

# PREVALENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN MANGO (*Mangifera indica* L) CV. TOMMY ATKINS

PREVALENCE OF PATHOGENIC BACTERIA IN MANGO (*Mangifera indica* L) CV. TOMMY ATKINS

Rosa María Estrada-Loera<sup>1</sup>, Miguel Ángel Gallegos-Robles<sup>2\*</sup>, Ignacio Orona-Castillo<sup>2</sup>, José Luis García-Hernández<sup>2</sup>, Jorge Alberto Osuna-García<sup>3</sup>, Roberto Sánchez-Lucio<sup>3</sup>, Juan Luis Ríos-Plaza<sup>2</sup>, Cirilo Vázquez-Vázquez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Agricultura y Zootecnia. Venecia, Gómez Palacio, Durango, México.

<sup>2</sup> Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Agricultura y Zootecnia. Venecia, Gómez Palacio, Durango, México.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Santiago Ixcuintla, km 6 Entronque Carretera Internacional México-Nogales, Santiago Ixcuintla Nayarit.

## RESUMEN

Este estudio se realizó para determinar la prevalencia de bacterias patógenas al humano en la producción y empaque de mango cv Tommy Atkins. Se estudiaron tres huertos con diferente nivel de implementación de los Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC), uno inicial, otro intermedio y otro certificado ante el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), y una empacadora; 144 muestras fueron analizadas tanto en 2015 como 2016, para un total de 288 muestras. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las muestras provenientes de huertos para microorganismo, año, huerto y tipo de muestra, así como en la interacción de los cuatro factores. En las muestras de empaque se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el factor microorganismo, muestra, año y en la interacción microorganismo por año; se determinó la presencia de *Salmonella* spp en 2 UFC log 10/mL en agua de pozo. Los resultados mostraron mayor incidencia de *Klebsiella* spp en 2015 con una disminución en 2016, caso contrario a lo que sucedió con *E. coli*.

**Palabras clave:** Inocuidad, *Salmonella*, *Klebsiella*, *E. coli*, Mango

## ABSTRACT

This study was conducted to determine the prevalence of pathogenic bacteria to humans in the production and packing of mango cv Tommy Atkins. Three orchards with different level of implementation of the Pollution Risk Reduction Systems (CRRS) were studied: one initial, another intermediate and one certified by the National Service of Sanitary, Safety and Food Quality (SENASICA), and a packing-house; 144 samples were analyzed both in 2015 and 2016, for a total of 288 samples. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found in samples from orchards considering microorganism, year, orchard and sample type, as well as in the interaction of the four factors. In the packinghouse samples, significant differences ( $p < 0.05$ ) were found for the factors microorganism, sample, year and in the microorganism interaction per year; the presence of *Salmonella* spp was determined in 2 CFU log

10/mL in well water. The results showed a higher incidence of *Klebsiella* spp in 2015 with a decrease in 2016, contrary to what happened with *E. coli*.

**Keywords:** Safety, *Salmonella*, *Klebsiella*, *E. coli*, Mango

## INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es el fruto tropical más popular e importante a nivel mundial (White *et al.*, 2016). México es el cuarto productor de mango en el mundo (Hernández *et al.*, 2015) y ha sido el principal país oferente de mango en los mercados internacionales. Estados Unidos es el principal importador de mango, ya que recibe un 56 % del total de las exportaciones mexicanas (Schwentenius y Sangerman, 2014).

En México este cultivo tiene gran importancia comercial con una superficie de 186,936 ha y un valor de producción de \$255,776.20 USD (SAGARPA, 2014). El estado de Nayarit destaca por ser el tercer productor de mango después de Sinaloa y Chiapas, con una superficie sembrada de 25,491 ha, de las cuales 5,916 ha son destinadas a la producción de la variedad Tommy Atkins; con un rendimiento de 10.6 t ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2014).

