

**UNIVERSIDAD METROPOLITANA
ESCUELA GRADUADA DE ASUNTOS AMBIENTALES
SAN JUAN, PUERTO RICO**

**EVALUACIÓN BACTERIANA EN VEGETALES DE HOJA VERDE PRODUCIDOS EN
HIDROPÓNICO Y SU POSIBLE RIESGO A LA SALUD HUMANA.**

Requisito parcial para la obtención del
Grado de Maestría en Ciencias en Gerencia Ambiental
en Evaluación y Manejo de Riesgo Ambiental

Por
Mario E. Díaz Rivera

2 de mayo del 2014

**EVALUACIÓN BACTERIANA EN VEGETALES DE HOJA VERDE PRODUCIDOS EN
HIDROPÓNICO Y SU POSIBLE RIESGO A LA SALUD HUMANA**

POR

MARIO E. DÍAZ RIVERA

TESIS SOMETIDA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GERENCIA AMBIENTAL
EN
EVALUACIÓN Y MANEJO DE RIESGO AMBIENTAL

UNIVERSIDAD METROPOLITANA
SAN JUAN, PUERTO RICO
2014

APROBADA POR:

KARLO MALAVÉ LLAMAS, MS
DIRECTOR DEL COMITÉ DE TESIS

CHRISTIAN VÉLEZ GERENA, MSEM
MIEMBRO DEL COMITÉ DE TESIS

BEATRIZ ZAYAS, Ph.D.
MIEMBRO DEL COMITÉ DE TESIS

MARÍA CALIXTA ORTIZ, MSEM, PH.D.,
DECANA

DÍA/MES/AÑO

DEDICATORIA

*A todas esas personas que de una forma u otra
contribuyeron para que esta meta se completara.
Gracias por el apoyo y las ayudas brindadas.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas esas personas que me brindaron su ayuda y apoyo durante este proceso tan difícil en el cual hoy día puedo decir que he salido adelante. Primero, deseo agradecer a mi comité de tesis por creer en mí y en este estudio, por brindarme su conocimiento y aportar sus ideas. A mis compañeros y amigos Vivianette Alicea, Gloria Mendoza y Jonathan Alfredo López. Al Dr. Juan C. Musa por haberme brindado su conocimiento y aportar sus ideas en forma de recomendaciones positivas para el proyecto al igual que a la Profa. María Calixta Ortiz. Además, a la Srta. Melanie De La Rosa, estudiante en entrenamiento de URGREAT-MBRS-RISE, a la Srta. Johannys Jiménez, estudiante voluntaria del Proyecto URGREAT-MBRS-RISE de la Escuela de Ciencias y Tecnología de la UNE, al Proyecto URGREAT-MBRS-RISE (#Grant 5R25-GM066250) de la Escuela de Ciencias y Tecnología de la Universidad del Este, por el uso del BIOLOG y del LaboratorioL104A y la Lourdes Febres por su magnífica ayuda.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I:INTRODUCCIÓN.....	1
Trasfondo del problema	1
Problema de estudio.....	2
Justificación del estudio.....	3
Preguntas de investigación.....	4
Meta	4
Objetivos.....	5
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Trasfondo histórico	6
Marco teórico.....	9
Riesgo Microbiológico.....	11
Estudios de casos	14
Marco legal	17
CAPÍTULO III:METODOLOGÍA.....	21
Introducción	21
Área de estudio	22
Objetivos.....	22
Descripción de la muestra.....	22
Periodo del estudio.....	23
Diseño metodológico	23
Colección, preservación, almacenamiento de la muestra.....	24
Prueba Bacteriológica.....	27
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
LITERATURA CITADA.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados obtenidos de CFU/mL en hojas de <i>Lactuca sativa</i> F1 y F2.....	53
Tabla 2. Porcentaje fermentación de subcultivos para F1 y F2.....	54
Tabla 3. Microorganismos aislados, por finca y medio de cultivo seleccionado.....	55
Tabla 4. Presencia de patógenos y su efecto adverso a la salud humana.....	56
Tabla 5. Patógenos identificados en el finca 1.....	57
Tabla 6. Patógenos identificados en el finca 2.....	58
Tabla7. Relevancia clínica porcentual de las cepas de microorganismos aislados.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. CFU/ mL de agua vs. hoja de lechuga <i>Lactuca sativa</i> finca 1.....	61
Figura 2. CFU/ mL agua vs. hoja de lechuga <i>Lactuca sativa</i> finca 2.....	62
Figura 3. CFU/ mL totales en el finca 1 vs finca 2.....	63
Figura 4. Finca 1, lechuga <i>Lactuca sativa</i>	64
Figura 5. Finca 2, lechuga <i>Lactuca sativa</i>	65
Figura 6. Muestra de hoja de lechuga <i>Lactuca sativa</i> finca 1 a 72 hr.....	66
Figura 7. Subcultivo 1 luego de 48 hr a 28°C.....	67

LISTA DE APÉNDICES

1. Resultados estadísticos.....	69
2. Carta al Departamento de Agricultura de Puerto Rico.....	72
3. Carta de autorización de muestreo finca 1.....	74
4. Carta de autorización de muestreo finca 2.....	75
5. Factura.....	76

LISTA DE SÍMBOLOS O ABREVIATURAS

Autoridad de Acueductos y Alcantarillados (AAA)

Codex Alimentarius (CAC)

Codex Committee on Food Hygiene (CCFH)

Colony Forming Unit (CFU)

Center of Diseases Control (CDC)

Clean Water Act (CWA)

Departamento de Recursos Naturales y Ambientales de Puerto Rico (DRNA)

Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)

Environmental Protection Agency (EPA)

Food and Agricultural Organization (FAO)

Foodborne Diseases (FBD)

Foodborne Disease Active Surveillance (FDAS)

Food and Drug Administration (FDA)

Food Safety Modernization Act (FSMA)

Good Manufacturing Practices (GMP's)

Good Agricultural Practices (GAP's)

Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)

Síndrome Urémico Hemolítico (HUS)

Inoculating Fluid (IF)

Junta de Calidad Ambiental (JCA)

Lactic Acid Bacteria (LAB)

Mannitol Salt Agar (MSA)

McConkey Agar (MC)

Microbial Risk Assessment (MRA)

Nivel Máximo de Contaminantes en el Agua Potable (MNMC)

Organización Mundial de Alimentos (OMA)

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Polyvinyl Chloride (PVC)

Safe Drinking Water Act (SDWA)

Too Numerous to Count (TNTC)

Tryptic Soy Agar (TSA)

Ultravioleta (UV)

Departamento de Agricultura Federal (USDA)

World Health Organization (WHO)

Water Quality Standards (WQS)

RESUMEN

La Organización Mundial de Alimentos (OMA) ha clasificado las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) como un problema general de salud pública, especialmente para los jóvenes, ancianos y grupos de riesgo con el sistema inmune comprometido. El consumo crudo de vegetales de hoja verde se ha asociado como factor de riesgo para enfermedades relacionadas con *Salmolella spp.* y *Escherichia coli O157: H7*. En este estudio se evaluó la presencia y el número de bacterias patógenas en *Lactuca sativa* producida en dos fincas hidropónicas en Puerto Rico. Se analizaron muestras de agua y hoja utilizando el método de filtración por membrana (Método EPA1600). Se realizó el cálculo de CFU/ml y la identificación de patógenos aislados. Todas las muestras de agua arrojaron valores <300, lo cual denominamos como TNTC (too numerous to count); En las muestras de hojas se obtuvo un 33 % TNTC. Los resultados de hojas externas fueron 67% TNTC en comparación con el 17% de las hojas externas/internas. Se identificaron 24 microorganismos en los tres medios de cultivo (MSA, TSA y MC). En conclusión, los resultados obtenidos por todas las muestras de agua (TNTC) refleja la mala calidad del agua, donde la *Lactuca sativa* crece. Además, el mayor contacto que la hoja de *Lactuca sativa* tenga con la fuente de agua, es mayor la probabilidad de albergar un patógeno. La presencia de *Salmolella spp.* y *Escherichia coli O157: H7* no se encontraron en ninguna muestra analizada. El patógeno más relevante relacionado con las ETA's fue *Enterococcus faecalis*. Dada la diversidad microbiana encontrada en este estudio, se propone la necesidad de un control sanitario más estricto para garantizar la calidad de los alimentos que se consumen a diario por nuestros ciudadanos.

ABSTRACT

The Food World Organization has categorized the foodborne diseases (FBD) as a general public health problem especially for the young, elderly and immunocompromised risk-groups. Raw leafy green vegetables consumption has been associated as a risk factor for *Salmonella spp.* and *Escherichia coli O157:H7* related diseases. We evaluated the presence and number of pathogenic bacteria in the green leafy vegetable (*Lactuca sativa*) produced in two hydroponic systems farms in Puerto Rico. We analyzed water and leaf samples utilizing membrane filtration (EPA 1600 method). CFU/ml and pathogen identification were made. All water samples were TNTC while leaf samples were 33%. Results from external leafs were 67% TNTC compared to 17% for external/internal leafs. We identified 24 microorganisms in the three culture media (MSA, TSA and MC). In conclusion, results obtained for all the water samples (TNTC) reflects the poor water quality where the *Lactuca sativa* grows. Also, the greater contact the leaf of the *Lactuca sativa* has with the water source, the greater probability to host a pathogen. The presence of *Salmonella spp.* and *Escherichia coli O157:H7* were not found in any sample tested. The most relevant pathogen found related to the FBD was *Enterococcus faecalis*. Given the microbial diversity found in this study, we propose the need for more strict sanitary control to ensure the quality of food that is consumed daily by our citizens.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Trasfondo del problema

Durante los últimos años la contaminación biótica ha sido tema de discusión en la comunidad científica alrededor del mundo (Havelaar et al., 2010). Este acontecimiento ha llevado a que se realicen distintas investigaciones para estudiar el riesgo biológico y las consecuencias a la salud humana. Los patógenos bacterianos asociados con los alimentos han sido muy bien descritos por la Administración de Drogas y Alimentos Federal (FDA por sus siglas en inglés). Un amplio número de estas bacterias se han visto implicadas en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados con el consumo de vegetales frescos (Rivera, Rodríguez, & López, 2009; Havelaar et al., 2010; Van Ha et al., 2008; Temiz, Bagci, & Togay, 2011).

El consumo de vegetales es visto como un factor de riesgo de infección con enteropatógenos como los son *Salmonella spp.* y *Escherichia coli O157:H7*; según recientes brotes vinculados por la ingesta de estos productos (Abadías, Usall, Anguera, Solsona, & Viñas, 2008; Vandamm, Li, Harris, Schaffner, & Danyluk, 2013; Havelaar et al., 2010; Callejas et al., 2011; De Giusti et al., 2010; Zhang et al., 2009). Esta situación ha provocado que se comience a realizar investigaciones más profundas referentes al tema, identificando ciertos factores que contribuyen a la contaminación microbiana de estos alimentos.

Estudios previos responsabilizan de la contaminación microbiana, en gran medida a la calidad del agua con el cual se riega, fertilizantes orgánicos, prácticas de pre cosecha y pos cosecha, (Emin & Vural, 2008; Settanni, Miceli, Francesca, Cruciata, & Moschetti, 2013; Rivera

et al., 2009; Palese et al., 2009); siendo estos puntos los de mayor enfoque para poder realizar mejores mecanismos de higiene y limpieza a los alimentos consumidos. La observación del estado higiénico de aguas y alimentos se lleva a cabo mediante la detección de bacterias de origen fecal como *Escherichia coli*, que normalmente son encontradas en el intestino humano o animales endotérmicos homeotérmicos, lo que las convierte en el indicador aceptado de la presencia de microorganismos entéricos patógenos Ofor et al. (2009), como los causantes del cólera, fiebre tifoidea, shigelosis, amebiasis y hepatitis; algunos de estos con capacidad de sobrevivir por largos períodos en las hortalizas frescas y de sobrevivir a procesos de desinfección e incluso de multiplicarse durante el almacenamiento (Rivera et al., 2009; Ofor et al., 2009).

Problema de estudio

El consumo crudo de vegetales de hoja verde es un factor de riesgo de infección con enteropatógenos como lo pueden ser *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* entre otros (Warner, Rothwell, & Keevil, 2008; Beuchat, 1996; Brandl & Amundson, 2008). Estas bacterias pueden llegar a causar serios problemas de salud a la población conocida como las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's), (Barrantes & Achí, 2011). Las ETA's han sido catalogadas por la Organización Mundial de Alimentos (OMA) como un problema de salud pública (Barrantes & Achí, 2011). Según Newell et al. (2010) se le atribuyó alrededor de 1.8 millones de muertes alrededor del mundo para el 2005 por la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*.

A *Escherichia coli* se le atribuye en el 2006 la dispersión de un brote que afectó a 26 estados de la nación americana, el cual tuvo como resultado un total de 200 casos reportados, de los cuales 183 estaba vinculados a contaminación por dicha bacteria (Abadías et al., 2008; Brandl, 2008).

Por su parte, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* han sido asociadas con brotes de shigelosis en lechuga (*Lactuca sativa*), perejil (*Petroselinum crispum*) y cebollas (*Allium cepa* y *Allium fistulosum*). Salmonelosis en tomates (*Lycopersicon esculentum*), sandía (*Citrullus lanatus*) y melón (*Cucumis melo*) (Beuchat, 1996). Espinacas (*Spinacia oleracea*), tubérculos, albahaca (*Ocimum basilicum*) y el cilantro (*Coriandrum sativum*) han sido otros a los cuales se les atribuye con ETA's. Hoy día la mayoría de estos productos se cultivan mediante mecanismos agrícolas alternos como los hidropónicos. Estos sistemas de cultivos son excelentes recursos para la rápida producción, pero a su vez existe poca información sobre la calidad microbiológica de los productos cosechados.

Justificación del estudio

Los vegetales de hoja verde proveen numerosos beneficios para la salud del ser humano; estos son la relación directa entre su consumo y la reducción de enfermedades crónicas como la hipertensión, diabetes, aterosclerosis hasta el cáncer. Además, no tan solo reduce el riesgo de enfermedades que son perjudicial para el ser humano, además su consumo es valioso para su vitalidad ya que disponen de innumerables propiedades alimenticias, siendo una extraordinaria fuente de antioxidantes, micronutrientes, vitaminas y fibra para la dieta humana. Pero a su vez, su consumo crudo muestra un mayor riesgo de transmitir enfermedades causadas por bacterias patógenas, pues no existe una etapa que logre eliminar la mayoría de la carga microbiana presente antes de comercializarlos (Barrantes & Achí, 2011; Heaton & Jones, 2007; Emin & Vural, 2008; Bordini, Asturiano, Jakabi, & Gelli, 2007). El no tener suficiente información que pueda evidenciar la presencia de bacterias patógenas en los alimentos producidos en sistema de hidropónicos en la isla nos lleva a realizar este estudio de calidad microbiológica. Esta evaluación nos ayudaría a

crear métodos y alternativas innovadoras de manejo de riesgo, minimizando los riesgos a la salud de la población y garantizando la calidad de los productos comercializados.

Preguntas de investigación

¿Existen bacterias patogénicas en los vegetales de hoja verde producidos en sistemas hidropónicos en Puerto Rico o en el agua con el cual se riegan? De existir estas bacterias; ¿Están en un número suficiente para causar enfermedad en la población consumidora promedio de estos vegetales?

Meta

Analizar el tipo y número de bacteria presente en la lechuga *Lactuca sativa* en Puerto Rico, así como la calidad microbiológica en el agua en la cual crece, logrando de esta manera estudiar los posibles riesgos a la salud al consumir vegetales de hoja verde producidos en hidropónico en Puerto Rico y recomendar alternativas de manejo de riesgo para el beneficio de la población.

