* internalizarse en el fruto, o bien que sobreviva el periodo de cosecha y transporte (alrededor de 1 a 2 días) y en almacenamiento pueda surgir un rebrote. La internalización puede ocurrir incluso cuando *Salmonella* spp. está presente en concentraciones muy bajas, como lo demuestra el estudio de Manios et al., (2013) con internalización de una baja concentración de *Salmonella* Typhimurium (1 a 4 células), también se ha demostrado que los patógenos entéricos pueden ingresar a los tejidos vegetales a través de aberturas naturales tales como: estomas, uniones laterales de raíces o flores, (Erickson., 2012). La internalización puede deberse a que los orgánulos de las plantas, (estomas) que están conectados a una red intercelular de espacio libre, requieren

acceso al oxígeno y permiten un intercambio de gases, el agua externa puede inundar estas aberturas debido a la presión hidrostática y estar dirigida sobre las superficies de los frutos durante el contacto con agua permitiendo la internalización de *Salmonella* hacia dentro del fruto, (Bartz et al., 2015).

6.2.2.6 Concentración de *Salmonella* después de la desinfección con Cloro (*Ctdd*). En la presente investigación, se consideró un evento de desinfección de los frutos de tomate posterior a su cosecha mediante aplicación de hipoclorito de sodio (NaOCl), a una concentración de 200 ppm (mg/L), similar a la utilizada en los sistemas de producción de tomate en la región del valle de Culiacán y considerando los valores reportados por Chaidez et al., (2007), quienes evaluaron experimentalmente la reducción de *Salmonella* utilizando como desinfectante el cloro a 200 ppm, el cual pudo reducir hasta 2 $Log_{10}$ UFC (96 %) . Obtuvimos un valor de 0.324 como un factor derivado de la reducción de *Salmonella*.

$$C_{tdd} = (C_{tad})\ (0.324)$$

$$C_{tdd} = (0.0000450)\ (0.324) = 0.000001450$$

**Cuadro 13**. Concentración de *Salmonella* en tomate después de desinfectar

| Lugar de muestreo | Período | $C_{tdd}$ |
|---|---|---|
| Dren Cedritos | 1 | 0.0000014580 |
| | 2 | 0.0000000454 |
| | 3 | 0.0000007452 |
| | 4 | 0.0000003208 |
| Dren | 1 | 0.0000001847 |
| | 2 | 0.0000000065 |

| | | |
|---|---|---|
| Papachal | 3 | 0.0000008424 |
| | 4 | 0.0000001847 |
| Dren Convergencia | 1 | 0.0000013608 |
| | 2 | 0.0000000078 |
| | 3 | 0.0000002916 |
| | 4 | 0.0000002624 |

$C_{tdd}$ = Concentración de *Salmonella* en tomate después de desinfección NMP/tomate

En un estudio realizado por Chang et al., (2002), determinaron la reducción de *Salmonella* con NaOCl en 100 mg/L en la superficie de tomates, con valores de hasta 5.5 $\log_{10}$ UFC/ml, lo que indica prácticamente la muerte casi total del patógeno en el tomate.

6.2.2.7 Dosis ingerida diaria de *Salmonella* (*d*) por consumo de tomate irrigado con ART. La ingesta diaria de *Salmonella*, por el consumo de una porción de tomate expresada en gramos ( I ) previamente irrigado con ART, expresada en (NMP/día), se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$d = (C_{tdd}) (I) \quad (5)$$

Donde *I* es la tasa de ingestión de tomate (g/día).

Para este trabajo se tomó un valor de *I* = 55g (Krzyzanowski Jr et al., 2016) y $C_{tdd}$ es la concentración de *Salmonella* en un fruto de tomate de 100g después de la sanitización, por lo que el valor de *I* se ajustó a 0.55.

$$d = (0.000001458) (0.55)$$

Los valores de *d* relacionados con $C_{tdd}$ del Cuadro 13, por dren y por periodo, se muestran en el Cuadro 14.

**Cuadro 14.** Dosis ingerida diaria de *Salmonella* por consumo de una porción de tomate.

| Lugar de muestreo | Período | *d* |
|---|---|---|
| Dren Cedritos | 1 | 0.000000802 |
| | 2 | 0.000000025 |
| | 3 | 0.000000410 |
| | 4 | 0.000000176 |
| Dren Papachal | 1 | 0.000000102 |
| | 2 | 0.000000004 |
| | 3 | 0.000000463 |
| | 4 | 0.000000102 |
| Dren Convergencia | 1 | 0.000000748 |
| | 2 | 0.000000004 |
| | 3 | 0.000000160 |
| | 4 | 0.000000144 |

*d* = Concentración de *Salmonella* ingerida (NMP).

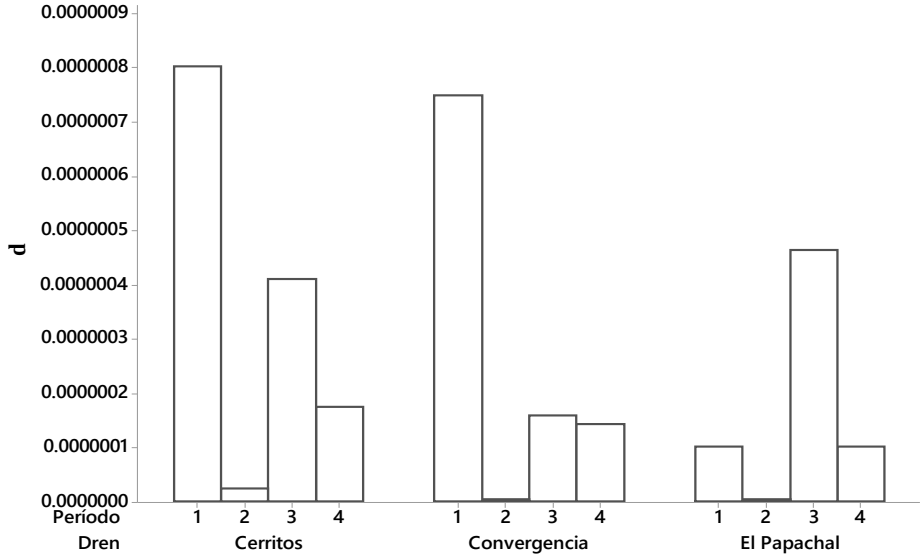


**Figura 8.** Variación en las diferentes dosis infecciosas diarias de *Salmonella* estimadas por dren y periodo de riego.