Las frutas no solo deben ser atractivas en apariencia, fresca y valor nutritivo, sino que su consumo no debe representar un riesgo para la salud del consumidor. El mango como producto de exportación debe otorgar la garantía de ser un producto inocuo. La inocuidad es un factor importante y es una de las principales demandas del consumidor final, y su ausencia puede ser la causa de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Vera *et al.*, 2015).

Las ETA son un problema importante a nivel mundial ya que ocasionan alta morbilidad y mortalidad; según la organización mundial de la salud (OMS), se estima que cada año enferman en el mundo alrededor de 600 millones de personas, 1 de cada 10 habitantes por ingerir alimentos contaminados y 420,000 mueren por esta misma causa (OMS, 2015). Los alimentos pueden contaminarse a lo largo de la cadena productiva y del transporte (Fatem, 2011).

\*Autor para correspondencia: Miguel Ángel Gallegos-Robles  
Correo electrónico: magallegos@ujed.mx

Recibido: 31 de octubre de 2017

Aceptado: 09 de septiembre de 2018

Las bacterias patógenas en su mayoría son conocidas comúnmente como habitantes de intestinos animales y humanos, siendo *E. coli* la bacteria más estudiada; sin embargo, dentro del grupo se encuentran también agentes patógenos tales como *Yersinia pestis*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella* spp (Savin *et al.*, 2012; Erlacher *et al.*, 2015).

Debido a la creciente incidencia de infecciones alimentarias, hay una necesidad urgente para el control de enfermedades asociadas a las frutas, las cuales están relacionadas a la fácil adquisición de contaminantes biológicos (Lass *et al.*, 2016).

En México, para asegurar la inocuidad de un producto agrícola en el sector primario, se tienen implementados los Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC), que tienen por finalidad reducir la probabilidad a través de la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) de que un alimento se contamine durante el proceso de producción, cosecha o empaquetado, al interactuar de manera directa o indirecta con sustancias y superficies de contacto que puedan introducir un contaminante de tipo biológico, químico o físico y con ello la salud del consumidor sea amenazada. Para lograr este propósito, bajo este modelo, el productor evalúa su condición productiva, valora los posibles peligros de contaminación (actuales y potenciales) que pudieran adherirse al producto durante el proceso productivo, define y aplica las medidas de control acorde a esa condición productiva, demostrando posteriormente que las acciones aplicadas realmente reducen los riesgos valorados (SENASICA, 2010).

Como hipótesis de este trabajo se propone que con la implementación de los SRRC en los huertos es posible reducir la contaminación microbiológica. Dado lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de bacterias patógenas asociadas al sistema productivo de mango en huertos con diferente nivel de implementación en los SRRC en el estado de Nayarit, México, particularmente *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, bacterias relacionadas a nivel mundial con graves problemas de salud asociados a frutas y hortalizas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un primer muestreo el 19 de mayo de 2015 y un segundo muestreo el 20 de mayo de 2016 en Santiago Ixcuintla Nayarit, México, con coordenadas geográficas 21°48'41" N y 105°12'24" O, para monitorear el sistema de producción de mango de tres huertos inscritos en el programa de SRRC: uno inicial (HI) sin ningún grado de avance en los SRRC; otro en nivel intermedio (HM) con cierto grado de avance en los SRRC, pero no certificado ante SENASICA; y uno certificado (HC) ante SENASICA, así como una empacadora ubicada en Sauta, Nayarit. Se analizaron 144 muestras por año, con un total de 288 (Tabla 1).

### Muestras provenientes de los huertos

Se recolectaron muestras de diferentes etapas del área productiva: frutos antes de ser cosechados (muestreo

**Tabla 1.** Muestras analizadas en la cadena productiva del mango durante 2015 y 2016

**Table 1.** Samples analyzed in the mango production chain during 2015 and 2016

Tipo de muestra	HI	HM	HC	Empaque	Total
Fruto del árbol (9 árboles por huerto)	54	54	54	0	162
Suelo	6	6	6	0	18
Cajas	6	6	6	0	18
Manos	6	6	6	0	18
Agua de riego	0	0	6	0	6
Frutos antes de ser lavados				6	6
Agua de pozo				6	6
Agua de lavado				6	6
Agua después del lavado				6	6
Bandas transportadoras				6	6
Manos de empacadores				6	6
Agua de hidrotérmico				6	6
Fruto de hidrotérmico				6	6
Agua de hidrogenfriado				6	6
Fruto de hidrogenfriado				6	6
Frutos empacados				6	6
Total	72	72	78	66	288