Objetivos

- Evaluar la presencia de bacterias patogénicas en lechuga *Lactuca sativa* producida en Puerto Rico para poder realizar una especiación de los patógenos presentes en las zonas Sur y Central este de la isla.
- Identificar el riesgo que causaría en la salud de la isla para recomendar alternativas en el manejo de riesgo.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

Trasfondo histórico

La diferencia en perfiles microbiológicos de varios vegetales se le atribuye gran parte a factores no relacionados como lo son la microflora residente del suelo, composta animal, desperdicios, irrigación de agua, trasportación y el manejo de los alimentos (Eni, Oluwawemitan, & Oranusi, 2010). La presencia de la microbiota natural, particularmente de la Bacteria de Ácido Láctico, (LAB por sus siglas en inglés), es muy importante para el control de los patógenos en la superficie de los vegetales (Trias, Bañeras, Montesinos, & Badosa, 2010; Lima, São José, Andrade, Pires, & Ferreira, 2013). Los vegetales verdes como la lechuga son incluidos en nuestra dieta a diario ya sean crudos o hervidos o con otros productos alimenticios. En su totalidad los vegetales son consumidos frescos y algunos de ellos son utilizados en ensaladas mixtas siendo de esta manera peligrosos si no se exponen al menos a algún proceso termal o a una desinfección por radiación ultravioleta (UV) (Emin & Vural, 2008). La lechuga (*Lactuca sativa*), espinacas (*Spinacia oleracea*), apio (*Apium graveolens*), perejil (*Petroselinum crispum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) entre otros son los responsables de producir el 30% de brotes relacionados a bacterias en E.U. (Puerta-Gómez, Kim, Moreira, Klutke, & Castell-Pérez, 2013).

El consumir diariamente una buena porción de vegetales de hoja verde nos beneficia considerablemente a reducir enfermedades crónicas que afectan a muchas poblaciones alrededor del mundo (Gomes et al., 2012). No tan solo reduce el riesgo de enfermedades que son perjudiciales, sino que además su ingesta es valiosa para la vitalidad ya que disponen de innumerables propiedades alimenticias, siendo una extraordinaria fuente de antioxidantes,

micronutrientes, vitaminas y fibra para la dieta humana (Berger et al., 2010; Luna et al., 2012). Los alimentos de ingesta cruda presentan un mayor riesgo para la transmisión de microorganismos patógenos, debido a que no existe una etapa de pre consumo que pueda eliminar las cargas microbianas iniciales (Newell et al., 2010; Luna et al., 2012; Sivapalasingam, Friedman, Cohen, & Tauxe, 2004). *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus* sobresalen como los patógenos más comunes reportados por la ingesta de estos alimentos (Gomes et al., 2012).

Muchos patógenos se pueden encontrar en suelo, estiércol, desperdicios urbanos y en la irrigación de agua, depende de la humedad relativa, la adhesión microbiana, y por episodios de lluvia y sol (Emin & Vural, 2008). Por otra parte, La infección por *E. coli 0157:H7* se puede contraer de varias formas, pero todas ellas logran causar serios problemas a la salud que van desde diarreas, colitis hemorrágica hasta la muerte (Settanni et al., 2013). También, *Escherichia coli 0157:H7* ha sido asociada en múltiples brotes enlazados al consumo de productos de hoja verde enteros o recién cortados según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), siendo el causante de múltiples enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), además de constituir un problema de salud pública (CDC, 2007).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un gasto económico fundamental, que logra afectar a individuos, familias, industrias, sistemas de salud hasta comunidades enteras, afectando a su vez al turismo y al comercio interno (Barrantes & Achí, 2011). A su vez, se debe tener presente que la poblaciones más propensas o más susceptibles a la infección por bacterias patógenas se encuentran: niños, personas de mayor edad, mujeres embarazadas y personas con deficiencia en su sistema inmunológico (Emin & Vural, 2008). Muchas de estas enfermedades asociadas al consumo de productos frescos ha tenido un alarmante incremento en las últimas

décadas (Ofor et al., 2009; Emin & Vural, 2008). Un buen ejemplo de este planteamiento podría ser el que se brindó en la Conferencia Regional FAO/OMS sobre inocuidad de alimentos para las Américas y el Caribe en donde se menciona que durante 2004 al 2005 se reportaron 3,645 rechazos de alimentos que provenían de América Latina y el Caribe con mercado en Estados Unidos, logrando un 77% de alimentos rechazado por inocuidad o contaminación microbiana según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), (FAO, 2005).

El cultivo de vegetales de hoja verde es realizado mediante sistemas tradicionales e hidropónicos. El método tradicional es caracterizado por el cultivo del vegetal en el suelo con el uso de fertilizantes y pesticidas que son en su mayoría de naturaleza química. Por su parte, el método hidropónico se caracteriza por el cultivo de las plantas en tubos plásticos en los cuales contienen soluciones con nutrientes disueltos y fertilizantes químicos (Gomes et al., 2012). En este sistema, los vegetales permanecen protegidos por factores adversos como lo pueden ser la lluvia, vientos que incrementan su productividad.

Por tal razón, se dice que la agricultura hidropónica ha emergido como una alternativa de agricultura altamente productiva y eficaz. Evitando de esta manera el uso y contacto de fertilizantes y pesticidas de origen químico (Gomes et al., 2012). Aunque no le resta a que pueda contener en sus productos agentes patógenos que puedan contrarrestar su buen funcionamiento. Por ende, la sanidad y la prevención se han convertido en las herramientas más importantes para mantener la calidad y seguridad microbiana en productos frescos consumidos. En respuesta a los brotes transmitidos por alimentos los cuales están asociados al consumo de vegetales frescos en Estados Unidos la Food and Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés), dio a conocer su guía para reducir al mínimo los peligros microbiológicos de seguridad alimentaria de frutas y hortalizas

frescas cortadas, mejor conocida como “Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh cut fruits and vegetables” Callejas et al. (2011), en las cuales se identificó la preocupación y provee recomendaciones para las buenas prácticas de seguridad de alimentos para minimizar los danos microbiológicos asociados al consumo de vegetales frescos consumidos (Settanni et al., 2013).

Marco teórico

Los vegetales frescos siempre han sido catalogados como esenciales componentes para la dieta humana y en ocasiones se han asociado a sin número de beneficios para la salud nutricional de quien los consume (Gomes et al., 2012; Berger et al., 2010; Eni et al., 2010; Maffei, Silveira, & Catanozi, 2013). A su vez se ha conocido que sirven como transporte para enfermedades (VanHa et al., 2008). Han sido muchos los patógenos que han causado enfermedades serias a la población por la ingesta de alimentos, pero se han asociado más cuando el consumo de estos ha sido crudo. Por tal razón estos patógenos transmitidos por alimentos como lo son las bacterias, parásitos y virus han sido catalogados como un peligro biológico (Ofor et al., 2009).

Según Eni et al. (2010); Horby et al. (2003), exponen que a pesar de sus beneficios, durante los últimos años se ha observado un incremento de infecciones en humanos por el consumo de frutas y vegetales contaminados con patógenos de los cuales sobresalen *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* a quienes se le han asociado con sin números de brotes en Estados Unidos, Costa Rica, Europa entre otros países (Barrantes & Achí, 2011; Ofor et al., 2009; Heaton & Jones, 2007; Abadías et al., 2008; Emin & Vural, 2008; Brandl, & Amundson, 2008; Sivapalasingam et al., 2004). Según la FDA el género *Salmonella* se divide en dos especies que pueden causar enfermedades en los seres humanos: *S. enterica*, *S. bongori* y por su ingesta puede causar dos tipos

de condiciones como lo es la enfermedad gastrointestinal y la fiebre tifoidea. La primera puede provocar desde náuseas, vómitos, diarrea, calambres y fiebre, con síntomas generalmente duran un par de días y disminuyendo en una semana (Barrantes & Achí, 2011). En las personas sanas, los síntomas por lo general desaparecen por sí solos, pero a largo plazo puede desarrollar artritis.

Por su parte la fiebre tifoidea, causa fiebre alta, diarrea o estreñimiento, dolor, dolor de cabeza y letargo. Es una enfermedad muy grave, hasta el 10% de las personas que no reciben tratamiento pueden morir. Hay muchos tipos de alimentos que pueden contaminarse con el primer tipo, desde carnes y huevos hasta las frutas y verduras (Berger et al., 2010; Heaton & Jones, 2007; Puerta-Gómez et al., 2013; Maffei et al., 2012; Mercanoglu & Halkman, 2011). La enfermedad tifoidea usualmente se asocia con aguas residuales contaminadas con agua potable, o de los cultivos regados con aguas residuales contaminadas (FDA, 2012).

Escherichia coli es una de las especies predominantes en el intestino humano como parte de la flora intestinal normal. Ha sido dividida en seis categorías o especies que pueden causar enfermedades moderadas hasta enfermedades sistémicas severas. Los vegetales de hoja verde son los más asociados a la contaminación por *E. coli*, específicamente *E. coli* 0157: H7, (Heaton & Jones, 2007; Brandl & Amundson, 2008). Los síntomas suelen ser leves, pero algunas veces son graves, que dura semanas o meses. En los casos más severos, puede causar diarrea acuosa (FDA, 2012).

Se ha encontrado que el método de cultivo hidropónico es una buena alternativa y que se define como el cultivo de plantas sin tener la necesidad del suelo (Mugundhan, Soundaria, Maheswari, Santhakumari, & Gopal, 2011). Esta técnica podría ser adaptada en la mayoría de las plantas terrestres, siendo los vegetales de hoja verde, tomates, frutas y tubérculos como los más cultivados (Mugundhan et al., 2011). La importancia de realizar esta serie de estudios en este método de cultivo tan innovador, es que en la isla no se ha realizado un estudio de esta índole. Este método se caracteriza por cultivar

las plantas en tubos plásticos (PVC) que contienen una solución con nutrientes disueltos y en ocasiones pueden llegar a tener fertilizantes químicos para su crecimiento (Gomes et al., 2012). En este sistema los vegetales siempre permanecen protegidos con capas enormes de plástico ya que factores ambientales adversos como la lluvia, sol, y el viento pueden llegar a interferir con su crecimiento y pueden llegar a ser los causantes de contaminación del producto (Gomes et al., 2012). Tiene como desventaja que su medio de cultivo principal es el agua. Este recurso de vital importancia para todo ser vivo puede ser el principal causante de la contaminación de los vegetales cultivados en hidropónico. Según estudios, la calidad del recurso puede afectar el periodo de cultivo y cosecha (Emin & Vural, 2008; Ofor et al., 2009; Ijabadeniyi, Debusho, Vanderlinde, & Buys, 2011). Esto dependería de donde provenga el agua y que no tengan contacto con heces humanas o de animales.

Riesgo Microbiológico

Como se ha mencionado anteriormente los vegetales son fundamentales para la salud y bienestar de todos los consumidores (Gomes et al., 2011). Estos prefieren comprar y llevar a su hogar alimentos agrícolas más frescos, sin embargo, durante los últimos años se ha detectado un incremento de enfermedades transmitidas por vegetales tanto importados como producidos en el país. Existen enfermedades crónicas que están siendo preocupantes tanto en los Estados Unidos como en Puerto Rico, entre las que se destacan: la enfermedad coronaria y algunos tipos de cáncer perjudicando la salud del consumidor. Excesos o desequilibrios dietéticos han sido las posibles causas de estas enfermedades crónicas. Si bien es el caso que los excesos y desequilibrios dietéticos son las posibles causas, actualmente los profesionales de la salud sugieren que se deba ingerir una menor cantidad de grasas, como lo pueden ser las saturadas y por ende el colesterol. Además, el paciente debe mantener un nivel de peso adecuado, e ingerir mayor cantidad de frutas y hortalizas, al menos cinco o más

porciones diarias (FAO, 1998). Si es beneficioso su consumo, también está ampliamente probado, que son el canal directo de obtener una enfermedad transmitida por alimentos (FAO, 1998; Barrantes & Achí, 2011; Heaton & Jones, 2007; Ofor et al., 2009; CDC, 2013; CDC, 2008; Berger et al., 2010; Eni et al., 2010). La presencia de *E. coli* O157:H7 ha sido un denominador común en conjunto con *Salmonella spp.*, como los principales patógenos asociados a enfermedades y brotes alrededor del mundo. En su mayoría *Salmonella spp.*, se le asocia presente en vegetales de hoja verde, en mucho de los casos en lechugas lo cual alega malas prácticas agrícolas y de manufactura (Emin et al., 2010). Según la Food and Agricultural Organization, tomando en consideración la diversidad de productos y prácticas agrícolas, hay que proceder a adaptar medidas que recomienden a operaciones específicas, para que sean lo más efectivamente posible en reducir la contaminación microbiológica (FAO, 1998). Para ello FAO ha creado una guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos específicamente en frutas y vegetales, con el propósito de reducir el riesgo y no en su eliminación. Como principio básico exige el uso de las recomendaciones generales brindadas para poder desarrollar unas buenas prácticas agrícolas y directivas apropiadas para las actividades llevadas a cabo.

Esta guía recomienda que para poder reducir al mínimo el riesgo microbiológico, los agricultores, empacadores o transportistas deben utilizar y llevar a cabo buenas prácticas agrícolas (GAPs) y de manufactura (GMPs) en todas las áreas en donde tengan cierto control de las actividades llevadas a cabo (FAO, 1998). Como en mucha de la literatura se expone que el agua como recurso principal es la mayor fuente de contaminación de los vegetales en su etapa de crecimiento (FDA, 2005; Gomes et al., 2012; Emin & Vural, 2008; Ofor et al., 2009; Ijabadeniyi et al., 2011). Por tal razón es de suma importancia que la higiene y las buenas prácticas sanitarias se lleven a cabo durante todo el periodo de producción, recolección, selección, empaque y transporte para de esta manera poder reducir lo más posible el riesgo de contaminación microbiológica en los vegetales frescos. También se

debe cumplir con todos los reglamentos y leyes estatales y federales correspondientes a las prácticas agrícolas. Es de suma importancia saber que para que el programa de inocuidad alimentaria brinde excelentes resultados debe existir una responsabilidad adecuada en todo el proceso de producción esto implica que esta guía se debe cumplir al pie de la letra tanto en el campo hasta en el transporte. También es muy importante tener un personal totalmente preparado con un control de calidad que asegure que todos los principios de esta guía funcionen tal y como corresponden (FAO, 1998).

Según de Quadros Rodrigues et al., 2014; FAO, 1998 el agua como recurso principal en la agricultura y principal ruta de contaminación puede transmitir muchos microorganismos, como las variedades patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* así como parásitos tales como *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis* y *Toxoplasma gondii* hasta virus de Norwalk y hepatitis A. En la mayoría de los casos el poder identificar una posible fuente de contaminación microbiológica en vegetales resulta un poco difícil el identificar el mismo, por ende, es de suma importancia realizar muestreos constantes en los cuerpos de agua utilizados para la cosecha. Debemos saber que cuando el agua entra en contacto con los vegetales frescos, existe una posibilidad mayor de contaminación por patógenos, pero esto dependerá en su mayoría de la calidad del recurso. Además del agua pueden existir otros factores adversos al recurso, como el estado del cultivo y el tipo de vegetal, el tiempo que transcurre entre el contacto y la cosecha, y la forma en que se trabajan los vegetales una vez han sido recolectadas (FAO,1998). La Organización de Comida y Alimentos menciona que la calidad del agua debe ser apropiada para el uso que se vaya a hacer de ella. Cuando se desconozca la calidad del agua o no pueda controlarse dicha calidad, los agricultores deben seguir buenas prácticas agrícolas para reducir en lo posible el riesgo de contaminación (FAO, 1998). Por otro lado, exponen unas consideraciones generales que deben llevarse a cabo para poder mantener una sanidad e higiene completa en los respectivos campos agrícolas para su mejor funcionamiento y por ende mejor calidad

de sus productos. Es importante determinar fuentes posibles y la distribución del agua utilizada teniendo en mente la posibilidad de que esta pueda representar una fuente de microorganismos patógenos. De estar en un área muy poblada se debe tener en consideración que el mantenimiento de pozos este en buenas condiciones, ya que mucho de ellos han sido construidos alrededor de 30 o 40 años, lo que puede darnos una justificación de la posible contaminación por coliformes fecales en el agua dado el mantenimiento que tengan los mismos. Otra consideración que debe tener los agricultores es estar en constante revisión de las prácticas y condiciones existentes para detectar posibles fuentes de contaminación, esto significa que todo agricultor debe actualizarse con todas las practicas modernas y de ser posible llevarlas a cabo en todo su contexto, esto mediante el uso de pruebas caseras y científicas que monitoreen la calidad de sus productos y del agua. Además, verificar si cercano a estos terrenos existe la posibilidad de que hayan cuerpos de aguas adyacentes y accesibles a las prácticas como la ganadería, caballerizas, industrias entre otras prácticas que pueden ser fuentes de contaminación. Debemos considerar prácticas que ayuden a proteger la calidad del agua. Esto puede ser posible si se cumplen con las consideraciones expuestas por FAO (FAO, 1998).