Si el tomate fue irrigado con agua del dren Cedritos la dosis diaria ingerida promedio sería entre $2.5x10^{-7}$ $.8X10^{-6}$ , para el dren El Papachal las concentraciones variaron entre $4x10^{-8}$ y $4.6x10^{-6}$ , mientras que para el dren de Convergencia los valores de concentración fueron de entre $4x10^{-8}$ y $7.5\ x10^{-6}$.

Un estudio realizado por Brandl et al., (2006) compiló y analizó datos de brotes de alimentos cuyo agente etiológico era *Salmonella* y concluyó que los tomates fueron uno de los vegetales más comúnmente implicados en el ocurrencia de brotes epidemiológicos. Si comparamos estos valores del cuadro 10 con los valores menores en NMP de las tablas del método 1200 de la EPA, los valores más bajos están representados por las primeras combinaciones de las tres diluciones y oscilan entre 0.0065 y 0.0130 (USEPA, 2012), entre estos rangos, se pueden encontrar los valores de concentración de *Salmonella* antes de desinfectar, por lo que en el peor de los escenarios, la ingesta de un tomate sin haber pasado por las etapas de desinfección pudieran presentar un problema alto de riesgo de infección ya que el valor más alto de concentración de *Salmonella* se presenta en el dren Cedritos asumiendo una cantidad de 0.0024 NMP muy cercano al valor más bajo de concentración propuesta por la EPA. Respecto a los valores obtenidos en dosis diaria en tomate irrigado por los dos drenes Papachal y Convergencia estos resultaron bajos respecto a la comparación con los del dren Cedritos, y algunos de los valores en comparación con las primeras combinaciones del método 1200 que el más bajo es de 0.006473, cabe resaltar que estos cálculos se obtuvieron basados en promedios generales de todos los puntos de muestreo y en todo el periodo para cada dren de estudio, por lo que tanto como las concentraciones y las dosis diarias de *Salmonella* ingeridas pueden variar en el tiempo (mes de muestreo) y el espacio (punto de muestreo).

### 6.2.3 Evaluación de Efectos en la Salud

Se determinó la probabilidad de infección utilizando la ecuación propuesta por Hass et al. (1999), sustituyendo los valores de los parámetros medidos y los obtenidos de la literatura, se estimó la probabilidad de infección para cada periodo y cada dren.

Asumiendo un modelo Beta-Poisson para la relación dosis-respuesta, el riego diario de infección, a partir de la ecuación (6), es:

$$P_i(d) = 1 - \left[1 + \frac{d}{N_{50}}\left(2^{\frac{1}{\alpha}} - 1\right)\right]^{-\alpha} \quad (6)$$

En particular, los valores de $N_{50}$ = 23,600 y de $\alpha$ = 0.3126, los correspondientes a *Salmonella* (Haas et al., 1999), reducen a la expresión siguiente:

$$P_i(d) = 1 - \left[1 + \frac{d}{23600}\left(2^{\frac{1}{0.3126}} - 1\right)\right]^{-0.3126}$$
$$= 1 - \left[1 + 0.00034674 \times d\right]^{-0.3126} \quad (6)$$

Los cálculos de $P_i(d)$, correspondientes a los valores de d del Cuadro 14, se muestran en el Cuadro 15 a continuación.

**Cuadro 15.** Probabilidad de infección con *Salmonella* de un solo evento

| Lugar de muestreo | Período | $P_i(d)$ |
|---|---|---|
| Dren Cedritos | 1 | $8.69 \times 10^{-11}$ |
| | 2 | $0.27 \times 10^{-11}$ |
| | 3 | $4.44 \times 10^{-11}$ |
| | 4 | $1.91 \times 10^{-11}$ |
| Dren Papachal | 1 | $1.11 \times 10^{-11}$ |
| | 2 | $0.04 \times 10^{-11}$ |
| | 3 | $5.02 \times 10^{-11}$ |
| | 4 | $1.11 \times 10^{-11}$ |
| Dren Convergencia | 1 | $8.11 \times 10^{-11}$ |
| | 2 | $0.04 \times 10^{-11}$ |
| | 3 | $1.73 \times 10^{-11}$ |
| | 4 | $1.56 \times 10^{-11}$ |

$P_i(d)$ = probabilidad de infección de un solo evento.

En un estudio realizado en una PTAR de Hässleholm, Suecia por Westrell et al., (2004), donde se hizo una relación entre HACPP /QMRA, y que además se plantearon varios escenarios incluyendo el de ingesta de cultivos crudos irrigados con ART, y diferentes microorganismos entre ellos *Salmonella*, como patógeno potencial del estudio, y que en comparación con nuestro estudio se determinó la probabilidad de infección en un solo evento utilizando el QMRA probabilístico aplicando Software estadístico, determinaron una probabilidad de 9 x10$^{-8}$ (Westrell et al., 2004), muy similar a los valores de probabilidad de infección en un solo evento obtenidos en nuestro estudio.