HI: Huerto inicial; HM: Huerto intermedio; HC: Huerto certificado.

aleatorio en forma de zig-zag, y momentos antes de la cosecha); cajas de cosecha; y manos de los cosechadores (áreas palmar, dorsal, muñeca, entre dedos y uñas), las cuales se tallaron con hisopo embebido en solución salina (NaCl 0.85 %). Asimismo, se tomaron muestras de suelo (100 g por muestra, muestreo aleatorio en forma de zig-zag) a una profundidad de 5 cm y fueron colocadas en bolsas ziploc para su posterior traslado. También se tomaron muestras del agua de riego en tubos Falcón estériles de 50 mL, únicamente en el huerto certificado, debido a que fue el único huerto con sistema de riego, ya que los huertos inicial e intermedio utilizan agua pluvial.

### Muestras provenientes del empaque

Las muestras analizadas del área de empaque fueron: muestras de agua de pozo (la cual se utiliza en todos los procesos dentro de la empresa empacadora); agua de lavado y desinfección (100 a 200 ppm de cloro libre, pH 6.5-7.5); agua después del lavado de los frutos; agua del hidrotérmico (con una temperatura de 46.1 °C); agua del hidrogenfriado (con una temperatura de 21° C); frutos después de salir del hidrotérmico; frutos después de salir del hidrogenfriado. Las muestras líquidas se tomaron en tubos Falcón de 50 mL. También se analizaron muestras de fruto recién arribado a la empacadora (fruto recién llegado al empaque el cual no ha sido sometido a ningún proceso de desinfección); bandas

transportadoras; manos de empacadores (áreas palmar, dorsal, muñeca, entre dedos y uñas), y frutos empacados listos para su comercialización; estas muestras se tallaron con hisopo embebido en solución salina (NaCl 0.85 %). Todas las muestras se mantuvieron con hielo potable hasta su traslado al laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agricultura y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango, para su posterior procesamiento dentro de 24 horas de ser tomadas.

### Aislamiento de *Salmonella* spp

El aislamiento e identificación de *Salmonella* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Andrews *et al.* (2007), el cual describe que: 25 mL o 25 g de muestra se pasaron a 225 mL de agua peptonada (APB) y se incubaron por 24 h a 35 °C. Después del período de incubación en APB, 1 mL de muestra se pasó a 10 mL de caldo tetrionato y se dejaron incubar de 18 a 24 h a 42 °C, para posteriormente ser sembradas en agar XLD (Becton Dickinson de México). Esas placas se incubaron de 22 a 50 h a 35 °C. Toda colonia con las características de *Salmonella* se pasó a pruebas bioquímicas en agar tres azúcares y hierro (TSI por sus siglas en inglés), agar hierro-lisina (LIA por sus siglas en inglés), y agar citrato de simmons (Becton, Dickinson and Company EE. UU.). Para el conteo de unidades formadoras de colonias se siguió la metodología descrita por Vázquez *et al.* (2015), donde 2 g o 2 mL de muestra se transfirieron a un tubo de centrifuga de 50 mL y se añadieron 18 mL de solución salina (0.85 % NaCl), la mezcla se agitó en vórtice y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , cada dilución fue sembrada en agar verde brillante con sulfadiazina (BGA) y posteriormente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados de UFC se transformaron a Log 10.