Estudios de casos

Durante los últimos años la contaminación por ETA's, específicamente de vegetales de hoja verde ha causado muchos problemas a nivel mundial. En abril del 2007, hubo dos recogidos de lechuga en Europa después de haberse encontrado contaminación con Salmonella en los productos comercializados (Lima et al., 2012). Durante el 2010, fue el apio (*Apium graveolens*) el

causante de un brote en la nación americana. Este vegetal fue utilizado como ingrediente en ensaladas de pollo en un hospital, teniendo como consecuencia la confirmación de 10 casos y 5 muertes en pacientes con el sistema inmune comprometido (Vandamm et al., 2013).

A *Escherichia coli* se le atribuye en el 2006 la dispersión de un brote que afectó a 26 estados de la nación americana, el cual tuvo como resultado un total de 200 casos reportados, de los cuales 183 estaba vinculados a contaminación por dicha bacteria (Abadías et al., 2008; Calvin, 2007). Por otra parte, se han reportado casos de *Shigella* y *Salmonella* en la nación americana durante 1996-2006 (CDC, 2007). La presencia de *Shigella* fue asociada al consumo de lechuga (*Lactuca sativa*), perejil (*Petroselinum crispum*), cebolla (*Allium cepa* y *Allium fistulosum*); mientras que *Salmonella* fue mediante tomate (*Lycopersicon esculentum*), col de Bruselas (*Brassica oleracea*), Sandía (*Citrullus lanatus*) y melón (*Cucumis melo*) (CDC, 2007).

También, para el periodo entre 2005-2006 se reportaron al menos 4 brotes por consumo de tomate (*Lycopersicon esculentum*), confirmándose 459 casos por *Salmonella*, ya para el 2006 fueron 121 los brotes causados por *Salmonella* con 3,300 casos confirmados (CDC, 2007). En Europa, la presencia de salmonella en vegetales frescos fue responsable de al menos el 87% de brotes registrados por ETA's (D'Aoust, 1994). Por su parte, en Costa Rica, se registraron alrededor de 23 brotes durante el 2005 por diarrea siendo *Shigella* y *Salmonella* la causa principal. Ya en el 2006, fueron reportados al menos 1,267 casos por la presencia de *Shigella* siendo la causa principal con un 33.4% (423 casos) por encima de *Salmonella* que se le atribuyó un total de 66 casos para un 5.2% (Barrantes & Achí, 2011). Estos sucesos son algunos de muchos eventos que ocurren por la presencia de bacterias patogénicas en vegetales y que por consiguiente tienen un efecto adverso a la salud humana. Por tal razón, las enfermedades transmitidas por alimentos se le atribuyeron

alrededor de 1.8 millones de muertes alrededor del mundo para el 2005 por la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* (Newell et al., 2010).

Según La Vigilancia Activa de Enfermedades de transmisión alimentaria, (Foodborne Disease Active Surveillance) (por sus siglas en inglés FDAS) para el 2012 se identificaron alrededor de 19,531 casos confirmados por infección con patógenos. De estos sobresalen *Campylobacter*, *Listeria* y *Salmonella* con el mayor número de infecciones, 6,793 casos causados por *Campylobacter* ,121 por *Listeria* y 7,800 por *Salmonella*. De estas tres *Salmonella* fue la causante de alrededor de 33 muertes (CDC, 2013). No obstante, ha habido una serie de brotes recientes que han perjudicado a algunos de los estados de la nación americana considerablemente. En octubre 11 del 2012 se reportó un brote de *Salmonella* por la ingesta de mangos (*Tommy Atkins*) en el cual 127 personas fueron infectadas con el brote en 15 estados de la nación (CDC, 2013).

Por otra parte, durante septiembre 20 del 2012, el FDA en conjunto con el CDC realizó una investigación sobre un brote que recorrió varios estados de Estados Unidos perjudicando a muchos ciudadanos. El brote por la ingesta del melón cantaloupe (*Cucumis melo*) se esparció alrededor de 24 estados de la nación americana dejando al menos 94 personas hospitalizadas y tres muertes en el estado de Kentucky (CDC, 2013). Recientemente como en diciembre del 2012, se notificó que un brote causado por la presencia de *E. coli* 0157:H7 asociado al consumo de espinacas orgánicas (*Spinacia oleracea*) había concluido, dejando al menos un total de 33 personas infectadas en 5 estados de Estados Unidos. De estas solo 13 fueron hospitalizadas por el Síndrome Urémico Hemolítico (HUS) por sus siglas en inglés. Solo dos de estas 33 personas tuvieron daño renal. Por último, tan reciente como en abril 6 del 2013 se reportó lo que sería el brote más reciente ocurrido en los Estados Unidos. Un total de 73 personas fueron infectadas por un brote asociado al consumo de pepinillos (*Cucumis sativus*) contaminados con *Salmonella*. Este brote se esparció

al menos en 18 estados de la nación dejando hospitalizadas al menos unas 14 personas (CDC, 2013).

Marco legal

El cultivo en hidropónicos no tan solo debe cumplir con los requerimientos de infraestructura que se exigen tanto por el Departamento de Agricultura Federal (USDA, por sus siglas en inglés), y el Departamento de Agricultura Local. Además, se debe llevar a cabo unas medidas sumamente estrictas de higiene y seguridad en sus productos como también, debe cumplir con ciertas leyes y reglamentos vigentes para su buen funcionamiento.

El Acta de Agua Limpia (CWA) es una ley federal que se enfoca en mantener los cuerpos de aguas en óptimas condiciones. Esta reglamentación establece la ilegalidad de las descargas de contaminantes a los cuerpos de agua, regulando estas descargas en cuerpos de aguas navegables nacionales e internacionales. Además, se clasifica los contaminantes entre biológicos y químicos. Tiene como objetivo disminuir el descarte de sustancias químicas y/o biológicas en el agua que puedan ser tóxicas al ser humano. También, establece cumplir con las normas necesarias para la recreación humana el buen estado de las aguas superficiales (EPA, 1972).

Estándares de calidad de agua, (WQS), los Wáter Quality Standard por sus siglas en inglés, traduce las metas establecidas por el CWA en objetivos más claros para los cuerpos de agua. Estos deben expresarse en términos que puedan permitir realizar una medición cuantificable. Los WQS deben aplicarse solamente a las aguas de Estados Unidos y sus territorios ya que como se menciona en el CWA esto incluye solamente aguas superficiales, como los ríos, arroyos, quebradas, lagos, estuarios, aguas costeras y humedales. Sus criterios son descripciones numéricas de las

condiciones que debe tener todo cuerpo de agua antes mencionado. Estos pueden temperatura, pH, turbidez, toxicidad entre otras medidas cuantitativas.

La Ley de Agua Potable Segura (SDWA, por sus siglas en inglés) según enmendada en agosto del 1996, otorga a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), la autoridad para establecer estándares de agua potable. Estos estándares son regulaciones establecidas por la EPA para poder tener control de los niveles de los contaminantes en las aguas denominadas como potables. Estos procesos denominados anteriormente como estándares pueden incluir un análisis y protección de las fuentes de agua, protección de pozos y sistemas de captación, tratamiento por medio de operadores capaces y certificados, control de los sistemas de distribución y brindarle al consumidor sobre la calidad del agua que ingieren. En la misma se establece la protección y regulación de contaminantes presentes en agua potable por medio de parámetros de seguridad y los niveles máximos de contaminación para ciertos contaminantes en los cuerpos de agua (EPA, 2000).

Al igual que existen regulaciones vigentes para la conservación y protección del agua a nivel federal, existe también para alimentos. Temprano en el 2011 la FDA convirtió en ley lo que se conoce como el Food Safety Modernization Act o Ley de Modernización de Seguridad Alimentaria, (FSMA, por sus siglas en inglés) en la que básicamente consta de anticipar estándares mínimos federales para la producción de frutas y vegetales a base de los riesgos de seguridad conocidos (FDA, 2013). Esta regulación mejora de forma considerable la capacidad de la agencia FDA para supervisar los productos alimentarios que ingresan a los Estados Unidos y sus territorios procedentes de otros países, esto puede incluir hasta posibles semillas de alimentos para su cultivo (FDA, 2013).

Código de Prácticas de Higiene para las Frutas y Hortalizas Frescas se elaboró para el año 2003 por el CCFH (Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos) para hacer frente a las Buenas Prácticas Agrícolas (GAP por sus siglas en inglés) y Buenas Prácticas de Manufactura (GMP por sus siglas en inglés) para ayudar a controlar los peligros microbianos asociados con todas las etapas de la producción de frutas y hortalizas frescas desde la producción primaria hasta el envasado. El código ofrece un marco general de recomendaciones que permite su adopción uniforme por este sector, a pesar de las diversas condiciones ambientales encontradas o las materias primas a las que se podría aplicar (CAC, 2006; CAC, 2003; FAO,2003).

Ley para la conservación, desarrollo y uso de los Recursos de Agua de Puerto Rico. Ley Núm. 136 de 3 de junio de 1976, según enmendada. Establece en su artículo 2 que es política pública que el estado mantenga el grado de pureza de las aguas de Puerto Rico teniendo como requisito el bienestar, la seguridad y el desarrollo del país, asegurando la disponibilidad del recurso para las generaciones presentes y futuras de la isla por medio de reservas de agua, ya sean artificiales como lagos. Tiene como propósito proteger al país ante una posible falta del recurso, su mal uso, el desperdicio excesivo del agua y su contaminación. También expone que el gobierno del Estado Libre Asociado de Puerto Rico tendrá la obligación de administrar y proteger este recurso a beneficio de la población. Por otra parte, es deber del estado distribuir equitativamente sus aguas a los ciudadanos (AAA, 1976).

En el Reglamento Núm. 6213 para el Aprovechamiento, Uso, Conservación y Administración de las Aguas de Puerto Rico se reconoce el mal uso, el desperdicio y la degradación del recurso en la isla, creando mecanismos para la planificación y administración de los recursos de protección y uso adecuado del agua. Dicho reglamento va de la mano con la ley Núm. 136, Ley para la conservación, desarrollo y uso de los recursos de agua de Puerto Rico. Este

reglamento faculta al Secretario del Departamento de Recursos Naturales y Ambientales (DRNA) a establecer alternativas necesarias para la planificación y administración del recurso y que las mismas garanticen la protección y uso adecuado de los recursos de agua. Tiene como propósito establecer los procedimientos administrativos que guían los usos y aprovechamientos de las aguas de Puerto Rico con el fin de promover un mejor manejo y la conservación del recurso (DRNA, 2000).

Reglamento Núm.6616 de Estándares de Calidad de Agua de Puerto Rico establece en su artículo 3 los estándares de calidad de agua para la protección de los usos designados a las clasificaciones de las aguas costaneras, superficiales, estuarinas, humedales y subterráneas de la isla. Además, se establecen las normas de calidad de agua, las concentraciones máximas de ciertos parámetros permitidos en las aguas para diferentes actividades humanas esto según el Artículo 3 de este reglamento. Por otra parte, se exponen también las normas y requisitos para mantener los cuerpos de aguas en la Isla aptos para los diferentes usos que puedan ser designados. Los estándares establecidos mantienen un control de calidad para proteger la salud de la población y facilitar el desarrollo económico en la Isla (JCA, 2010).

Título 21, sección 110.10, del Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos (21 CFR 110.10). Establece las prácticas de salud e higiene de los trabajadores en el contexto de las buenas prácticas de manufactura (GMPs) al igual que las buenas prácticas agrícolas (GAPs) en las industrias de la fabricación, empaque y almacenamiento de alimentos para el consumo humano. Se deberán considerar las normas de esta sección al establecer prácticas higiénicas en el contexto agrícola. Además, los agricultores o el Departamento de Agricultura (DA) deben tomar las medidas razonables para asegurar un posible riesgo de enfermedades en sus empleados y en sus productos (FDA,1986).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Introducción

En este estudio analizamos algunos de los tipos y números de bacterias presentes en la lechuga *Lactuca sativa* en el área Sur y Centroeste de la isla específicamente en los municipios de Coamo y Aguas Buenas PR. Para llevar a cabo el mismo, procedemos a crear un acuerdo de confidencialidad entre los agricultores de las fincas seleccionadas y este investigador, protegiendo la identidad y confiabilidad ante dicho estudio, que amerita un análisis serio para la salud pública del país y a los mercados a los cuales es comercializado sus productos. Analizamos visualmente el área a ser investigada y determinamos posibles rutas de contaminación como lo pueden ser: pozos sanitarios, pequeños cuerpos de aguas aledaños e incluso el mismo método de recirculación del agua. Una vez recopilados los datos procederemos a determinar los posibles riesgos a la salud que pueden afectarnos al consumir los vegetales de hoja verde producidos en hidropónicos y por consiguiente recomendaremos alternativas de manejo de riesgos para el beneficio de la población. La metodología la detallamos a continuación según fue sometida en el protocolo IBC B01-016-14.

Área de estudio

El estudio lo llevamos a cabo en 2 fincas hidropónicas alrededor de la isla. La primera ubica en la carretera 545, Proyecto Gabia #4 en Coamo PR y la segunda estación fue en la carretera 174 Km. 21.5 en el barrio Sonadora del municipio de Aguas Buenas Puerto Rico.

Objetivos

- Evaluar la presencia de bacterias patogénicas en lechuga *Lactuca sativa* producida en Puerto Rico para poder realizar una especiación de los patógenos presentes en las zonas Sur y Central este de la isla.
- Identificar el riesgo que causaría en la salud de la Isla para recomendar alternativas en el manejo de riesgo.

Método

Para el análisis del estudio, seleccionamos dos fincas de hidropónicas en la Isla, las cuales denominamos F1 y F2. En cada finca, realizamos toma de muestras de hojas de lechuga y del agua en la cual crecen. Seleccionamos tres tubos de riego (1, 2 y 3) para tomar las muestras en tres puntos: inicio (A), centro (B) y final (C), basado en la ubicación del tubo hidropónico y su cercanía al sistema de agua. Con guantes estériles, coleccionamos de 3-4 hojas del mazo de lechuga en cada punto de muestreo. Para evaluar la diferencia, seleccionamos hojas de dos lugares (posición más externa e interna) en los tubos 1 y 2. Del tubo 3, seleccionamos solo hojas de la parte externa. Esto equivale a un total de 9 muestras de hojas y 9 muestras de agua, para un total de 18 muestras por finca y un total de 36 muestras para el estudio. Para la toma de 20 g de hojas y 100 ml de agua, utilizamos bolsas estériles de 100 ml *Whirlpack*, según el estudio de Abadías, Usall, Anguera, Solsona, y Vinas (2008). Las muestras fueron colocadas en nevera a temperatura aproximada de -

7 °C hasta ser llevadas al laboratorio. El manejo de las muestras se llevó a cabo antes de seis horas desde su colección. Utilizamos el método EPA 1600 para la recolección y el manejo de las muestras.