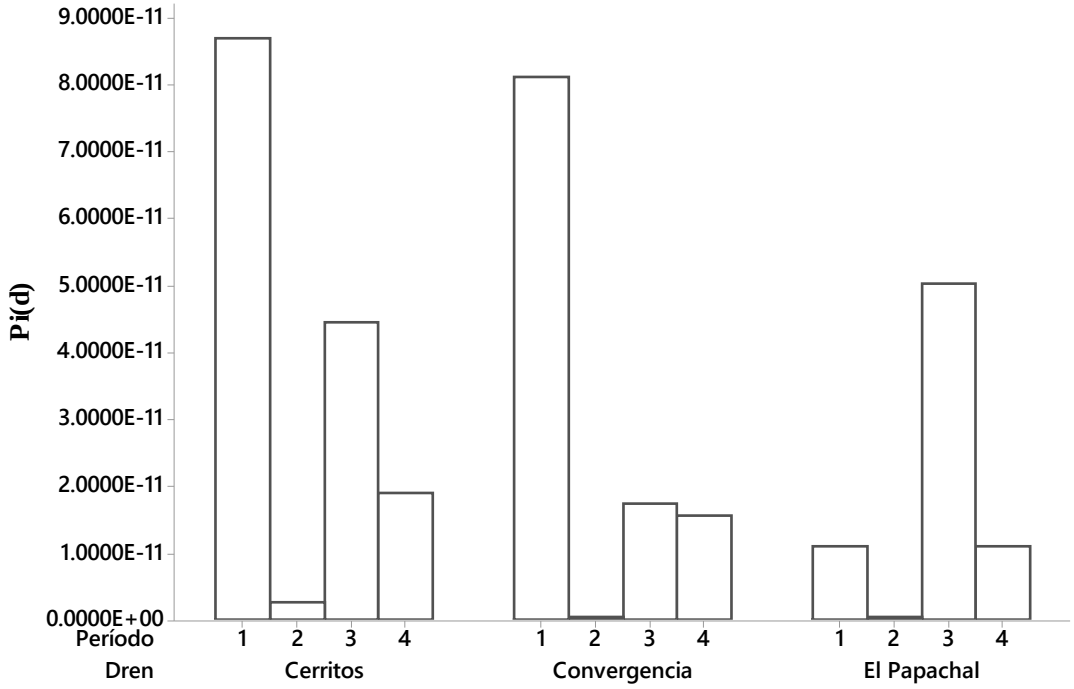


**Figura 9.** Probabilidad de infección con *Salmonella* por la ingesta de tomate irrigado con ART, en un evento de una sola exposición.

Es sabido que con concentraciones bajas, (15 a 20) células de *Salmonella* pueden causar una dosis infecciosa dependiendo la edad y salud del huésped (FDA, 2003). Lo que sí es evidente, es que el riesgo de contaminación en el dren Cedritos es más predominante y puede resultar un problema de inocuidad en la cosecha de tomate u otras hortalizas irrigadas en la región, así como posteriormente

de salud pública en la población al no ser desinfectadas correctamente, ya que es probable que el agua es una fuente importante de contaminación del producto tanto en el campo como en el procesamiento posterior a la cosecha (Berger et al. al., 2010).

### 6.2.4 Caracterización del Riesgo

En la caracterización del riesgo se tomaron en cuenta los valores de las probabilidades de infección en un solo evento, para determinar la probabilidad de infección por año, calculada mediante la siguiente ecuación:

$$P_A = 1 - \left[1 - P_i(d)\right]^F \quad (7)$$

Para estimar el número (*F*) de días al año que un consumidor ingiere una ración de tomate en México, se tomaron los siguientes valores: Un consumo anual promedio de 15 Kg de tomate y una ración de 55 gramos (FIRA, 2019).

Para estimar el número (*F*) de días al año que un consumidor ingiere una ración de tomate en México, se tomaron los siguientes valores: Un consumo anual promedio de 15 Kg de tomate y una ración de 55 gramos (FIRA, 2019). Así, $F = \frac{15000}{55} \approx 273$ días. Por lo tanto, la ecuación (7) para el cálculo del riesgo anual de infección por individuo se reduce a $P_A = 1 - \left[1 - P_i(d)\right]^{273}$ . Los valores de $P_A$, para los valores de $P_i(d)$ del Cuadro 15, se muestran en el Cuadro 16 a continuación.

**Cuadro 16.** Probabilidades de infección con *Salmonella* por año.

| Dren | Período | $P_A$ |
|---|---|---|
| | 1 | $2.373 \times 10^{-8}$ |

| | | |
|---|---|---|
| Cedritos | 2 | $0.740 \times 10^{-9}$ |
| | 3 | $1.213 \times 10^{-8}$ |
| | 4 | $5.210 \times 10^{-9}$ |
| Papachal | 1 | $3.020 \times 10^{-9}$ |
| | 2 | $0.120 \times 10^{-9}$ |
| | 3 | $1.370 \times 10^{-8}$ |
| | 4 | $3.02\ 0x\ 10^{-9}$ |
| Convergencia | 1 | $2{,}213 \times 10^{-8}$ |
| | 2 | $0.120 \times 10^{-9}$ |
| | 3 | $4.730 \times 10^{-9}$ |
| | 4 | $4.260 \times 10^{-9}$ |

$P_A(d)$ = Probabilidades de infección con *Salmonella* por año.

En un estudio realizado por Shuval et al., (1997) evaluando la probabilidad de infección de *Vibrio cholerae* y el riesgo de enfermedad de cólera, por el consumo de pepino y lechuga irrigado con agua residual tratada y no tratada, obtuvo valores de probabilidad de infección en el consumo de 100 g de pepino de ($1.5x10^{-6}$ y $1.5\ x10^{-10}$) con agua residual sin tratar y tratada respectivamente y en lechuga de ( $1.5x10^{-4}$ y $1.5\ x10^{-8}$) con el mismo tratamiento. Mientras que el riesgo de contraer la enfermedad de cólera en el consumo de pepino fue de $7.5x10^{-7}$ y $7.5x10^{-11}$) con los mismos tratamientos y en el consumo de lechuga mayor riesgo de coleta con ($7.5x10^{-5}$ y $7.5x10^{-9}$), con los mismos tratamientos del uso de ART y ARNT, aunque estos valores de probabilidad de infección son evaluados con *Vibrio cholerae* y la naturaleza del patógeno difiere al de *Salmonella*, los valores reportados por Shuval et al., (1997) resultan semejantes a los obtenidos en nuestro estudio.