### Aislamiento de *E. coli* O157:H7

Para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 se empleó la metodología de acuerdo al protocolo descrito por Feng *et al.*, (2011). Brevemente, se homogenizaron las muestras en caldo EHEC suplementado con cefixime, cefsulodin y vancomicina y se incubaron de 18 a 24 h a 37 °C, posteriormente se pasaron a agar Mac Conkey sorbitol con cefixime y telurito, se incubaron de 18 a 24 h a 37 °C, posteriormente se pasaron a agar TSAYE y luego a agar EMB; se aislaron las colonias cuyas características eran de *E. coli* y se sometieron a las pruebas bioquímicas de indol (+), actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (MUG) (-); TSI (A/A + Gas), citrato (-), sorbitol (-), por ser sorbitol negativas. Para el conteo de UFC se transfirieron 25 g o 25 mL de muestra en solución salina (0.85 % NaCl) y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , las cuales se inocularon en cajas Petri en agar Mac Conkey (Becton, Dickinson and Company EE. UU.) y se incubaron de 20 a 24 h a 35 °C, posteriormente se realizó el conteo de UFC. Dado que el grupo de enterobacterias incluye también a *Klebsiella*, ésta fue aislada en las muestras analizadas en esta metodología.

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques al azar, con tres repeticiones y arreglo factorial, donde los factores fueron: A= microorganismo, B=tipo de muestra, C= año y factor D=estado de avance en huerto. Para el caso de los análisis en muestras de empaque solo se consideraron los factores A, B y C. Las UFC se sometieron en primera instancia a un análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento GLM y la comparación de medias se realizó con DMS ( $p < 0.05$ ). Ambos análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS.

## RESULTADOS

### Análisis de muestras de huertos

La incidencia de *Salmonella* spp fue de 2 UFC log 10/ mL en una muestra de agua de pozo, analizada en el año 2015; no se aisló *Salmonella* en el resto de las muestras analizadas, por lo que siendo la incidencia de *Salmonella* spp muy baja, el resultado no fue sometido a análisis estadístico. En relación a *E. coli* O157:H7 todas las muestras analizadas resultaron negativas.

Aunque el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, las pruebas microbiológicas en este estudio permitieron identificar la presencia de *Klebsiella* spp, y *E. coli* no entero hemorrágica. El análisis de varianza para las muestras provenientes de huertas señaló diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para los factores microorganismo, año, huerto y muestra, así como en la interacción de los cuatro factores ( $p < 0.05$ ), por lo que los resultados y discusión para las muestras provenientes de huertas se centró en esta interacción. La comparación de medias (Tabla 2) muestra en general que los valores más altos y significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) de UFC se observaron para *Klebsiella* spp en los dos años de estudio, principalmente en cajas y frutos de huertos iniciales e intermedios; la media general para *Klebsiella* spp fue de 3.34 UFC log 10/g o mL, mientras que para *E. coli* fue de 1.98 UFC log 10/g o mL. La tendencia de las UFC para *Klebsiella* spp y *E. coli* por tipo de huerto se muestra en la figura 1, donde se observa una tendencia a disminuir el número de UFC conforme los huertos poseen más nivel de avance en los SRRC. La prevalencia de *Klebsiella* spp y *E. coli* por tipo de muestra (Figura 2) señala comportamientos diferentes, pues *Klebsiella* spp presentó menor número de UFC en las muestras de suelo, con tendencia a aumentar en frutos, manos de cosechadores y cajas de cosecha. Por su parte *E. coli* mostró todo lo contrario a *Klebsiella* spp.

### Análisis de muestras de empaque

Los resultados obtenidos en este estudio para empaque mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el factor microorganismo, muestra, año y en las interacciones microorganismo por tipo de muestra y microorganismo por año. La comparación de medias señala una media general de prevalencia para *Klebsiella* spp y *E. coli* de 2.64 y 1.16 UFC log 10/g o mL respectivamente. La comparación de medias en las muestras de empaque indica mayor incidencia de