Periodo del estudio

Los muestreos comenzaran a partir del mes de marzo del 2014. Seleccionamos esta temporada ya que es la más efectiva para poder cultivar en el sistema hidropónico, aunque también la más propensa a plagas debido a la humedad y los cambios climáticos tan drásticos presentes en el país.

Manejo de las muestras

Agua – Filtramos los 100 ml recolectados a través de una membrana de celulosa de 0.45 µm. Descartamos el agua filtrada y utilizamos la membrana para el análisis bacteriológico.

Hojas – Añadimos 25 ml de agua destilada a la bolsa utilizada en la colección de la muestra. Por 10 min consecutivos, movimos delicadamente la bolsa con la muestra para asegurar desprender cualquier microorganismo en su superficie. Posteriormente, retiramos las hojas y filtramos el agua a través de una membrana de celulosa de 0.45 µm. Descartamos el agua filtrada y utilizamos la membrana para el análisis bacteriológico.

Análisis bacteriológico

Cultivo

Utilizamos el método EPA 1600 para determinar el crecimiento y conteo de colonias, tanto en las muestras de agua como las hojas. Utilizando una pinza estéril, procedimos a retirar la membrana y colocarla en un plato Petri de 35 mm en presencia del agar correspondiente: Tryptic

Soy Agar, McConkey Agar o Mannitol Salt Agar. Seleccionamos estos agares ya que son los más utilizados según la literatura, además de ser medios de cultivo selectivos para enterobacterias y microorganismos gram negativos. Incubamos las muestras por 72 hr a 28°C. Procedimos a contar las colonias de mayor abundancia.

Subcultivo

Llevamos a cabo subcultivos para purificar y obtener mayor rendimiento para su identificación. Reduciendo de esta manera alguna contaminación existente, si alguna, en la muestra. Además, para evaluar otras características de la bacteria como su patrón de fermentación. Para ello, seleccionamos la colonia de mayor prominencia y la subcultivamos en su respectivo medio de cultivo (*Tryptic Soy Agar, McConkey Agar o Mannitol Salt Agar*) y los incubamos por 48 hr a 28°C.

Identificación de microorganismos

Luego de los subcultivos, procedimos a seleccionar la colonia discreta de cada muestra. La colocamos en 20 ml de *inoculating fluid* (IF, por sus siglas en inglés) y la colocamos en el turbidómetro hasta alcanzar el 80% de turbidez. Vertimos el contenido en una bandeja estéril *Biolog*. Añadimos 10 µl en 12 celdas del *Biolog Gen 3 MicroArray Panel* e incubamos por 18 hr para su análisis e identificación del microorganismo presente.

Análisis estadístico

Utilizamos el programa MiniTab 14 para el análisis descriptivo y la prueba t-pareado. Consideramos con significancia valores de $p > 0.05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación evaluamos la posible presencia de bacterias patógenas presentes en la lechuga *Lactuca sativa* cultivada en el sistema de hidroponía por medio de cultivo tradicional. Este tipo de lechuga actualmente cultivada en Puerto Rico será utilizada en las bandejas de los estudiantes de las escuelas públicas del país. Esto implica que durante este nuevo año 2014 y con el propósito de contrarrestar la obesidad mórbida en los estudiantes este vegetal de hoja verde puede causar otros efectos perjudiciales para quienes lo consumen si no se llevan a cabo las medidas de riesgo necesarias. El estudio trata de crear que estas medidas de riesgo sean tomadas en consideración por los agricultores que proveen estos productos a los comedores escolares del país. Por lo tanto, teniendo ya identificada la especie por medio del Biolog es mucho más fácil presentar una evaluación completa de como poder manejar dicho patógeno en su cultivo y a su vez minimizando el riesgo que el mismo puede causar al consumidor.

Llevamos a cabo pruebas estadísticas para lograr un análisis de datos significativo de los datos obtenidos. Por tal razón, utilizamos el programa MiniTab 14 y la Prueba T Test pareado. Es importante indicar que la significancia entre los valores que se analizaron estaba aproximadamente a un 95% de confiabilidad $p > 0.05$ para tres de las pruebas realizadas, solo dos de las pruebas no arrojaron un resultado favorable de confiabilidad. Realizamos un análisis estadístico y una descripción estadística de las muestras seleccionadas. En las mismas realizamos comparaciones de los datos obtenidos. CFU lechuga total vs. CFU agua total, CFU lechuga finca 1 vs. agua finca 1, CFU lechuga finca 2 vs. agua finca 2, CFU lechuga finca 2 vs. CFU lechuga finca 1 y CFU agua

finca 1 vs. CFU agua finca2. En las primeras tres realizamos una descripción estadística obteniendo el promedio, el error estándar del promedio, desviación estándar, varianza, la mediana y el coeficiente de variación.

Los resultados de la prueba T pareada fueron significativos $p > 0.05$ para CFU lechuga total vs. FU agua total, CFU lechuga finca 1 vs. agua finca 1, CFU lechuga finca 2 vs. agua finca 2. Para cada uno de ellos, seleccionamos los valores obtenidos de ambas fincas y comparamos ambos puntos de muestreo. Apreciamos que hay gran similitud en los resultados obtenidos tanto como para la descripción estadística como para la prueba T pareada con un 0.004 de confiabilidad $n = (18)$. Además, los resultados totales tanto de agua como para lechuga arrojaron un 0.000 de confiabilidad $n = (36)$.

Resultados y discusión

Las muestras se organizaron según el punto de muestreo y la finca. La Tabla 1 presenta el crecimiento de colonias (CFU, por sus siglas en inglés) por mililitros para las muestras de lechuga y agua obtenidas en ambas fincas. Cada finca tuvo un 33% (3/9) de crecimiento de colonias sobre el valor de 300 CFU por mililitro, consideradas como muy numerosas para contar (TNTC, por sus siglas en inglés). Todos los resultados obtenidos para las muestras de agua fueron TNTC. Para ambas fincas, este dato refleja la cuestionable calidad del agua en la cual crece la lechuga. Cuando comparamos la concentración bacteriana, en CFU, de las muestras de lechuga vs agua por finca, encontramos que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.004$) entre los mismos. Los resultados demostraron consistencia confirmando la pobre calidad del agua. El 67% de las muestras con hojas externas (tubo 3) y el 11% de las muestras de hojas internas y externas (tubos 1 y 2) revelaron valores TNTC de CFU. Este dato puede significar que mientras mayor contacto

tengan las hojas con el agua, su carga microbiana será más alta comparada con el resto de la lechuga.

En la Tabla 2 presentamos el porcentaje de muestras que llevaron a cabo el proceso de fermentación en los medios de cultivo selectivos para el primer y segundo subcultivo. Estos resultados nos indican que muchas de las cepas de nuestros microorganismos aislados son capaces de fermentar la lactosa, además de crecer en ambientes con pH ácido. En el caso de MSA es un medio diferencial de estafilococos. Este medio de cultivo se utiliza para el crecimiento de especies que son capaces de crecer a altas concentraciones de sal, que pueden fermentar el manitol, produciendo un color amarillo. En los dos subcultivos del medio MC realizados en la Finca 1, se obtuvo un 33% (1/3) de fermentación para las muestras de hojas, mientras que para las muestras de agua fue de 66% (2/3). Si comparamos estos valores con los de la Finca 2 se observa que para el primer y segundo subcultivo en hojas no ocurrió ningún proceso fermentativo, mientras que para las muestras de agua el primer subcultivo fermentó en un 100% (3/3), mientras que el segundo subcultivo disminuyó a un 33% (1/3). En el caso de TSA, para ambos subcultivos en la Finca 1, se aprecia que en las muestras de hojas ocurrió la fermentación en un 33% (1/3), sin embargo, en agua no se observó ningún proceso fermentativo. Los resultados para la Finca 2 tanto para las muestras de hojas y agua ocurrió fermentación de un 33% (1/3) en ambos subcultivos. Mientras que, para el MSA, en la Finca 1, ocurrió un proceso de fermentación en hojas de 100% (3/3) en ambos subcultivos. Para las muestras de agua, la fermentación del primer subcultivo fue un 33% (1/3) comparado con el segundo subcultivo, en el cual aumentó a un 66% (2/3). Sin embargo, en la Finca 2, para las muestras de hojas no hubo cambio ya que el 100% de las muestras (3/3) fermentaron en ambos subcultivos, en comparación con el de hojas en el cual el primer subcultivo fermentó en un 100% (3/3) vs un 66% (2/3) en el agua con el cual crece el vegetal. De esta manera

se puede apreciar que, tanto en agua como las hojas, en los medios diferenciales utilizados existe la presencia de bacterias gram-negativas a las cuales se le atribuye el proceso de fermentación ocurrido en nuestras muestras. Estos resultados reflejan entonces que los microorganismos aislados y cultivados, con alta probabilidad, pertenecen a los grupos de coliformes fecales. Por tanto, el agua de riego y donde crecen las lechugas contienen estos organismos que, por su relación con organismos patógenos, no deben estar presentes en agua o alimento. Esto cobra particular importancia si tomamos en consideración que la lechuga es una parte importante en nuestra dieta y es un alimento que principalmente se come crudo. Al no pasar por el proceso de cocción, estas bacterias permanecerán en el alimento al momento de consumo. Entonces, es importante que la cantidad y tipo de bacterias aisladas no estén presentes en estos alimentos.

Con relación a la clasificación de los microorganismos, en la Tabla 3 presentamos que el 78% (28/36) de las muestras obtenidas para ambas fincas (n=36) resultaron positivas a los siguientes microorganismos: *Methylobacterium mesophilicum*, *Aeromonas bestiarum*, *Cupriavidus necátor*, *Bacillus horti*, *Providencia rettgeri*, *Pediococcus acidilactici*, *Mycobacterium phlei*, *Cupriavidus gilardii*, *Aeromonas DNA group 11*, *Bacillus pseudofirmus*, *Corynebacterium mycetoides*, *Paenibacillus thiaminolyticus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans bgp 6*, *Serratia liquefaciens/grimesii*, *Raoultella terrigena*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas syringae pv pisi*, *Shewanella algae*, *Exiguobacterium undae*, *Serratia odorifera*, *Mycobacterium senegalense*. Presentamos en la Tabla 4 los patógenos encontrados y su relación con los efectos adversos a la salud humana.

Interesantemente, no encontramos la presencia de *E. coli O157:H7* ni *Salmonella spp.*, que son los microorganismos de mayor asociación a las ETAs. No obstante, encontramos presencia de coliformes fecales (*Enterococcus faecalis*) que están asociados a los ETAs. Un 11% (1/9) de las

lechugas tuvo presencia mientras que no hubo presencia en las muestras de agua. Cuando comparamos nuestro estudio con otros realizados con vegetales (Erkan & Vural, 2008), estos encontraron contaminación por *E. coli*, *C. perfringenes* y *B. cereus* en un 100% (n = 106) de sus muestras. No obstante, al igual que nuestro estudio, en ninguna de sus muestras encontraron *Salmonella spp.* Una posible explicación de la no presencia de *E. coli* en nuestras muestras es que este microorganismo pudiera estar presente en concentraciones por debajo de los niveles de detección del instrumento. Por su parte, Rivera et al. (2009) mencionó que encontraron la presencia de coliformes fecales en el 40% de las hortalizas analizadas. Encontraron que el perejil y la lechuga eran los de mayor porcentaje con un valor de 36.8% individualmente. Por otra parte, Barrantes y Achí, (2011) documentaron que el 65% de las muestras de lechuga analizadas detectaron contaminación fecal por *E. coli*. También indicaron que los niveles de *Salmonella spp.* están por debajo del nivel de detección analítico, pero esto no descarta su presencia. Monge et al. (2011), muestra en su estudio una comparación de distintos métodos de cultivos en los cuales expone la hidroponía. Indica que de las muestras de vegetales de hojas verdes cultivadas en hidropónico el 70% (7/10) fueron positivas para coliformes fecales. Este valor obtenido por Monge et al. es mayor al 11% encontrado en nuestro estudio.

En las tablas 5 y 6 se muestran los microorganismos aislados para las fincas 1 y 2 respectivamente. En las mismas exponemos el género y la especie del microorganismo identificado. En la tabla 5 no observamos la presencia de un microorganismo constante ya que el resultado de todas las muestras en esta finca es variado, No obstante, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter aerogenes* son los de mayor interés ya que son patógenos asociados a la contaminación fecal en los alimentos. Estos patógenos son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia en los alimentos indica falta de higiene o defectuosas condiciones de

conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos (Boehm & Sassoubre, 2014). *Enterococcus faecalis* es un patógeno que se cataloga como un peligro ambiental, por su afinidad a ambientes extremos y altas concentraciones de sal, además de ser un patógeno multi resistente a antibióticos.

La presencia de *Enterobacter aerogenes* el cual ha sido asociado a desperdicios, suelo, agua y heces humanas, también lo convierte en un patógeno de gran cuidado. La presencia de estos microorganismos patógenicos en nuestras muestras nos indica que el agua juega un papel fundamental en la contaminación del vegetal. El uso del agua de riego sin un buen sistema de tratamiento representa una importante y efectiva ruta de transmisión por patógenos. También la presencia de vectores mecánicos como los mosquitos, cucarachas y hormigas, representan un mecanismo de contaminación en el vegetal. Estos son considerados como plagas si llegan a causar daños a la salud humana y a la economía (Pesquero, Carneiro, & Pires, 2012). Dichos vectores son organismos que contribuyen con la dispersión de patógenos por transporte y son transmitidos a los vegetales siendo el vector una especie de huésped definitivo ya que el patógeno queda interno o externamente en el cuerpo del vector. Normalmente esta transmisión puede ocurrir mediante secreciones, normalmente heces, contactos físicos o mordidas producidas por el vector inoculando de esta manera al patógeno existente (Pesquero et al., 2012).

Además, se encontró en nuestro estudio la presencia de *Pantoea agglomerans* *bgp 6*. Este microorganismo ha sido utilizado como biopesticida en la industria de la agricultura y se puede encontrar en plantas, frutos y vegetales. Este patógeno por la ubicación de la finca tiene 4 rutas de exposición a su favor, ya que se puede encontrar en los vegetales, en el aire, como biopesticida y puede ser un buen colonizador en plantas de algodón (Shubov, Jagannathan, & Chin-Hong, 2011),

por ende, su presencia en esta finca se le puede atribuir a este último factor ya que esta finca a su alrededor tiene mucha plantación de algodón existente.