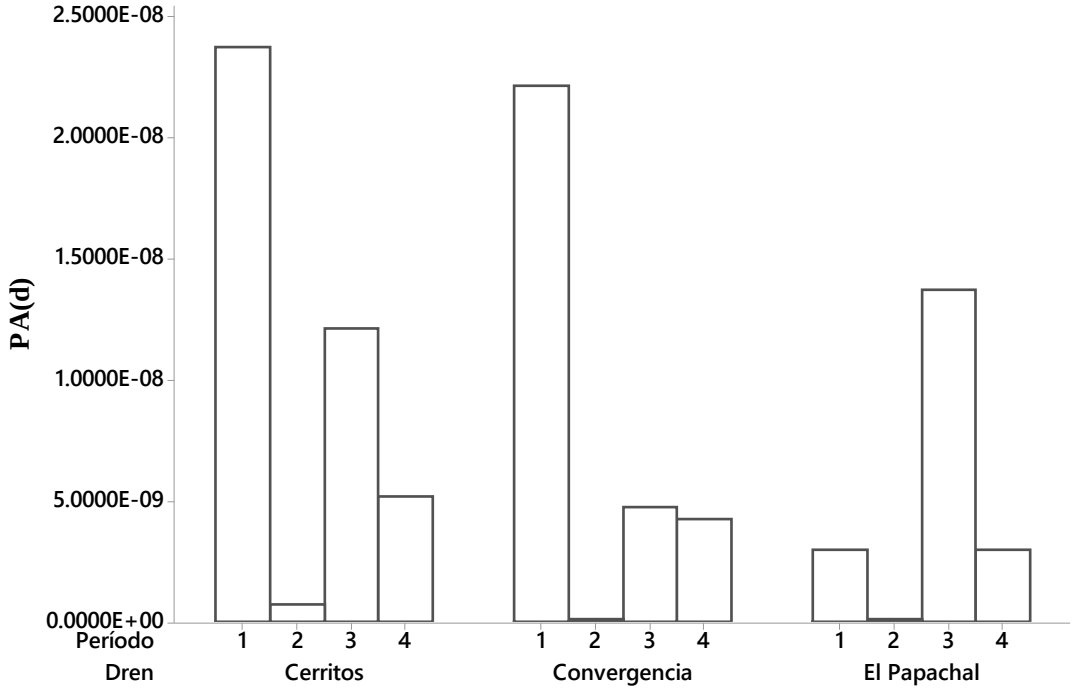


**Figura 10.** Probabilidad de infección anual por la ingesta de tomate irrigado con ART.

Otro estudio llevado a cabo por Henao-Herreño et al., (2017), donde se cuantificó a *Salmonella* en (lechuga, col y brócoli) por el método de RT-PCR, determinaron una probabilidad mayor al propuesto por la USEPA correspondiente a $1.0x10^{-4}$ /persona en un año, mientras que en nuestro estudio estos valores no se reportaron ni en el peor de los escenarios donde no se aplica la desinfección de tomate con NaOCl.

Los valores de probabilidad de infección anual resultaron más bajos que los propuestos por la OMS, que asume como carga de enfermedad tolerable un valor de $1x10^{-6}$ DALY pppa, y de acuerdo con los escenarios de exposición definidos para nuestro estudio, los resultados indican que el consumo de las hortalizas analizadas se reflejaría en riesgos menores que los niveles tolerables definidos en las directrices de la OMS, (OMS, 2006). Sin embargo si suponemos que en el peor de los escenarios el tomate es irrigado con ART y es consumido en fresco antes de su proceso de sanitización y desinfección con cloro, la probabilidad de $7.3x10^{-3}$, lo que si sobrepasaría el nivel de tolerancia propuesta por la OMS y representaría un riesgo de infección considerable para la población expuesta.

## 7. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de Coliformes fecales y *E. coli* en las muestras de ART analizadas sobrepasaron los límites que señala la OMS como permisibles para uso agrícola, que son de 1000 UFC/L.
2. La alta concentración de *Salmonella* de hasta 12.33 NMP/L en el dren Cedritos y la prevalencia de serotipos de esta bacteria, es un indicador de peligro inminente para el uso de esta agua en el sector agrícola.
3. Se encontraron más de dos serotipos previamente reportados en brotes epidemiológicos en los Estados Unidos de América con productos contaminados provenientes de México, además se identificaron dos serotipos de *Salmonella* que no habían sido reportados anteriormente en el estado de Sinaloa, ni en el territorio de México, evidenciando así la introducción de nuevos serotipos en el territorio mexicano.
4. Aunque las concentraciones de *Salmonella* denotadas en NMP/tomate son relativamente bajas, es suficiente para provocar la contaminación del tomate y probabilidad de riesgo en la aparición de un brote de Salmonelosis, evidenciando ante las entidades gubernamentales a cargo de la inocuidad alimentaria, así como a las autoridades que rigen estas normas, sobre los resultados encontrados en esta investigación.
5. Aunque los valores de probabilidad de infección resultaron bajos en la ingesta de tomate irrigados con agua de los tres drenes ($5x10^{-8}$ ) para fines de este estudio no sobrepasan los valores permisibles de la OMS, suponemos que en el peor de los casos un tomate ingerido antes del proceso de desinfección presenta una probabilidad de riesgo aún mayor que la propuesta por la OMS, ($3x10^{-3}$), además personas con diabetes, cáncer y otras enfermedades cronico-degenerativas pueden resultar más vulnerables a dosis bajas convirtiéndose en un alto riesgo.
6. Este trabajo sirve como herramienta de base para la elaboración de una evaluación de riesgo cuantitativa microbiana (QMRA) de tipo probabilístico, ya que en este estudio se realizó QMRA de tipo puntual o determinístico donde solo se estima la probabilidad de infección en base a supuestos cálculos propuestos por diversas ecuaciones ya citadas en la literatura y no como un estudio con datos previamente recopilados de la población o encuestas a las poblaciones expuestas, además de que sirve como estrategia de prevención que las dependencias de gobierno a cargo de la inocuidad de los alimentos pueden adoptar.