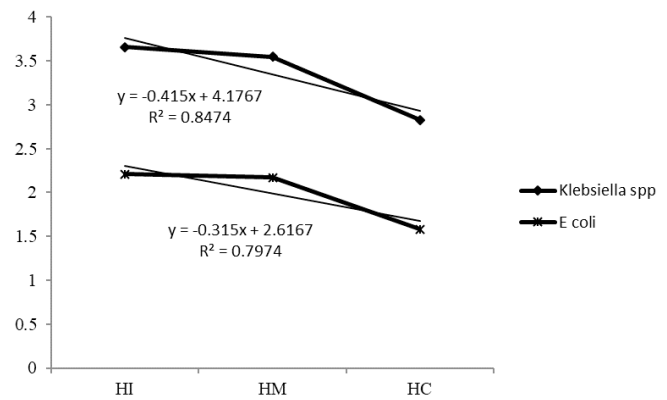
**Tabla 2.** Comparación de medias para interacciones de microorganismo, muestra, año y huerto

**Table 2.** Comparison of means for interactions between microorganism, sample, year and orchard

Microorganismo	Muestra	Año	Huerta	UFC log10
<i>Klebsiella</i> spp	Cajas	2015	HI	4.52 A
<i>Klebsiella</i> spp	Fruto	2015	HI	4.51 A
<i>Klebsiella</i> spp	Fruto	2015	HM	4.32 AB
<i>Klebsiella</i> spp	Cajas	2015	HM	4.30 AB
<i>Klebsiella</i> spp	Cajas	2015	HC	4.09 B
<i>Klebsiella</i> spp	Futo	2016	HI	3.30 C
<i>Klebsiella</i> spp	Suelo	2015	HI	3.26 C
<i>Klebsiella</i> spp	Fruto	2016	HM	3.26 C
<i>Klebsiella</i> spp	Manos	2016	HI	3.25 C
<i>Klebsiella</i> spp	Manos	2016	HC	3.21 C
<i>Klebsiella</i> spp	Cajas	2016	HI	3.19 C
<i>Klebsiella</i> spp	Manos	2015	HI	3.16 C
<i>Klebsiella</i> spp	Manos	2016	HM	3.16 C
<i>Klebsiella</i> spp	Fruto	2015	HC	3.15 C
<i>Klebsiella</i> spp	Suelo	2015	HM	3.15 C
<i>Klebsiella</i> spp	Manos	2015	HM	3.15 C
<i>Klebsiella</i> spp	Suelo	2016	HI	3.14 C
<i>Klebsiella</i> spp	Cajas	2016	HC	3.11 C
<i>Klebsiella</i> spp	Manos	2015	HC	3.09 C
<i>Klebsiella</i> spp	Cajas	2016	HM	3.05 C
<i>Klebsiella</i> spp	Suelo	2016	HM	3.05 C
<i>E. coli</i>	Fruto	2016	HI	2.50 D
<i>E. coli</i>	Manos	2016	HI	2.42 DE
<i>E. coli</i>	Fruto	2016	HM	2.41 DE
<i>E. coli</i>	Suelo	2016	HM	2.35 DE
<i>E. coli</i>	Manos	2015	HI	2.34 DE
<i>E. coli</i>	Suelo	2016	HI	2.32 DE
<i>E. coli</i>	Fruto	2015	HM	2.27 DE
<i>Klebsiella</i> spp	Fruto	2016	HC	2.26 DE
<i>E. coli</i>	Manos	2016	HM	2.25 DEF
<i>E. coli</i>	Suelo	2015	HM	2.22 EF
<i>Klebsiella</i> spp	Suelo	2016	HC	2.21 EFG
<i>E. coli</i>	Fruto	2015	HI	2.16 EFG
<i>E. coli</i>	Fruto	2015	HC	2.13 EFG
<i>E. coli</i>	Suelo	2015	HC	2.11 EFG
<i>E. coli</i>	Suelo	2015	HI	2.10 EFG
<i>Klebsiella</i> spp	Suelo	2015	HC	1.99 FGH
<i>E. coli</i>	Manos	2015	HM	1.99 FGH
<i>E. coli</i>	Suelo	2016	HC	1.89 GHI
<i>E. coli</i>	Manos	2016	HC	1.89 GHI
<i>E. coli</i>	Cajas	2016	HM	1.76 HIJ
<i>E. coli</i>	Cajas	2016	HI	1.75 HIJ
<i>E. coli</i>	Cajas	2015	HI	1.65 IJK
<i>E. coli</i>	Cajas	2015	HC	1.58 IJK
<i>E. coli</i>	Cajas	2016	HC	1.50 JK
<i>E. coli</i>	Cajas	2015	HM	1.39 KL
<i>E. coli</i>	Manos	2015	HC	1.11 L
<i>E. coli</i>	Fruto	2015	HC	0.81 M
DMS				0.298