En la tabla 6 mostramos los microorganismos aislados en la finca 2. En esta apreciamos la existencia de un patógeno constante tanto en hojas como en agua de riego. Cinco muestras arrojaron positivo a *Methylobacterium mesophilicum* siendo el patógeno más repetitivo en el área. Este patógeno ha sido reportado como el causante de infecciones oportunistas en pacientes que tengan deficiencia en su sistema inmunológico. Las infecciones reportadas indican que podría ser adquirida de las flores que se entregan a pacientes en los hospitales y por la ingesta de vegetales crudos logrando causar en su caso más extremo una bacteriemia (Sanders, Martin, Hooke, & Hooke, 2000). Además, las especies tales como: *Cupriavidus gilardii* y *Cupriavidus necator*, fueron aisladas siendo la *Cupriavidus gilardii* la especie patogénica por su oportunismo en las infecciones humanas, logrando causar sepsis y edema pulmonar y siendo resistente a varios antibióticos (Karafin et al., 2010). Como se muestra en la tabla 7 el 31% de las cepas de los microorganismos aislados son capaces de causar bacteriemia, una infección en la sangre causada mayormente por bacterias patógenas. Por su parte el restante 69% puede causar varias condiciones de salud o enfermedades a los afectados de las cuales se destacan la meningitis, neumonía, gastroenteritis, infección del tracto urinario entre otros. Es importante aclarar que no todas ellas están presentes en las dos áreas de muestreo. Varias cepas de los patógenos aislados en este estudio pueden ser susceptibles a antibióticos como: Ampicillin/Sulbactam, gentamicin, ciprofloxacina, amikacin, gentamicin, meropenem, rimethoprim-sulfamethoxazole, amoxicillin-clavulanate, cefepime, amikacin, clarithromycin y doxycycline ó resistentes a: ceftazidime, mezlocillin, cloxacillin, piperacillin, tazobactam, aztreonam, mipenem, meropenem, ampicillin, carbenicillin, tetracycline, chloramphenicol y cephalothin (Karafin et al., 2010; Shubov et al., 2011).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La intención de este estudio fue evaluar la presencia de varios microorganismos ya sea de orígenes fecales o posibles patógenos potenciales de causar cualquier trastorno o riesgo a la salud. La lechuga *Lactuca sativa* al igual que la mayoría de los vegetales de hoja verde provee numerosos beneficios para la salud del ser humano. Es conocido que su ingesta es muy valiosa para la vitalidad ya que disponen de innumerables propiedades alimenticias, siendo una extraordinaria fuente de antioxidantes, micronutrientes, vitaminas y fibra para la dieta humana, pero a su vez puede resultar muy desafortunado su consumo en presencia de microorganismos patogénicos. Nuestro estudio tuvo como objetivo evaluar la presencia de estos patógenos en la lechuga *Lactuca sativa* y llevar a cabo una especiación de los mismos. Existen varias formas en las cuales un vegetal verde puede contaminarse y aumentar el riesgo de causar ETA's cuando estas se consumen en estado crudo. En todas las etapas de su manejo: siembra, desarrollo, recolección y distribución existe el potencial de este ser contaminado.

El 100% (18/18) de las muestras de agua dieron valores TNTC para el CFU. Esto sustenta que el agua es la fuente principal para la diversidad de patógenos encontrados. Estos datos son consistentes con lo reportado en la literatura. Los resultados demostraron que aquellas hojas más cercanas al hidropónico tienen mayor contacto con el agua, y su carga microbiana es más alta comparada con el resto de las hojas de la lechuga. Se ha demostrado que el agua utilizada en la agricultura se asocia como el principal causante de la contaminación microbiana en vegetales de hoja verde sin importar su método de cultivo (Monge et al., 2011). Por lo tanto, esta investigación sustenta que el agua utilizada para el crecimiento de este vegetal es la principal fuente de

contaminación microbiana en lechuga *Lactuca sativa*. El uso del agua de riego sin un buen sistema de tratamiento representa una fuente de transmisión de patógenos que pone en riesgo la salud humana.

Según los resultados obtenidos en la mayoría de las muestras de ambas fincas encontramos microorganismos patógenos. Esta diversidad de patógenos muestra que la calidad higiénica con las cuales se trabaja estos alimentos realmente representa un gran riesgo para el consumidor y su salud. No obstante, es evidente que este estudio presenta una necesidad inmediata de un control sanitario sumamente estricto que asegure la calidad de los alimentos que son consumidos por nuestros ciudadanos diariamente. También, existe la posibilidad que la contaminación presente en estos vegetales sea por medio del agua con el cual son regados, debido a que en su totalidad ambas fincas hidropónicas trabajan con este recurso para sus productos. El haber sobrepasado los 300 CFU/mL en todas las muestras de agua cuando el estándar establecido por la Junta de Calidad Ambiental (JCA) es de 200 CFU/mL, nos permite acertar nuestra teoría de que el agua es la principal fuente de contaminación del vegetal. Por tal razón, podemos afirmar que la calidad del agua con el cual están siendo irrigados estos alimentos no es la más segura; debido a que no cumple con los parámetros establecidos por las agencias correspondientes.

La calidad del agua que se utiliza en la agricultura puede tener variaciones, según sean utilizadas. En muchos de los casos en la agricultura se utiliza las aguas subterráneas para llevar a cabo el riego de los alimentos, esta a su vez puede verse influenciada por pozos con grietas, debido a la construcción excesiva y a la sobrepoblación (Havelaar et al., 2010). Por ende, primero debemos llevar a cabo unas buenas prácticas para ayudar, mejorar y asegurar la calidad del agua adecuada. Esto puede incluir la seguridad de que los pozos utilizados estén debidamente

construidos y protegidos. El tratamiento del agua para reducir las cargas microbianas debe ser uno más efectivo; pero esto dependerá de las fuentes de agua disponibles y el uso que se le dé a las mismas. Es bien importante poder identificar el origen y la distribución del agua a usar y tener en mente que la misma puede tener consigo patógenos. En su mayoría se utilizan agua de ríos, quebradas, embalses, estanques diseñados bajo tierra, estanques de plástico y aguas subterráneas.

En el agua para uso agrícola puede tener ya sea directa o indirectamente, una contaminación por desechos humanos o de animales, tal es el caso de *Enterococcus faecalis*. Esta contaminación puede ocurrir por un mal diseño y funcionamiento de los sistemas sépticos o por su cercanía con ganaderías o potreros. Estas y algunas más pueden llegar a ser posibles fuentes de contaminación del agua, por lo tanto, deben ser evaluados y controlados para reducir al mínimo el riesgo microbiano existente. En este caso en particular este patógeno lo encontramos en el área 1. Esto comprobó que la ubicación de esta finca queda adyacente a prácticas ganaderas. Además, el agua utilizada proviene del Lago Coamo. Aunque debemos tener en cuenta que el agua utilizada en muchos de los hidropónicos es un recurso compartido (FAO, 1998). En su mayoría el agua agrícola proviene de aguas superficiales que recorren distintas distancias antes de llegar a la zona en donde se utilizará (FAO, 1998). Esto quiere decir que los agricultores no tienen de cierta manera un control de los factores externos que afectan la calidad del agua, pero si tienen la responsabilidad de determinar las alternativas de control más apropiadas a llevar a cabo. Por tal razón, deben adoptar buenas prácticas de manufactura (GMPs) y buenas prácticas agrícolas (GAPs) para reducir al mínimo la contaminación microbiológica por el agua utilizada en el proceso, al igual que el vegetal cultivado en esa agua. Las necesidades de la calidad del agua podrían cambiar dependiendo como se utilice. Recomendamos que el agua cumpla con los requisitos de la EPA para agua potable y cumplir con las leyes y reglamentos existentes sobre la calidad del agua. El Nivel Máximo de

Contaminantes en el Agua Potable (MNNMC por sus siglas en inglés) según la FDA debe ser cero para contaminantes microbianos (EPA, 2000). Una vez cumplidos los valores de calidad establecidos, el agua potable podría ser considerada como limpia (FAO, 1998).

Por otro lado, observamos que el sistema de riego utilizado en ambas fincas, el agua entra en contacto directo con la raíz y los tallos de las lechugas y no con sus hojas, pero se concluye que las hojas más cercanas al agua serán las que presentaran la mayor carga microbiana, esto según nuestros resultados en seis muestras de hojas de lechuga que sobrepasaron los 300 CFU/mL. Esto nos deja entender que depende del sistema de riego utilizado en el método de hidroponía será la carga presente en el vegetal, ya que, si se utiliza un sistema de riego como efecto lluvia, en el cual el agua entra en contacto directo con todas las hojas, hay una posibilidad mayor de la presencia de los patógenos en todas las hojas del vegetal.

Según FAO es preferible prevenir la contaminación antes que aplicar desinfectantes químicos después de que esta ocurra ya que podrían afectar considerablemente los productos. Es bueno prevenir con medidas correctivas antes de que ocurra una contaminación. Existen correcciones muy eficaces como el uso de compuestos químicos antimicrobianos los cuales ayudan a reducir el exceso de microorganismos en el agua; y en algunas ocasiones en la superficie de los vegetales, ayudando así a reducir la carga microbiana en los vegetales cultivados en hidropónico (FAO, 1998). Por otra parte, es importante indicar que la FAO recomienda que se deben enjuagar los vegetales con abundante agua antes de su consumo. Esto ayuda a reducir el riesgo de contaminación microbiana en los vegetales, debido a que la mayoría de la contaminación de los patógenos se encuentra en la superficie. Debemos tomar en consideración que el agua de lavado debe ser apropiada y debe mantener una temperatura que promueva la calidad de los vegetales, pero a la misma vez elimine la mayor carga microbiana presente. Es de suma importancia que los agricultores y empelados sean conscientes de los reglamentos federales

y estatales sobre las normas correspondientes a las prácticas higiénicas y sanitarias. Esto debe incluir el proceso durante la fabricación, empaque y manipulación de los alimentos destinados al consumo humano. También, se debe capacitar a todos los empleados para que adopten buenas prácticas higiénicas (FAO, 1998). Dada la ausencia de patógenos y bacterias oportunistas como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, y *Listeria monocytogenes* en todas las muestras no asegura una garantía de su ausencia total ya que pudieron estar presentes, pero por debajo de los límites de detección. Esta ausencia nos permite exponer científicamente otros patógenos capaces de causar daño a la salud humana y que se encuentran presentes en la lechuga *Lactuca sativa* producida en Puerto Rico.

Por otro lado, existen métodos de desinfección que son utilizados en muchas partes del mundo, pero los que comúnmente predominan son: Cloro, UltraVioleta (UV) y Ozono (Tarrán, 2002). Actualmente el más utilizado por todos los agricultores y por ende costo efectivo y tradicional es el Cloro. La alternativa de radiación ultravioleta sería muy buena ayuda para los agricultores ya que el objetivo del tratamiento con UV es desintegrar el material genético del patógeno, así el patógeno es destruido por la radiación expuesta cuando la luz ultravioleta traspasa la célula y es absorbido por el material genético de la bacteria (Tarrán, 2002). Esto ayuda a crearle un desorden en los genes de la bacteria imposibilitando a la misma a reproducirse. Hay que mencionar que la lámpara a utilizar debe ser una de 260 nm y hecha de cuarzo. A pesar de ser un buen método al igual que el ozono son procesos muy caros para su manejo y mantenimiento por ende necesitaría un buen financiamiento del gobierno central o ayudas federales existentes.

Es importante que los agricultores puedan ser educados brindándole toda la información posible y asistirle en los mecanismos que se entiendan necesarios para poder brindar un producto confiable y limpio al consumidor. Esto incluye desde entrenamientos de manejo de alimentos, limpieza de alimentos y almacenamiento de alimentos. Ya mencionado esto, es importante como minimizar la presencia tan elevada de microorganismos patógenos en ambas áreas muestreadas;

por tal razón procedemos a realizar una serie de recomendaciones para contrarrestar los resultados obtenidos.

Recomendaciones

- Fomentar el uso de posibles bacteriocinas como método higienizante con el fin de garantizar reducir la carga microbiana patogénica presente (Allende, Martínez, Selma, Gil, & 2004).
- Utilizar método UV como método de desinfección del agua de riego (Tarrán, 2002).
- Se debe utilizar un filtro de 5 micras o filtros de carbón (Tarrán, 2002).
- Se debe enjuagar con abundante agua el vegetal antes de ser ingerido.
- Se debe realizar estudios futuros con el vegetal *Lactuca sativa* analizando la carga microbiana en raíces y en el tronco del vegetal.
- Se debe realizar estudios futuros con distinta forma de riego, esta debe ser en forma de lluvia; así se podrá comparar los resultados obtenidos en este estudio.
- Se debe llevar a cabo diluciones en el agua de riego para cuantificar la cantidad bacteriana presente en el agua.
- Agua previamente caliente (50°C) con ozono + NaCl es un buen tratamiento para las bacterias ya que ayuda a minimizar el riesgo (Koseki & Isobe, 2006).
- Monitorear periódicamente la presencia de microorganismos patógenos en sus productos y no realizar ese monitoreo en el recogido final del producto ya que esto sería un enfoque ineficiente en el control de riesgo.
- Evaluar el suministro de agua para la contaminación microbiana en forma periódica, utilizando indicadores estándares de la contaminación fecal, como las pruebas de *E. coli*.

Estas pueden ser realizadas por laboratorios gubernamentales comerciales, estatales, o locales. Este punto aplica mayormente al área 1 ya que arrojó positivo a *Enterococcus faecalis* y a *Enterobacter aerogenes*.

- Cuando el agua de riego provenga de fuentes públicas, pedir información sobre el análisis microbiano realizado al agua.
- La calidad del agua, puede variar según las temporadas u horas y una sola prueba no puede indicar la posibilidad de que el agua esté contaminada.
- La evaluación de agua no puede revelar patógenos específicos si están presentes en números bajos. Sin embargo, los ensayos microbiológicos apropiados pueden ser útiles para confirmar patógenos sobre la calidad del agua.
- Los agricultores pueden consultar a expertos locales de calidad del agua, como las agencias de protección del medio ambiente o la salud pública estatales o locales.
- Para garantizar la inocuidad de los alimentos es necesario seguir el proceso sistemático preventivo Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP, por sus siglas en inglés).
- Seguir el modelo establecido por la EPA Microbial Risk Assessment (MRA, por sus siglas en inglés). Este documento brinda a manera de guía el cómo realizar una evaluación de riesgos microbiológicos. Expone algunos métodos y herramientas para lograr realizar una posible evaluación de riesgos microbianos brindando al agricultor una mayor transparencia en el proceso y en sus resultados.
- Se debe conocer el origen de la semilla utilizada y de donde fue importada si ese fuera el caso, como se manejó su transporte, si fue colocada cerca de otros alimentos y si está debidamente sellada.

- Se debe conocer de donde proviene la esponja en la cual siembran la semilla. Si no es importada, completar un proceso de esterilización de la misma con vapor y antes de realizar algún cultivo asegurarse de que la misma esté completamente estéril.
- Se debe tener una mayor protección de su cultivo, cumpliendo debidamente con las GMP (Good Manufacturing Practices) y GAP (Good Agricultural Practices).
- No se recomienda el uso de ozono como desinfectante directo a las plantas y en altas concentraciones ya que, aunque tiene la capacidad para acabar con las bacterias y virus, tiene como desventaja que se forma bromato lo cual es cancerígeno para el ser humano.
- Debe tomar en consideración su ubicación y que tiene a su alrededor que pueda estar causando dicha contaminación en su producto (ganado, potreros, fincas de algodón, pozos sépticos, porquerizas, lugares de composta entre otros).
- Establecer un buen plan de entrenamiento intensivo a todo el personal, pueden llevarse a cabo presentaciones formales, orientación a nivel personal, o demostraciones.
- Conocer y familiarizarse con los posibles signos y síntomas comunes en enfermedades infecciosas. Del trabajador presentar síntomas parecidos a una condición infecciosa no debe participar en actividades que se involucren activamente con los productos.
- Considerar alternativas de higiene alternas a las buenas prácticas; esto incluye desde guantes desechables, manera más efectiva para lavarse las manos con líquido que sea antibacterial.
- Toda persona que asista a las instalaciones se les debe exigir que cumplan con las políticas de buenas prácticas de higiene.

Limitaciones

- La falta de coordinación de días para realizar el muestreo con los agricultores, ya que ellos se les hacía más factible los fines de semana.