## 8. BIBLIOGRAFÍA


Ahmed, W., Vieritz, A., Goonetilleke, A., & Gardner, T. (2010). Health risk from the use of roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia, as potable or nonpotable water, determined using quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(22), 7382-7391.

Akmel, D. C., Aw, S., Montet, D., Assidjo, N., Degni, M. L., Akaki, D & Mens, F. (2017). Quantitative assessment of the microbiological risk associated with the consumption of attieke in Côte d'Ivoire. *Food control*, *81*, 65-73.

Andreoli, C.V., Pegorini, E.S., Fernandes, F., 2001. Disposição do lodo no solo. In: Andreoli, C.V., Sperling, M., Fernandes, F. (Eds.), Lodos de esgotos: tratamento disposição final. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental -UFMG, Companhia de Saneamento do Paraná, Belo Horizonte, pp. 319–397.

Atlas J, Ronald M, Richard B. Microbial ecology: fundamentals and applications. Redwood City: Cummings; 1993. pp 633- 688.

Avigliano, E., & Schenone, N. F. (2015). Human health risk assessment and environmental distribution of trace elements, glyphosate, fecal coliform and total coliform in Atlantic Rainforest mountain rivers (South America). *Microchemical Journal*, *122*, 149-158.

Bartz, J. A., Yuk, H. G., Mahovic, M. J., Warren, B. R., Sreedharan, A., & Schneider, K. R. (2015). Internalization of *Salmonella* enterica by tomato fruit. *Food Control*, *55*, 141-150.

Bell C y Kyriakides A. 2002. *Salmonella*. A practical approach to the organism and its control in foods. Practical Food Microbiology Series. Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom.

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

Besser, J. M. (2017). *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food microbiology*, *71*, 55-59.

Blaser, M. J., & Newman, L. S. (1982). A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Reviews of infectious diseases*, *4*(6), 1096-1106.

Boehm, A. B., Ashbolt, N. J., Colford, J. M., Dunbar, L. E., Fleming, L. E., Gold, M. A., ... & Soller, J. A. (2009). A sea change ahead for recreational water quality criteria. *Journal of Water and Health*, *7*(1), 9-20.

Brandl, M.T., 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. Annu. Rev. Physiol. 44, 367–392.

Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev 2004;68:560-602.

Bukhari, A. A. (2008). Investigation of the electro-coagulation treatment process for the removal of total suspended solids and turbidity from municipal wastewater. *Bioresource*

*technology*, *99*(5), 914-921.

Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J.F., Méndez-Reyes, E., López-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C.A. and Estrada-Garcia, T. 2012. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology* 156(2): 176-180.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Salmonella* Infections Linked to Hy-Vee Spring Pasta Salad - Final Update, 2018.

Chaidez, C., Lopez, J., Vidales, J., & Castro-Del Campo, N. (2007). Efficacy of chlorinated and ozonated water in reducing *Salmonella* typhimurium attached to tomato surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, *17*(4), 311-318.

Chang, A. S., & Schneider, K. R. (2012). Evaluation of overhead spray-applied sanitizers for the reduction of *Salmonella* on tomato surfaces. *Journal of food science*, *77*(1), M65-M69.

Chen, G. (2004). Electrochemical technologies in wastewater treatment. *Separation and purification Technology*, *38*(1), 11-41.

Cifuentes, E., Blumenthal, U., Ruiz, G., Bennett, S., & Peasey, A. (1994). Escenario epidemiológico del uso agrícola del agua residual: El Valle del Mezquital, México. *Salud pública de México*, *1*(1), 3-9.

Clarke, P. H. (1953). Hydrogen sulphide production by bacteria. *Microbiology*, *8*(3), 397-407.

Collins, R., & Rutherford, K. (2004). Modelling bacterial water quality in streams draining pastoral land. *Water Research*, *38*(3), 700-712.

Comisión Nacional del Agua, Estadísticas agrícolas de los distritos de riego, 2017

Connor, R. (2015). *The United Nations world water development report 2015: water for a sustainable world* (Vol. 1). UNESCO Publishing.

Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Chaidez, C., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., & Castro-del Campo, N. (2019). Los últimos 50 años de *Salmonella* en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista Bio Ciencias*, *6*, 26.

Corcoran, C. Nellemann, E. Baker, R. Bos, D. Osborn, H. Savelli (Eds), *Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development.* Norway: United Nations Environment Programme –UNEP. 85 p., 2010.

Cortez-Ortiz, I. A., Rodríguez, A. G., Moreno, E. E., Tenoria, J. J., Torres, M. B., & Montiel, V. E. (2002). Brote causado por *Escherichia coli* en chalco, México. *Salud pública de Mex*, *44*, 297-302.

Crane, B. S., & Moore, J. A. (1986). Modeling enteric bacterial die-off: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, *27*(3-4), 411-439.

Crum-Cianflone, N.F., 2008. Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. Current gastroenterology reports 10, 424-431.

De la Torre, E., Colello, R., Padola, N. L., Etcheverría, A., Rodríguez, E., Amanto, F., ... & Soraci, A. L. (2014). Detection of integrase gene in E. coli isolated from pigs at different stages of production system. *International journal of microbiology*, *2014*.