- Tardanza en recibir los materiales con los que se iba a trabajar.
- Falta de estudios realizados en Puerto Rico referente al tema

LITERATURA CITADA

- Abadías, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Vinas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123,121-129. Recuperado de www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.
- Allende, A., Martínez, B., Selma, M. V., Gil, M. L., & Rodríguez, A. (2004). Bacteriocinas, agentes antimicrobianos en productos vegetales frescos cortados. *Food Microbiol*, 187-190. Recuperado de <http://www.horticom.com/pd/imagenes/66/115/66115.pdf>
- Autoridad de Acueducto y Alcantarillado. [AAA]. (1976). Ley para la Conservación, Desarrollo y Uso de los Recursos de Agua de Puerto Rico. Ley Núm. 136 de 3 de junio de 1976. Recuperado de <http://www.lexjuris.com/LEXMATE/ambiental/lexconservacionagua.htm>
- Barrantes, K., & Achí, R. (2011). Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1), 1-36. Recuperado de http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/viewFile/3081/2946
- Berger, C., Sodha, S., Shaw, R., Griffin, P., Pink, D., Hand, P., & Frankel G. (2010). Fresh Fruit and vegetables for the transmission of human Pathogens. *Environmental Microbiology* 12(9), 385-2397, doi: 1111/j.1462-2920.2010.02297.x.
- Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*®, 59(2), 204-216.
- Boehm, A. B., & Sassoubre, L. M. (2014). Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421>
- Brandl, M. (2008). Plant Lesions Promote the Rapid Multiplication of *Escherichia coli* 0157:H7 on Postharvest Lettuce. *Environmental Microbiology* 4(17) 5285. doi: 10.1128/AEM.01073-08. Recuperado de <http://aem.asm.org/content/74/17/5285.full>

- Brandl, M., & Amundson, R. (2008). Leaf Age as a Risk Factor in Contamination of Lettuce with *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella enterica*. *Environmental Microbiology*, 74(8): 2298. doi:10.1128/AEM.02459-07.
- Bordini, M., Asturiano, R. C., Jakabi, M., & Gelli, D. S. (2007). Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. *Food control*, 18(8), 1002-1007. Recuperado de <http://www.aseanfood.info/Articles/11018084.pdf>
- Codex Alimentarius Commission. [CAC]. (2003). *Code of Hygienic Practice for Fresh Fruits and Vegetables*. CAC/RCP53-2003. Recuperado de http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10200/cxp_053e.pdf
- Codex Alimentarius Commission. [CAC]. (2006). Report of the Thirty-eighth Session of the Codex Committee on Food Hygiene, Houston, United States of America, 4–9. Recuperado de http://www.codexalimentarius.net/download/report/671/al30_13e.pdf
- Calvin, L. (2007). Outbreak linked to spinach forces reassessment of food safety practices. USDA ERS AmberWaves. Recuperado de <http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/June07/Features/Spinach.htm>.
- Callejas, A., López, G., Camacho, A., Artés, A., Artés- Hernández, F., & Suslow, T., (2011). Survival and distribution of *Escherichia coli* on diverse fresh-cut baby leafy greens under preharvest through postharvest conditions. *International Journal of Food Microbiology* 151, 216-222. 2011. Recuperado de <http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/234-2527.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention. [CDC]. (2007). Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants--United States. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 56(35), 909. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17805221>
- Center for Disease Control and Prevention. [CDC]. (2008). *Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2006*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, Recuperado de www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/salmonellaannualsummary2006.pdf.

- Centers for Disease Control and Prevention. [CDC]. (2013). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 us Sites, 1996-2012. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 62, 283. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594684>
- D'Aoust, J. Y. (1994). Salmonella and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1), 11-31. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160594901031>
- de Quadros R. R., Loiko, M. R., Minéia C. D. P., Hessel, C. T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., & Tondo, E.C. (2014). Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control*, 42, 152-164. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514000589>
- De Giusti, M., Aurigemma, C., Marinelli, L., Tufi, D., De Medici, D., Di Pasquale, S. . . & Boccia, A. (2010). The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072, doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04727. x.
- Departamento de Recursos Naturales y Ambientales de Puerto Rico. [DRNA]. (2000). *Reglamento para el Aprovechamiento, Uso, Conservación y Administración de las Aguas de Puerto Rico*. Reglamento Núm. 6213 del 8 de noviembre del 2000. División de Traducciones, Publicaciones y Bibliotecas. Recuperado de http://www.drna.gobierno.pr/biblioteca/reglamentos_folder/Reg6213.pdf
- Eni, A. O., Oluwawemitan, I. A., & Oranusi, S. U. (2010). Microbial quality of fruits and vegetables sold in Sango Ota, Nigeria. *African journal of food science*. Recuperado de http://eprints.covenantuniversity.edu.ng/134/1/Eni_&_Oranusi.pdf
- Environmental Protection Agency. [EPA]. (1970). Estándares de calidad de agua. (WQS). Recuperado de <http://water.epa.gov/drink/agua/estableciendo.cfm>

- Environmental Protection Agency. [EPA]. (1972). Acta de agua limpia. [CWA]. Ley federal para mantener los cuerpos de aguas en óptimas condiciones. Recuperado de http://cfpub.epa.gov/watertrain/pdf/modules/Introduccion_a_la_Ley_de_Aqua_Limpia.pdf
- Environmental Protection Agency. [EPA]. (2000). *Ley de Agua Potable Segura (SDWA)* según enmendada agosto 1996. 12 L.P.R.A. Sec. 1501w. Recuperado de <http://water.epa.gov/drink/agua/estableciendo.cfm>
- Erkan, M., & Vural, A. (2008). Investigation of microbial quality of some leafy green vegetables. *Journal of Food Technology*, 6(6), 285-288. Recuperado de <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/jftech/2008/285-288.pdf>
- Food and Agricultural Organization. [FAO]. (1998). Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, para frutas y vegetales. Recuperado de <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm188933.htm>
- Food and Agricultural Organization. [FAO]. (2003). Código de Prácticas de Higiene para las Frutas y Hortalizas Frescas. Recuperado de http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/alinorm03a.pdf
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. [FAO/OMS]. (2005). Conferencia Regional *FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe* San José, Costa Rica, 6-9. FAO-OMS. Recuperado de www.codexalimentarius.org/input/.../al30_36s.pdf
- Food and Drug Administration. [FDA]. (1986). Título 21, sección 110.10, del Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos (21 CFR 110.10). Recuperado de http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=11_0.10
- Food and Drug Administration. [FDA]. (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition*. Recuperado de <http://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm297627.pdf>

- Food and Drug Administration. [FDA]. (2011). Ley de Modernización de Seguridad Alimentaria. Equivalente a la H.R. 2751, y firmada el 4 de enero de 2011. Recuperado de <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm242861.htm>
- Gomes, N. N. J., Lucena, P. R. M., Barbosa, N. Q., Magnani, M., de Sousa Freitas, F. I., de Souza, E. L., & Maciel, J. F. (2012). Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. *Food Control*, 28(1), 47-51. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200206X>
- Havelaar, A. H., Brul, S., De Jong, A., De Jonge, R., Zwietering, M. H., & Ter Kuile, B. H. (2010). Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S79-S94. Recuperado de <http://jpkc.nefu.edu.cn/zdkc/spsw/UploadFiles/wsw1/Future%20challenges%20to%20microbial%20food%20safety.pdf>
- Heaton, J., & Jones, K. (2007). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology* 1364-5072.doi: 10.1111/j.1365.2672.2007.03587.x.
- Horby, P. W., O'brien, S. J., Adak, G. K., Graham, C., Hawker, J. I., Hunter, P., Lane, P., . . . & Ward, L. R. (2003). A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiology and infection*, 130(02), 169-178.
- Ijabadeniyi, O., Debusho, L., Vanderlinde, M., & Buys, E. (2011). Irrigation water as a potencial preharvest source of bacterial contamination of vegetables. *Journal of food safety*, 1745-4565, doi: 10.1111/j.1745-4565.2011.00321.x.
- Junta de Calidad Ambiental. [JCA]. (2010). Estándares de Calidad de Agua de Puerto Rico. Reglamento Núm. 6616 Radicado el 16 de mayo de 2003. Recuperado de http://www.uprh.edu/oficinas/ssocupacional/pdf_doc/Calidad%20del%20agua%20Enciclopedia%20de%20Puerto%20Rico.pdf
- Karafin, M., Romagnoli, M., Fink, D. L., Howard, T., Rau, R., Milstone, A. M., & Carroll, K. C. (2010). Fatal infection caused by *Cupriavidus gilardii* in a child with aplastic anemia. *Journal*

of *clinical microbiology*, 48(3), 1005-1007. Recuperado de <http://jcm.asm.org/content/48/3/1005.full>

Koseki, S., & Isobe, S. (2006). Effect of ozonated water treatment on microbial control and on browning of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Protection*®, 69(1), 154-160.

Lima, P. M., São José, J. F., Andrade, N. J., Pires, A. C. S., & Ferreira, S. O. (2013). Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of Salmonella/Enteritidis. *Food Control*, 30(1), 157-161. Recuperado de <http://www.researchgate.net/publication/236222439/file/5046352b2e3d30861d.pdf>

Luna-Guevara, L., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, E., Torres, A., Avelino-Flores, F., Navarro-Ocaña, A., & Parada-Guerra, F. (2012). Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y suelos de invernadero. *Scientia Agropecuaria*, 3(2), 161-169. Recuperado de <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/80>

Maffei, D. F., Silveira, N. F. D. A., & Catanozi, M. D. P. L. M. (2013). Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control*, 29(1), 226-230. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512003428>

Mercanoglu T. B., & Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17(6), 286-287. Recuperado de <http://www.researchgate.net/publication/51104658/file/504635295a90e27a52.pdf>

Mugundhan, R. M., Soundaria, M., Maheswari, V., Santhakumari, P., & Gopal, V. (2011). "Hydroponics-A novel alternative for geponic cultivation of medicinal plants and food crops. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, 2(2). Recuperado de <http://www.ijpbs.net/volume2/issue2/pharma/38.pdf>

Monge, C., Chaves, C., & Arias, M. L. (2011). Comparación de la calidad bacteriológica de la lechuga (*Lactuca sativa*) producida en Costa Rica mediante cultivo tradicional, orgánico o hidropónico. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(1), 69-73. Recuperado de <http://alanrevista.org/ediciones/2011-1/art9.asp>

- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., . . . & Kruse, H. (2010). Food-borne diseases—the challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International journal of food microbiology*, 139, S3-S15. Recuperado de http://uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2013/bianca_art1_newell.pdf
- Ofor, M., Okorie, V., Ibeawuchi, I., Ihejirika, G., Obilo, O., & Dialoke, S. (2009). Microbial contamination in fresh tomato wash water and food safety considerations in South – Eastern, Nigeria. *Life Science Journal*, 80-82. Recuperado de http://www.sciencepub.net/life/0603/12_1197_microbial_life0603_80-82.pdf
- Palese, A., Pasquale, V., Celano, G., Figliuolo, G., Masi, S., & Xiloyannis, C. (2008). Irrigation of olive groves in Southern Italy with treated municipal wastewater: Effects on microbiological quality of soil and fruits. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 129, 43-51, 2009. Recuperado de <https://markhall.tamu.edu/scsc461/materials/Major%20Assignment%201%20Paper.pdf>
- Pesquero, M. A., Carneiro, L. C., & Pires, D. D. J. (2012). Insect/Bacteria Association and Nosocomial Infection. Recuperado de <http://cdn.intechopen.com/pdfs/26469.pdf>
- Puerta-Gomez, A. F., Kim, J., Moreira, R. G., Klutke, G. A., & Castell-Perez, M. E. (2013). Quantitative assessment of the effectiveness of intervention steps to reduce the risk of contamination of ready-to-eat baby spinach with Salmonella. *Food Control*, 31(2), 410-418. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512005804>
- Rivera, M., Rodriguez, C., & López, J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expanden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 26(1), 45-48. 2009. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342009000100009&script=sci_arttext
- Sanders, J. W., Martin, J. W., Hooke, M., & Hooke, J. (2000). Methylobacterium mesophilicum infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clinical*

infectious diseases, 30(6), 936-938. Recuperado de <http://cid.oxfordjournals.org/content/30/6/936.full>

Settanni, L., Miceli, A., Francesca, N., Cruciata, M., & Moschetti, G. (2013). Microbial investigation of *Raphanus sativus* L. grown hydroponically in nutrient solutions contaminated with spoilage and pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 160, 344-352. 2013. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512005867>

Shubov, A., Jagannathan, P., & Chin-Hong, P. V. (2011). *Pantoea agglomerans* pneumonia in a heart–lung transplant recipient: case report and a review of an emerging pathogen in immunocompromised hosts. *Transplant Infectious Disease*, 13(5), 536-539. Recuperado de <http://211.144.68.84:9998/91keshi/Public/File/31/13-5/pdf/j.1399-3062.2011.00630.x.pdf>

Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., & Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*®, 67(10), 2342-2353.

Tarrán, E. P. (2002). Desinfección por luz ultravioleta. *Revista Agua Latinoamérica*, 2, 28-35. Recuperado de <http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/3-4-02inter.pdf>

Temiz, A., Bagci, U., & Togay, S. Ö. (2011). Efficacy of different decontamination treatments on microbial population of leafy vegetable. *Gida /The Journal of Food*, 36(1).

Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., & Badosa, E. (2010). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11(4), 231-236. Recuperado de <http://dugi-doc.udg.edu:8080/bitstream/handle/10256/7506/Lactic-acid-bacteria.pdf?sequence=1>

Vandamm, J., Li, D., Harris, L., Schaffner, D., & Danyluk, M. (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh cut celery. *Food Microbiology* 34, 151-157. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002602>

- Van Ha, N. T., Kitajima, M., Hang, N. V. M., Matsubara, K., Takizawa, S., Katayama, H., . . . & Ohgaki, S. (2008). Bacterial contamination of raw vegetables, vegetable-related water and river water in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Water Science & Technology*, 58(12).
- Warner, J. C., Rothwell, S. D., & Keevil, C. W. (2008). Use of episcopic differential interference contrast microscopy to identify bacterial biofilms on salad leaves and track colonization by *Salmonella* Thompson. *Environmental microbiology*, 10(4), 918-925. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01511.x
- Zhang, G., Ma, L., Beuchat, L. R., Erickson, M. C., Phelan, V. H., & Doyle, M. P. (2009). Evaluation of treatments for elimination of foodborne pathogens on the surface of leaves and roots of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Protection*®, 72(2), 228-234.

TABLAS

Tabla 1

Resultados obtenidos de crecimiento de colonias por mililitros (CFU/ml) en hojas de Lactuca sativa y el agua en la cual crece.

Punto de muestreo	CFU/ml			
	F-1		F-2	
	Hojas	Agua	Hojas	Agua
A1	70.0	TNTC	15.0	TNTC
A2	13.0	TNTC	32.0	TNTC
A3	4.0	TNTC	TNTC	TNTC
B1	TNTC	TNTC	26.0	TNTC
B2	26.0	TNTC	17.0	TNTC
B3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
C1	9.0	TNTC	4.0	TNTC
C2	TNTC	TNTC	6.0	TNTC
C3	5.0	TNTC	TNTC	TNTC

Los números (1, 2 y 3) representan los tubos de riego y las letras (A, B y C) representan los puntos de muestreo: inicio (A), centro (B) y final (C). TNTC = CFU/ml > 300. Cuando se compararon los CFU de las muestras de hoja de lechuga versus las del agua en la cual crece, existe diferencia significativa entre ambas ($p = 0.004$).

Tabla 2

Por ciento de muestras de hojas y agua del primer y segundo subcultivo que fermentaron en los diferentes medios de cultivo.

Finca	Porcentaje de fermentación por medio de cultivo (1) y subcultivo (2)					
	MC		TSA		MSA	
	1	2	1	2	1	2
F-1 hojas	33	33	33	33	100	100
agua	66	66	0	0	33	66
F-2 hojas	0	0	33	33	100	100
agua	100	33	33	33	100	66

McConkey (MC), Tryptic Soy Agar (TSA) y Mannitol Salt Agar (MSA)

Tabla 3

Microorganismos aislados, por finca y medio de cultivo seleccionado, de las muestras de hojas de lechuga Lactuca sativa y el agua en el cual crece.

F-1		F-2	
Bacterias	Medio	Bacterias	Medio
<i>Corynebacterium mycetoides</i>	MSA	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	MC/TSA
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	MSA	<i>Aeromonas bestiarum</i>	MC
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MSA	<i>Cupriavidus necator</i>	TSA
<i>Enterobacter aerogenes</i>	MC	<i>Bacillus horti</i>	MC
<i>Pantoea agglomerans bgp 6</i>	MC	<i>Providencia rettgeri</i>	MC
<i>Serratia liquefaciens/grimesii</i>	MC	<i>Pediococcus acidilactici</i>	MC
<i>Raoultella terrigena</i>	MSA	<i>Mycobacterium phlei</i>	TSA
<i>Enterococcus faecalis</i>	MSA	<i>Cupriavidus gilardii</i>	TSA
<i>Bacillus halodurans</i>	MSA	<i>Aeromonas DNA group 11</i>	MC/TSA
<i>Pseudomonas syringae pv pisi</i>	MSA	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	MC
<i>Shewanella algae</i>	TSA		
<i>Exiguobacterium undae</i>	TSA		
<i>Serratia odorifera</i>	TSA		
<i>Mycobacterium senegalense</i>	TSA		

McConkey (MC), Tryptic Soy Agar (TSA) y Mannitol Salt Agar (MSA)

Tabla 4

Presencia de patógenos en la lechuga Lactuca sativa y el agua en el cual crece y su efecto adverso a la salud humana.

Bacteria	Efecto adverso a la salud
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Septicemia y neumonía
<i>Pantoea agglomerans bgp 6</i>	Artritis séptica, bacteriemia, neumonía
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriemia, diarrea, fiebre, gastroenteritis
<i>Serratia odorifera</i>	Infección del tracto urinario, infección de la sangre
<i>Mycobacterium senegalense</i>	Bacteriemia
<i>Shewanella algae</i>	Osteomielitis, bacteriemia, y enfisema/ celulitis
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	Bacteriemia
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Bacteriemia
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Gastroenteritis y diarrea
<i>Providencia rettgeri</i>	Cólera e infección ocular
<i>Mycobacterium phlei</i>	Bacteriemia
<i>Aeromonas DNA group 11</i>	Diarrea, infección gastrointestinal y gastroenteritis
<i>Cupriavidus gilardii</i>	Infección de la sangre , edema pulmonar, anemia aplásica
<i>Raoultella terrigena</i>	Sepsis, diarrea, fiebre
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacteriemia, meningitis
<i>Serratia liquefaciens/grimesii</i>	Bacteriemia, infección del tracto urinario

Tabla 5

Patógenos Identificados en el Finca I

Patógenas

Pseudomonas stutzeri

Enterococcus faecalis

Serratia odorifera

Mycobacterium senegalense

Shewanella algae

Paenibacillus thiaminolyticus

Raoultella terrigena

Enterobacter aerogenes

Pantoea agglomerans bgp 6

Serratia liquefaciens/grimesii

Nota: Un total de 10 muestras arrojaron positivo a patógenos tanto en hoja de *Lactuca sativa* como en el agua de riego.

Tabla 6

Patógenos Identificados en el Finca 2

Patógenas

Methylobacterium mesophilicum

Aeromonas bestiarum

Providencia rettgeri

Aeromonas DNA group 11

Cupriavidus gilardii

Mycobacterium phlei

Nota: Un total de 7 muestras arrojaron positivo a patógenos tanto en hoja de *Lactuca sativa* como en el agua de riego.

Tabla 7

Relevancia Clínica porcentual de enfermedades causadas por las cepas de microorganismos aislados

Enfermedad	%
Bacteriemia	31
Fiebre	8
Gastroenteritis	8
Infección Gastrointestinal	3
Septicemia	3
Diarrea	8
Meningitis	7

Nota: Porcentaje basado en la capacidad que tiene las cepas de los microorganismos encontrados para causar estas enfermedades.

FIGURAS

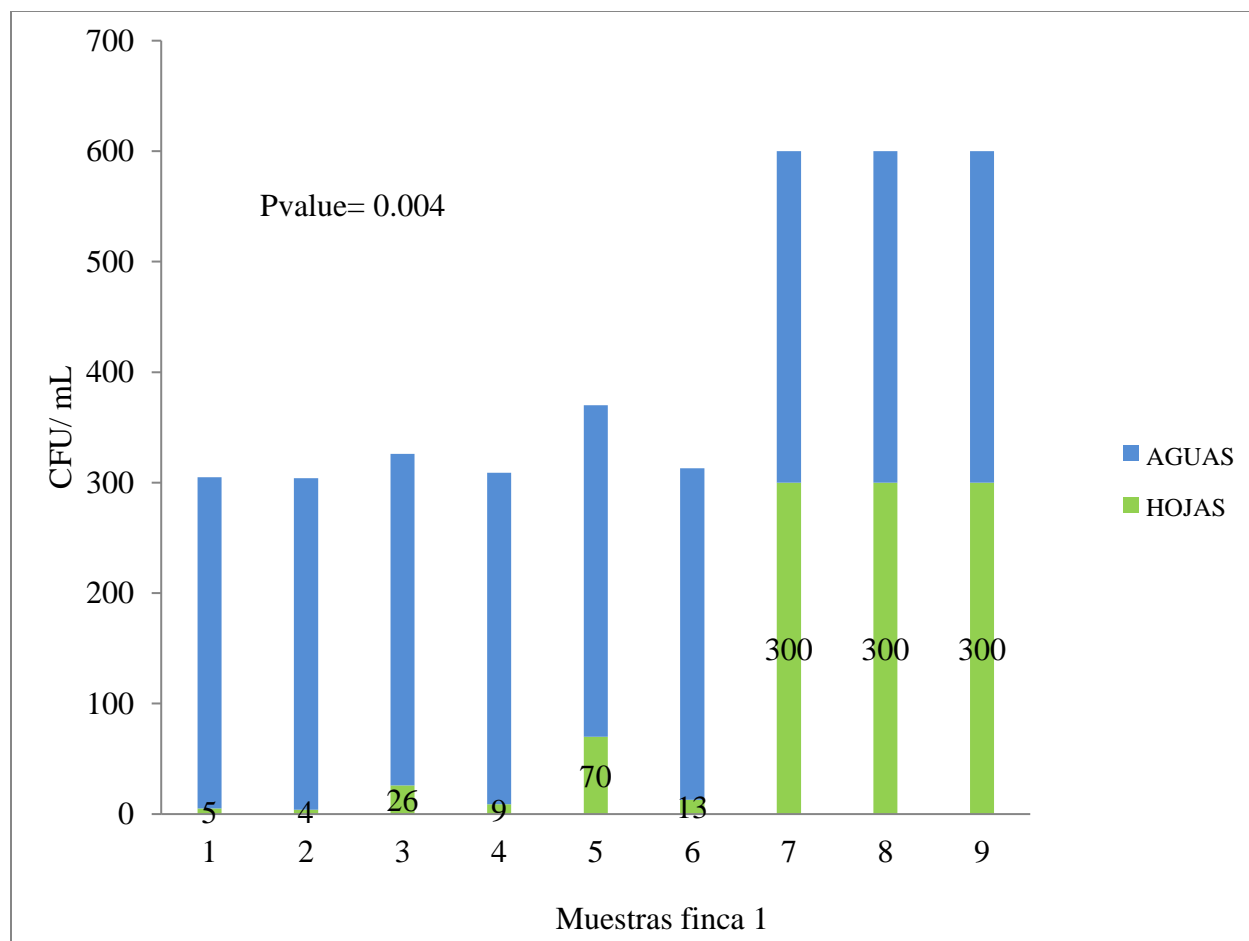


Figura 1. Cálculo de CFU/ mL de agua vs. hoja de lechuga *Lactuca sativa* en Finca 1.

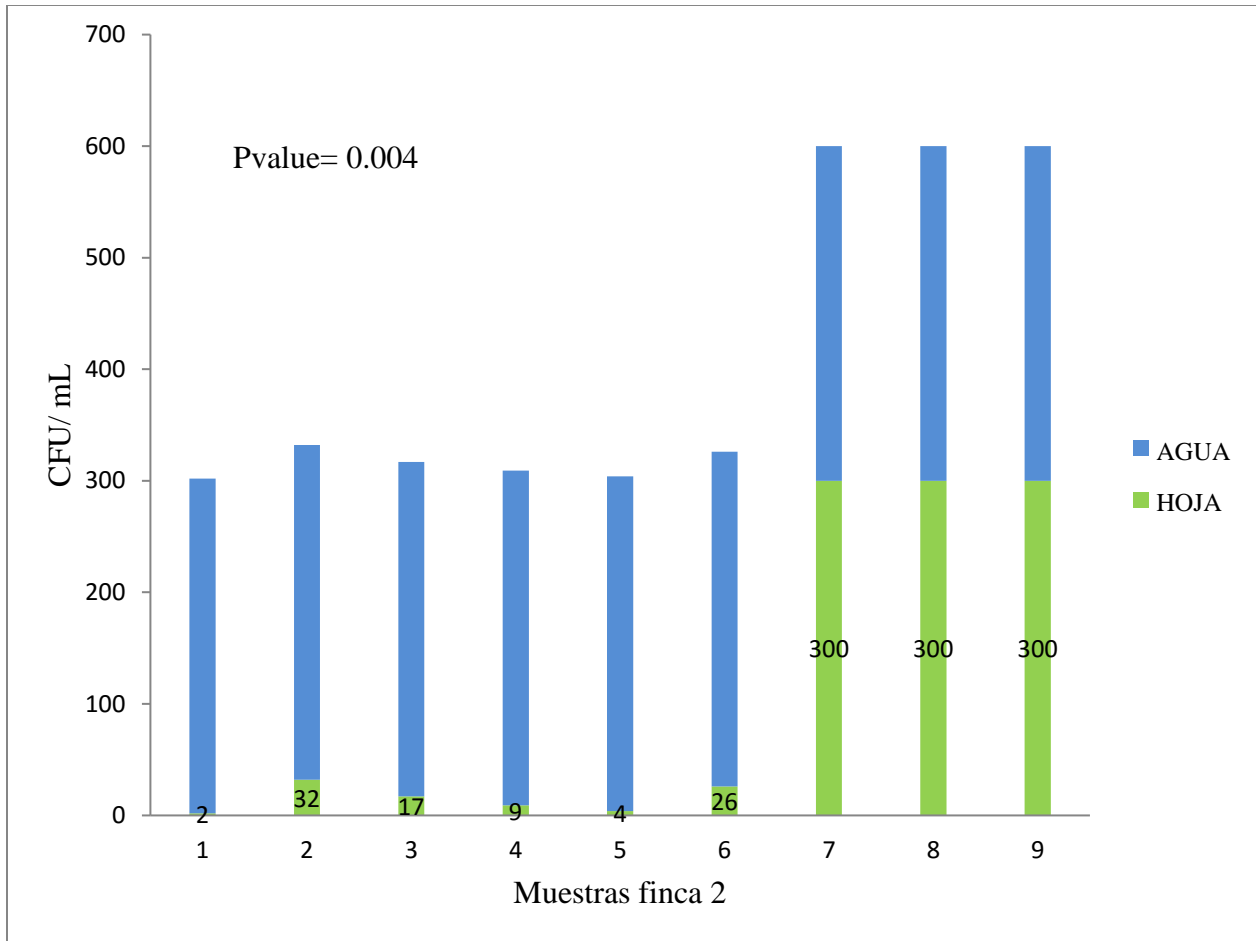


Figura 2. Cálculo de CFU/ mL agua vs. hoja de lechuga *Lactuca sativa* en Finca 2.

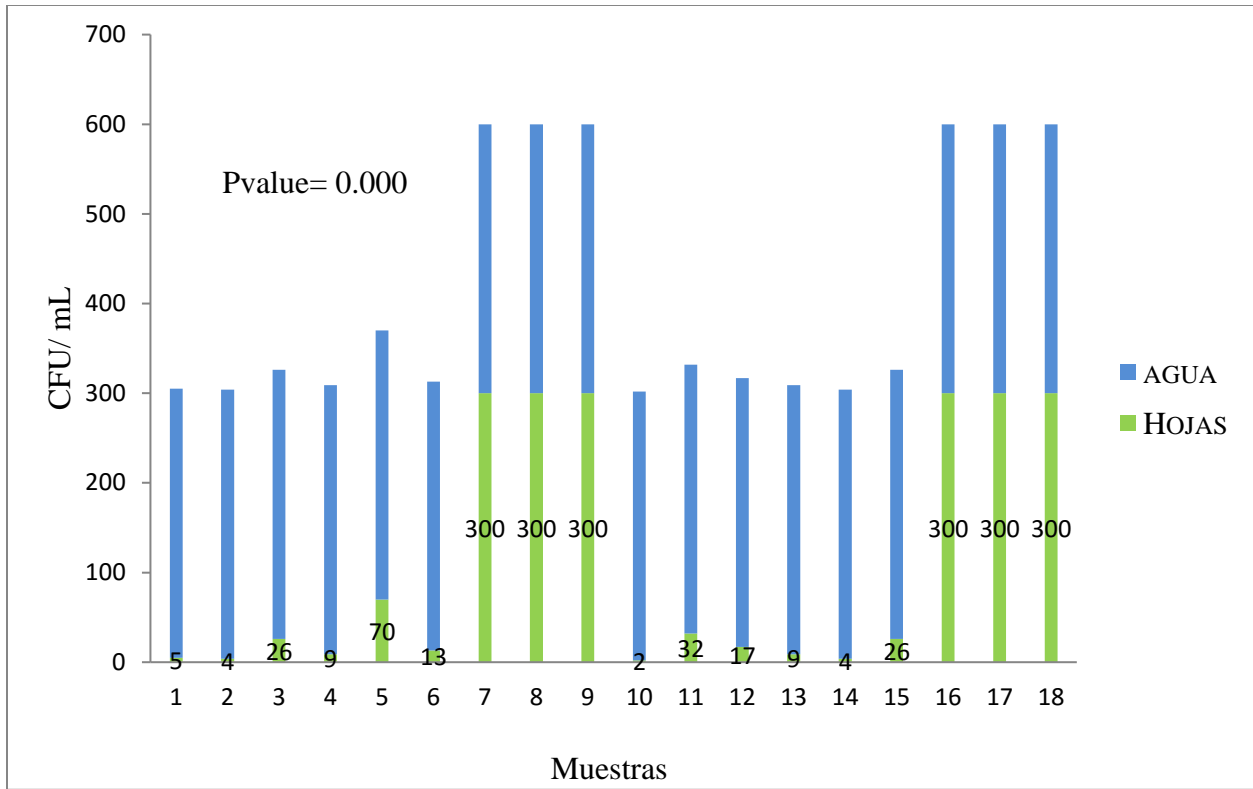


Figura 4. CFU/ mL totales en el finca1 vs. finca 2.



Figura 5. Finca 1, lechuga Lactuca sativa.



Figura 6. Finca 2, lechuga Lactuca sativa.