Decol, L. T., Casarin, L. S., Hessel, C. T., Batista, A. C. F., Allende, A., & Tondo, E. C. (2017). Microbial quality of irrigation water used in leafy green production in Southern Brazil and its relationship with produce safety. *Food microbiology*, *65*, 105-113.

Dennis, S. B., Buchanan, R. L., & Miller, A. J. (2002). Microbial risk assessment: Achievements and future challenges. *URL http://vm. cfsan. fda. gov/~ acrobat/qmrisk. pdf. Accessed*, *8*(31), 04.

Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2006). Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry science*, *85*(6), 960-973.

Erickson, M. C. (2012). Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annual review of food science and technology*, *3*, 283-310.

EU, 2007. Addressing the Challenge of Water Scarcity and Droughts in the European Union. European Union (EU), Brussels.

European Commission (EC), 2016. Guidelines on Integrating Water Reuse into Water

Planning and Management in the Context of the WFD. http://ec.europa.eu/environment/water/pdf/Guidelines_on_water_reuse.pdf.

Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella* enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, *26*(2), 308-341.

FAO-OMS. Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas/Organización Mundial de la Salud. Caracterización de peligros de patógenos en los alimentos y el agua: Directrices. Serie Evaluación de riesgos microbiológicos N-3 Ginebra, Suiza. 2003.

FDA, U.S. Food and Drug Administration (2003). Foodborne Pathogenic Microrganisms and Natural Toxins Handbook – *Salmonella* spp." [online] Available through Internet via http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html.

Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*, *379*(9835), 2489-2499.

Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. 2005. A study of the prevalence and enumeration of *Salmonella enterica* in cattle and on carcasses during processing. Journal of Food Protection. 68(6):1147-53.

Ferrer, A., Nguyen-Viet, H., & Zinsstag, J. (2012). Quantification of diarrhea risk related to wastewater contact in Thailand. *EcoHealth*, *9*(1), 49-59.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura, Panorama agroalimentario, tomate rojo, 2017.

Foley SL, Lynne AM y Nayak R. 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. Journal of Animal Sciences 86, E149-162.

Food and Drug Administration. (2013). The new FDA food safety modernization act (FSMA).

FSANZ, 2013. Agents of Foodborne Illness. 2nd ed, Food Standards Australia New Zealand, Canberra.

Gallegos-Robles, M.A., Morales-Loredo, A., Alvarez-Ojeda, G., Vega, P.A., Chew, M.Y., Velarde, S., et al. 2008. Identification of *Salmonella* serotypes isolated from cantaloupe and chile pepper production systems in Mexico by PCR restriction fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection* 71:2217-22.

Garcia-Gómez R, Chávez-Espinosa J, Mejía-Chávez A. and Durán De-Bazúa, C 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City, Mexico. Revista Latinoamericana de Microbiologia, 44:24-30.

Gerba CP, Rose JB, Haas CN. Sensitive populations: who is at the greatest risk? Int J Food Microbiol 1996; 30:113-23.

Griffin, D.W., Lipp, E.K., Mclaughlin, M.R., Rose, J.B., 2001. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. Bioscience 51, 817–825.

Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, *9*, 1-166.

Guo, X., Chen, J., Brackett, R. E., & Beuchat, L. R. (2002). Survival of *Salmonella* on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil. *Journal of food protection*, *65*(2), 274-279.

Haas, C. N., Rose, J. B., & Gerba, C. P. (1999). *Quantitative microbial risk assessment*. John Wiley & Sons.

Haas, C. N. (2002). Conditional dose-response relationships for microorganisms: Development and application. *Risk Analysis*, *22*(3), 455-463.

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F., 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2,

78–141.

Hawkey, P. M., Davies, A. J., Viant, A. C., Lush, C. J., & Mortensen, N. J. (1981). Contamination of endoscopes by *Salmonella* species. *Journal of Hospital Infection*, *2*, 373-376.

Henao-Herreño, L. X., López-Tamayo, A. M., Ramos-Bonilla, J. P., Haas, C. N., & Husserl, J. (2017). Risk of illness with *salmonella* due to consumption of raw unwashed vegetables irrigated with water from the bogota river. *Risk Analysis*, *37*(4), 733-743.

Hettiarachchi, H., & Ardakanian, R. (Eds.). (2017). *Uso seguro de aguas residuales en la agricultura: ejemplos de buenas prácticas*. United Nations University, Institute for Integrated Management of Material Fluxes and of Resources (UNU-FLORES).

Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. 2005. Microbiología médica. Ed. El manual moderno 18ª edición. México. Pp. 243-256.

Jiménez, B., Mazari, M., Domínguez, R., & Cifuentes, E. (2004). El agua en el Valle de México. *El agua en México vista desde la academia. Science Academy, Mexico*.

Jiménez, B., & Asano, T. (2008). Water reclamation and reuse around the world. *Water reuse: An international survey of current practice, issues and needs*, *20*, 3.

Krzyzanowski Jr, F., de Souza Lauretto, M., Nardocci, A. C., Sato, M. I. Z., & Razzolini, M. T. P. (2016). Assessing the probability of infection by *Salmonella* due to sewage sludge use in

agriculture under several exposure scenarios for crops and soil ingestion. *Science of the Total Environment*, *568*, 66-74.

LaBelle, R.R., Gerba, C.P., Goyal, S.M., Melnick, J.L., Cech, I., Bogdan, G.F., 1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. Applied and Experimental Microbiology 39, 588–596.

Lammerding, A. M. (1997). An overview of microbial food safety risk assessment. *Journal of Food Protection*, *60*(11), 1420-1425.

Lampel et al (2012) Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition

Lemarchand, K., & Lebaron, P. (2003). Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiology Letters*, *218*(1), 203-209.