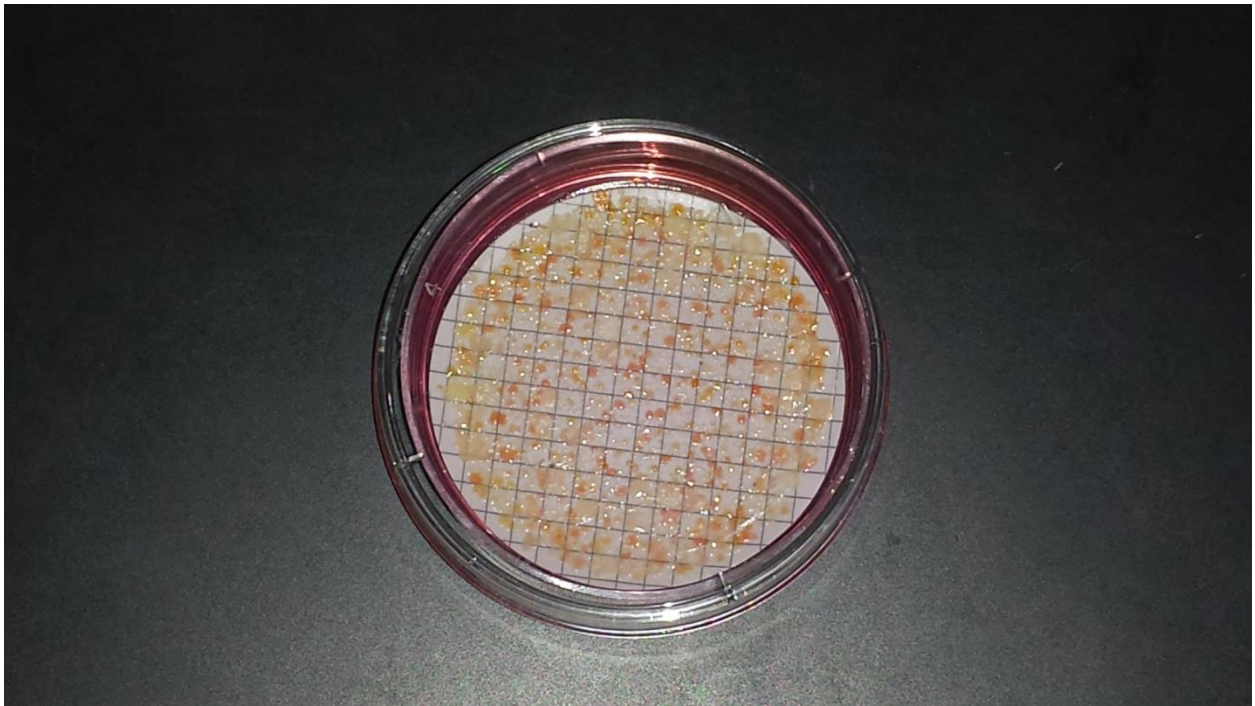


Figura 7. Muestra de hoja de lechuga *Lactuca sativa* finca 1 a 72 hr.



Figura 8. Subcultivo 1 luego de 48 hr a 28 °C.

APÉNDICES

Resultados Análisis Estadístico

Descriptive Statistics: CFU Lechuga TOTAL, CFU Agua TOTAL

Variable	Total				Percent	Mean	SE Mean
	Count	N	N*	CumN			
CFU Lechuga TOTA	18	18	0	18	100	112.1	32.4
CFU Agua TOTAL	18	18	0	18	100	300.00	0.000000000

Variable	StDev	Variance	CoefVar	Sum of Squares	Minimum
CFU Lechuga TOTA	137.6	18937.7	122.81	547957.0	2.00
CFU Agua TOTAL	0.000000000	0.000000000	0.00	1620000.00	300.00

Variable	Q1	Median	Q3	Maximum	Kurtosis	MSSD
CFU Lechuga TOTA	8.00	26.0	300.0	300.0	-1.60	7520.3
CFU Agua TOTAL	300.00	300.00	300.00	300.00	*	0.000000000

Paired T-Test and CI: CFU Lechuga TOTAL, CFU Agua TOTAL

Paired T for CFU Lechuga TOTAL - CFU Agua TOTAL

	N	Mean	StDev	SE Mean
CFU Lechuga TOTA	18	112.056	137.614	32.436
CFU Agua TOTAL	18	300.000	0.000	0.000
Difference	18	-187.944	137.614	32.436

95% CI for mean difference: (-256.378, -119.510)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -5.79 P-Value = 0.000

Descriptive Statistics: CFU Lechuga Finca 1, CFU Agua Finca 1

Variable	Total				Percent	Mean	SE Mean	StDev
	Count	N	N*	CumN				
CFU Lechuga Finc	9	9	0	9	100	114.1	46.9	140.8
CFU Agua finca 1	9	9	0	9	100	300.00	0.000000000	0.000000000

Variable	Variance	CoefVar	Sum of Squares	Minimum	Q1	Median
CFU Lechuga Finc	19834.4	123.42	275867.0	4.00	7.00	26.0
CFU Agua finca 1	0.000000000	0.00	810000.00	300.00	300.00	300.00

Variable	Q3	Maximum	Kurtosis	MSSD
CFU Lechuga Finc	300.0	300.0	-1.74	5632.1
CFU Agua finca 1	300.00	300.00	*	0.000000000

Paired T-Test and CI: CFU Lechuga Finca 1, CFU Agua Finca 1

Paired T for CFU Lechuga Finca 1 - CFU Agua finca 1

	N	Mean	StDev	SE Mean
CFU Lechuga Finc	9	114.111	140.835	46.945
CFU Agua finca 1	9	300.000	0.000	0.000
Difference	9	-185.889	140.835	46.945

95% CI for mean difference: (-294.144, -77.634)
 T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -3.96 P-Value = 0.004

Descriptive Statistics: CFU Lechuga Finca 2, CFU Agua Finca 2

Variable	Total			CumN	Percent	Mean	SE Mean	StDev
	Count	N	N*					
CFU Lechuga Finc	9	9	0	9	100	110.0	47.6	142.8
CFU Agua finca 2	9	9	0	9	100	300.00	0.000000000	0.000000000

Variable	Variance	CoefVar	Sum of			
			Squares	Minimum	Q1	Median
CFU Lechuga Finc	20398.8	129.84	272090.0	2.00	6.50	26.0
CFU Agua finca 2	0.000000000	0.00	810000.00	300.00	300.00	300.00

Variable	Q3	Maximum	Kurtosis	MSSD
CFU Lechuga Finc	300.0	300.0	-1.71	4798.4
CFU Agua finca 2	300.00	300.00	*	0.000000000

Paired T-Test and CI: CFU Lechuga Finca 2, CFU Agua Finca 2

Paired T for CFU Lechuga Finca 2 - CFU Agua finca 2

	N	Mean	StDev	SE Mean
CFU Lechuga Finc	9	110.000	142.824	47.608
CFU Agua finca 2	9	300.000	0.000	0.000
Difference	9	-190.000	142.824	47.608

95% CI for mean difference: (-299.784, -80.216)
 T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -3.99 P-Value = 0.004

Paired T-Test and CI: CFU Lechuga Finca 2, CFU Lechuga Finca 1

Paired T for CFU Lechuga Finca 2 - CFU Lechuga Finca 1

	N	Mean	StDev	SE Mean
CFU Lechuga Finc	9	110.000	142.824	47.608
CFU Lechuga Finc	9	114.111	140.835	46.945
Difference	9	-4.11111	25.60979	8.53660

95% CI for mean difference: (-23.79653, 15.57431)
 T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -0.48 P-Value = 0.643

Paired T-Test and CI: CFU Agua finca 1, CFU Agua finca 2

Paired T for CFU Agua finca 1 - CFU Agua finca 2

	N	Mean	StDev	SE Mean
CFU Agua finca 1	9	300.000	0.000	0.000
CFU Agua finca 2	9	300.000	0.000	0.000
Difference	9	0.000000	0.000000	0.000000

95% CI for mean difference: (0.000000, 0.000000)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = * P-Value = *

* NOTE * All values in column are identical.

RECIBIDO
SECRETARÍA DE
AGRICULTURA

18 de Junio del 2013

2013 JUL 22 AM 10: 31

Honorable Myrna Comas
Secretaria
Departamento de Agricultura
San Juan, Puerto Rico

Estoy cursando estudios graduados en Evaluación y Manejo de Riesgo con especialidad en Gerencia Ambiental en la Universidad Metropolitana (UMET), Recinto de Cupey. Me encuentro en el proceso de establecer la propuesta de tesis, con la cual espero obtener el grado de Maestro en las Ciencias Ambientales. La propuesta está dirigida a desarrollar un estudio de evaluación y manejo de riesgo. El estudio que pretendo desarrollar se relaciona en evaluar la presencia de bacterias patogénicas en vegetales de hoja verde producidos en Puerto Rico específicamente cultivados bajo el método de hidroponía. Próximamente estaré en la fase de completar la metodología del estudio para tener una muestra representativa del estudio.

El propósito de esta misiva, es solicitarle a usted la colaboración y autorización del Departamento de Agricultura, para realizar dicho estudio en algunas de las fincas que utilicen el método de hidroponía. El fin de este estudio es identificar y cuantificar la presencia de bacterias patogénicas en algunos de los productos de estas fincas. De este modo podemos estimar el riesgo que a la salud de los consumidores y recomendar alternativas en el manejo para controlar el riesgo. Para el análisis del estudio se seleccionaran 3 vegetales de hoja verde (lechuga nativa, lechuga romana y perejil) en 4 fincas de la isla. Por cada producto se tomaran 20 muestras para el análisis. Esto equivale a un total de 240 muestras para el estudio. Para cada muestra seleccionada se tomara en consideración su ubicación en el hidropónico y su cercanía al sistema de agua. Por su parte, para el muestreo de agua se seleccionara un total de 400 ml por cada finca, lo que equivaldría a 1,600 ml de agua en total. Si cuento con su autorización estoy en la disposición de reunirme con la persona que usted asigne, para realizar la coordinación de la aplicación de este instrumento de medición.

Gracias anticipadas por las atenciones que le pueda brindar a esta solicitud

Cordialmente;

Mario E. Díaz Rivera 
Estudiante de la Escuela de Asuntos Ambientales – UMET
TEL. (787)-310-2834
Email: emildiaz23@gmail.com



ESTADO LIBRE ASOCIADO DE
PUERTO RICO
Departamento de Agricultura

5 de Febrero del 2014

Mario Emil Díaz Rivera
Estudiante Graduado
Universidad Metropolitana, Cupey (UMET)

Estimado Sr. Díaz

Estamos brindando la información solicitada y realizamos los primeros enlaces de orientación con los agricultores de hidropónicos que hemos sugeridos. Deseamos que como estudiante de maestría en la Universidad Metropolitana en Cupey (UMET) de Gerencia Ambiental con especialidad en Evaluación y Manejo de Riesgo pueda llevar a cabo el proyecto investigación de tesis. Los documentos que le hemos brindado a usted tienen los números, nombre de fincas y de sus propietarios, para que pueda mantener comunicación con ellos y acuerden como se llevara a cabo el estudio. Esperamos que el estudio sobre la Evaluación Bacteriana en hortalizas de hoja verde producida en hidropónico y su posible riego a la salud humana, produzca información confiable para mejorar dichos proyecto de ser necesario. Queremos que el muestreo que se realizara a partir del mes de Marzo del 2014, sea de gran beneficio para esta industria agrícola y los agricultores. Es de suma importancia la confidencialidad del negocio de cada agricultor y notificarle de los resultados investigativos cada agricultor de forma independiente para que puedan realizar las mejoras correspondientes en la calidad de los productos de ser necesarias y eliminar los posibles riesgos existentes en sus negocios, los cuales pueden perjudicar a las poblaciones susceptibles que los consumen.

Quedo a su Disposición,


Manuel Crespo Ruiz
Director Hortalizas



Ave. Fernández Juncos, Pda. 19 ½ Santurce.
Apartado 10163, San Juan, PR 00908-1163
Tel (787) 721-2120 Fax (787) 723-8512

Estado Libre Asociado de Puerto Rico
DEPARTAMENTO
DE AGRICULTURA



6 de Febrero del 2014

Hydrorganic PR

Carr 174 Km 21.5 Bo. Sonadora

Aguas Buenas PR 00703

Tel: 787-645-7743

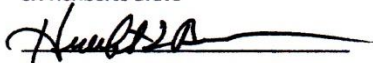
Email: hydrorganipr@gmail.com

Estimado Sr Díaz:

Por la presente misiva se autoriza al estudiante Mario Emil Díaz Rivera, el cual cursa actualmente una maestría en la Universidad Metropolitana en Cupey (UMET) de Gerencia Ambiental con especialidad en Evaluación y Manejo de Riesgo a realizar los muestreos correspondientes para su proyecto investigativo de tesis. El mismo trata sobre realizar una Evaluación Bacteriana en vegetales de hoja verde producidos en hidropónico y su posible riego a la salud humana. Este muestreo se llevara a cabo para el mes de Marzo del 2014. Según lo acordado con el estudiante sus resultados investigativos quedaran a disposición de este servidor para poder realizar las mejoras correspondientes en nuestros productos y minimizar posibles riesgos existentes en el cultivo.

Gracias Anticipadas!

Sr: Heriberto Bravo



Propietario

6 de Febrero del 2014

Finca Hojas Verdes Inc.

Carr. 545, Proyecto Gabia #4

Coamo PR, 00769

Tel: 787-479-3648

Email: hojasverdesinc@gmail.com

Estimado Sr Díaz:

Por la presente misiva se autoriza al estudiante Mario Emil Díaz Rivera, el cual cursa actualmente una maestría en la Universidad Metropolitana en Cupey (UMET) de Gerencia Ambiental con especialidad en Evaluación y Manejo de Riesgo a realizar los muestreos correspondientes para su proyecto investigativo de tesis. El mismo trata sobre realizar una Evaluación Bacteriana en vegetales de hoja verde producidos en hidropónico y su posible riego a la salud humana. Este muestreo se llevara a cabo para el mes de Marzo del 2014. Según lo acordado con el estudiante sus resultados investigativos quedaran a disposición de este servidor para poder realizar las mejoras correspondientes en nuestros productos y minimizar posibles riesgos existentes en el cultivo.

Gracias Anticipadas!



Eduardo Arroyo

Propietario



**QUOTATION
IMDQ5974**

To: Universidad Ana G. Mendez Mario Díaz Ave. Ana G. Mendez Carr. 176 Km. 0.3 Cupey, PR 926	Date: 04/01/14	Ship Date:
	Due Date: 5/1/2014	Ship Via: UPS RED 1-Day
	Terms: ***Credit Card or Prepaid	FOB: Factory
Ph: Ext: Fax:	Prepared By: Brenda L. Vélez	Phone: 787-257-9249 ext. 22
Email: emildiaz23@gmail.com	Email: brenda.velez@instrumed.net	

Qty	Description	Unit Price	Ext. Price
4	1030 / GEN III MicroPlates (for both Gram-positive and Gram-negative bacteria), 10 plates/ box.	\$98.00	\$392.00
1	72402 / GEN III IF-B, Gen III Inoculating Fluid "B" for Aerobic Bacteria, Sterile, 20 tubes per box. This Inoculating Fluid is recommended by the system when a possible strongly reducing and capsule producing GN or GP bacilli are detected.	\$38.00	\$38.00
Sub Total			\$430.00
Tax			\$30.10
Shipping			\$150.00
Total			\$610.10

PRMSDC Certified Minority Business Enterprise

Biolog Consumable Products Special Instructions:

- Biolog ship products on a weekly basis on Mondays and Tuesdays only. We need to receive your purchase order on or before Tuesday at 1:00 pm in order to be able to ship the products the same week. Orders received after 1:00 pm on Tuesday's will ship the next week.
- Prepared culture media that require chilled storage and transit conditions must be shipped via "Next Day Air" service.
- Minimum Order of \$100.00 is required.
- A \$10.00 handling charge will apply for freight collect shipments of inoculating fluids and/ or prepared plated media.
- Biolog, Inc. cannot accept returned perishable materials (Media, Reagents, MicroPlates, etc.) once they have been shipped. When placing an order, please pay special attention to each item's unit type (box, tube, plate, etc.) to ensure that the correct quantity is ordered. No return will be accepted without the correct Return Materials Authorization (RMA) number. If you must return any product, please contact us to request an RMA number, UNAUTHORIZED RETURNS CANNOT BE ACCEPTED AND WILL BE RETURNED AT SENDER'S EXPENSE.
- Freight, insurance and crate charges are approximate and may change without prior notification.
- Thank you for your interest in our products and services!

PO BOX 4964 CAROLINA, PR 00984 - PH. 787-257-9249 - FAX 787-768-6896 - www.instrumed.net