Lerinche y Carpentier B. (1995). Viable but nonculturable *Salmonella* typhimurium in single-and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. *Journal of Food Protection*, *58*(11), 1186-1191.

Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., & Tandoi, V. (2012). *Salmonella* in surface and drinking water: occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, *45*(2), 587-602.

Liu, F., Li, Y., Su, X. L., Slavik, M. F., Ying, Y., & Wang, J. (2007). QCM immunosensor with nanoparticle amplification for detection of Escherichia coli O157: H7. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, *1*(4), 161-168.

Lynch MF, Tauxe RV y Hedberg CW. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. Epidemiology and Infection. 137:307-15.

Maier, R., Pepper, I., & Gerba, C. (2000). Environmental microbiology. Orlando, Florida:

Academic Press.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'brien, S. J., ... & International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness" Studies. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases*, *50*(6), 882-889.

Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J & Kirk, M. D. (2014). Global incidence of human Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne pathogens and disease*, *11*(6), 447-455.

Manios, S.G., Konstantinidis, N., Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., 2013. Dynamics of low (1 to 4 cells) vs high populations of Listeria monocytogenes and *Salmonella* Typhimurium in fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified extracts. Food Control 29 (2), 318–327.

Matthew A. Croxen, Robyn J. Law, Roland Scholz, Kristie M. Keeney, Marta Wlodarska y B. Brett Finlay (2013). «Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia* coli» [Avances recientes en el entendimiento de la *E. coli* enteropetógenica]. *Clinical Microbiology Reviews* (en inglés) (American Society for Microbiology, publicado el 1 de octubre de 2013) 26 (4): 822-880

Meehl, G. A., Stocker, T. F., Collins, W. D., Friedlingstein, P., Gaye, T., Gregory, J. M., ... & Raper, S. C. (2007). Global climate projections.

Morales-Hernández, L., Hernández-Anguiano, A.M., Cháidez Quiroz, C., Rendón-Sánchez, G and Suslow, T 2009. Detección de *Salmonella* spp. En melón *Cantaloupe* en unidades de producción y unidad de empaque. *Agricultura Técnica en México* 35: 135-145

Morisse, J. P., & Cotte, J. P. (1994). Evaluation of some risks factors in bovine salmonellosis. *Veterinary research*, *25*(2-3), 185-191.

Murray, C. J., Lopez, A. D., & World Health Organization. (1996). The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020: summary.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences.

Newell, K. W., McClarin, R., Murdock, C. R., MacDonald, W. N., & Hutchinson, H. L. (1959). Salmonellosis in Northern Ireland, with special reference to pigs and *salmonella*-contaminated pig meal. *Epidemiology & Infection*, *57*(1), 92-105.

Nicholson, F. A., Groves, S. J., & Chambers, B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource technology*, *96*(2), 135-143.

Ontiveros-Capurata, R. E., Diakite-Diakite, L., Álvarez-Sánchez, M. E., & Coras-Merino, P. M. (2013). Evaluación de aguas residuales de la ciudad de México utilizadas para riego. *Tecnología y ciencias del agua*, *4*(4), 127-140.

Organización de las Naciones Unidas (2015): *Agua para un mundo sostenible: Informe de las Naciones Unidas sobre los Recursos hídricos del mundo*. UNESCO.

Organización Mundial de la Salud; 1989. Directrices sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Ginebra: Organización Mundial de la Salud (Serie de informes técnicos 778).

Organización Mundial de la Salud (OMS) 2019. Food safety news. Página web: http://www.who.int/foodsafety/publications/newsletter/36en.pdf

Organización Mundial de la Salud (OMS), F. 2007. Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos; guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos.

Organización Mundial de la Salud para la Alimentación y la Agricultura (FAO), El futuro de la alimentación y la agricultura, tendencias alimentación y desafíos, 2017.

Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., & Griffin, P. M. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging infectious diseases*, *19*(3), 407.

Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, J. J., Koukoulakis, P., & Asano, T. (2010). Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—Review of some practices in Spain and Greece. *Agricultural Water Management*, *97*(9), 1233-1241.

Perron GG, Quessy S and Bell G (2008) A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. PLoS One 3, e3749.

Pinfold, J. V., Horan, N. J., Wirojanagud, W., & Mara, D. (1993). The bacteriological quality of rainjar water in rural northeast Thailand. *Water Research*, *27*(2), 297-302.

Plaut, R. (1984). Analisis de riesgo. Alcance y limitaciones para el administrador de salud.Rapid Alert System for Food and Feed annual report, *Salmonella* enterica ser. Gatineau (present /25g) and *Salmonella* enterica ser. Liverpool (present /25g) in organic rapeseed expeller from Italy, 2017.

Qadir, M., Sharma, B.R., Bruggeman, A., Choukr-Allah, R., Karajeh, F., 2007b. Nonconventional water resources and opportunities for water augmentation to achieve food security in water scarce countries. Agric. Water Manage. 87, 2–22.

Rapid Alert System for Food and Feed annual report (RASFF), *Salmonella* enterica ser. Gatineau (present /25g) and *Salmonella* enterica ser. Liverpool (present /25g) in organic rapeseed expeller from Italy, 2017.

Reddy, E. A., Shaw, A. V., & Crump, J. A. (2010). Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, *10*(6), 417-432.

Reder, K., Flörke, M., & Alcamo, J. (2015). Modeling historical fecal coliform loadings to large European rivers and resulting in-stream concentrations. *Environmental Modelling & Software*, *63*, 251-263.

Rosas, I., Báez, A. and Coutiño, M. 1984. Bacteriological quality of crops irrigated with wastedwater in the Xochimilco plots, Mexico City, Mexico, *Applied and Environmental Microbiology* 47: 1074-1079.

Rose, J. B., Haas, C. N., & Gerba, C. P. (1995). Linking microbiological criteria for foods with quantitative risk assessment. *Journal of food safety*, *15*(2), 121-132.

Scheierling, S. M., Bartone, C., Mara, D. D., & Drechsel, P. (2010). Improving wastewater use in agriculture: An emerging priority. *World Bank Policy Research Working Paper*, (5412).

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2017. Estadísticas Agrícolas de las Unidades de Riego ,Resumen Estatal por Ciclo y Cultivo, Sinaloa 2016-2017.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. NMX-003-SEMARNAT-1997 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para aguas residuales tratadas que son reusadas en servicios para el público (Establishing the maximum permissible limits of contaminants for treated wastewaters that are reused in services to the public). DOF 21/09/1988, México DF.

Secretaría de Salud (SSA), NMX-210-SSA1-2014, Productos y servicios. métodos de prueba microbiológicos. determinación de microorganismos indicadores. determinación de microorganismos patógenos, 2015.

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2018. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030.

Seiple, T. E., Coleman, A. M., & Skaggs, R. L. (2017). Municipal wastewater sludge as a sustainable bioresource in the United States. *Journal of environmental management*, *197*, 673-680.

Shuval, H., Lampert, Y., & Fattal, B. (1997). Development of a risk assessment approach for

evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Science and Technology*, *35*(11-12), 15-20.

Sidhu, J. P. S., Ahmed, W., Gernjak, W., Aryal, R., McCarthy, D., Palmer, A., ... & Toze, S. (2013). Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Science of the Total Environment*, *463*, 488-496.

Signor, R. S., & Ashbolt, N. J. (2009). Comparing probabilistic microbial risk assessments for drinking water against daily rather than annualised infection probability targets. *Journal of Water and Health*, *7*(4), 535-543.

Sivapalasingam, S., Barrett, E., Kimura, A., Van Duyne, S., De Witt, W., Ying, M., ... & Reddy, V. (2003). A multistate outbreak of *Salmonella* enterica Serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfestation technology. *Clinical Infectious Diseases*, *37*(12), 1585-1590.

Soller, J. A., Olivieri, A. W., Eisenberg, J. N., DeGeorge, J. F., Cooper, R. C., & Tchobanoglous, G. (2006). A public health evaluation of recreational water impairment. *Journal of water and health*, *4*(1), 1-19.

Stanchi O. 2007. Microbiología veterinaria. Ed. Interamericana. 1ª edición. Buenos Aires-Republica Argentina. Pp. 210-214.

Tanner, J. R., & Kingsley, R. A. (2018). Evolution of *Salmonella* within Hosts. *Trends in microbiology*.

Tauzene Afonso Matangue, M., Candian Ferreira, L., & Sánchez Ortiz, I. A. (2018). Quantitative microbial risk assessment for crops irrigated with wastewater from the WWTP of Ilha Solteira (SP). *Ingeniería y Desarrollo*, *36*(2), 359-377.

Teunis PFM, Evers EG, Slob W (1999). Analysis of variable fractions resulting from microbial counts. Quant Microbiol. 1:63–88.

Tennant, S. M., MacLennan, C. A., Simon, R., Martin, L. B., & Khan, M. I. (2016). Nontyphoidal *salmonella* disease: Current status of vaccine research and development. *Vaccine*, *34*(26), 2907-2910.

Terragno R, Caffer M, Bruna S, Binsztein N. 2003. Manual de procedimientos. *Salmonella*: Parte I. aislamiento, identificación y serotipificación. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Global Salm-Surv y CDC. Buenos Aires Argentina.

Tran, N. H., Gin, K. Y. H., & Ngo, H. H. (2015). Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Science of the total environment*, *538*, 38-57.

United States Environmental Protection Agency USEPA, Method 1200: Analytical Protocol for Non-Typhoidal *Salmonella* in Drinking Water and Surface Water, 2012.

Von Sperling, *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.* 3ª. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental –UFMG. 452 p., 2005.

Villafáfila, E., & Wyss, F. (2009). Riego en horticultura Guía para la instalación de pequeños sistemas de riego.

Wei, C. I., Huang, T. S., Kim, J. M., Lin, W. F., TAMPLlN, M. L., & Bartz, J. A. (1995). Growth and survival of *Salmonella* montevideo on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *Journal of food protection, 58*(8), 829-836.

Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J. P., & Godon, J. J. (2008). Behaviour of

pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. Water Research, 42, 53–62.

Westrell, T., Schönning, C., Stenströmy, T.A., Ashbolt, N.J., 2004. QMRA (quantitative microbial risk assessment) and HACCP (harzard analysis and critical control points) for management of pathogens in wastewater and sewage treatment and reuse. Water Sci. Technol. 50 (2), 23–30.

Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., et al. (2009).Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. Water Research, 43, 2209–2223.

Willshaw, G. A., Thirlwell, J., Jones, A. P., Parry, S., Salmon, R. L., & Hickey, M. (1994). Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Letters in Applied Microbiology, 19*(5), 304-307.

Winfield M y Groisman E. 2003. MINIREVIEW. Role of Nonhost Environments in the Lifestyle of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 69(7): 3687 – 3694.

World Health Organization, 2016. Quantitative microbial risk assessment: application for water safety management.

World Health Organization -WHO. *WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater.* Volume II: Wastewater use in agriculture. France: WHO, 222 p., 2006.

Xie, J. (2008). Addressing China's Water Scarcity: A Synthesis of Recommendations for Selected Water Resource Management Issues. The World Bank.

Xue, F., Tang, J., Dong, Z., Shen, D., Liu, H., Zhang, X., & Holden, N. M. (2018). Tempo-spatial controls of total coliform and E. coli contamination in a subtropical hilly agricultural catchment. *Agricultural Water Management, 200*, 10-18.

Yin, H. B., & Patel, J. (2018). Comparison of methods to determine the microbial quality of alternative irrigation waters. *Agricultural water management, 201*, 38-45.