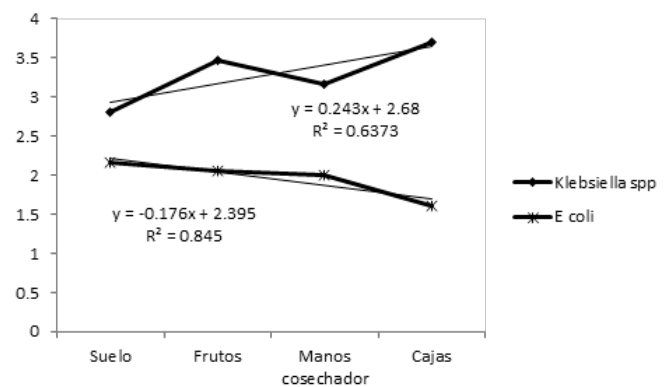
HI: Huerto inicial; HM: Huerto intermedio; HC: Huerto certificado.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)



**Figura 1.** Prevalencia de *Klebsiella* spp y *E. coli* por grado de avance de los huertos en los SRRC. HI: Huerto inicial; HM: Huerto intermedio; HC: Huerto certificado.

**Figure 1.** Prevalence of *Klebsiella* spp and *E. coli* by degree of advance of the orchards in the CRRS. HI: Initial orchard; HM: Intermediate orchard; HC: Certified orchard.



**Figura 2.** Prevalencia de *Klebsiella* spp y *E. coli* por tipo de muestra obtenida en los huertos.

**Figure 2.** Prevalence of *Klebsiella* spp and *E. coli* by sample type obtained in the orchards.

microorganismos en el agua de lavado de los frutos, y menor prevalencia en el fruto empacado y listo para su comercialización (Tabla 3). También se observa que el agua de pozo, las bandas transportadoras y el agua del hidrofrenado son los tipos de muestras que presentan mayor UFC, siendo estadísticamente iguales entre sí (p>0.05). La comparación de medias entre años de muestreo indicó mayor contaminación en 2015 que en 2016, con una media de 2.14 y 1.71 UFC log 10/g o mL respectivamente. En la tabla 4 se observa los valores medios de las interacciones entre microorganismo y año, observándose que la mayor incidencia de *Klebsiella* spp y *E. coli* se presentó en 2015 en comparación de 2016. En general *Klebsiella* spp presentó mayor prevalencia en ambos años de muestreo.

En la interacción entre microorganismo por tipo de muestra en empaque (Tabla 5), la mayor incidencia se observó para *Klebsiella* spp en bandas transportadoras después de los procesos de lavado y desinfectado, y la menor incidencia en el fruto empacado y listo para su comercialización. Para *E. coli* la mayor incidencia de UFC se encontró en agua de pozo,

**Tabla 3.** Comparación de medias entre tipos de muestras en empaque.

**Table 3.** Comparison of means between sample types in packinghouse.

Muestra	UFC log 10
ADL	2.04 A
AP	2.03 AB
EB	2.01 AB
AHE	2.00 AB
EM	1.96 ABC
FHE	1.95 ABC
AL	1.95 ABC
FADL	1.92 ABC
AHT	1.89 BC
FHT	1.84 C
EFE	1.58 D
DMS	0.141

ADL: Agua después del lavado; AP: Agua de pozo; EB: Bandas transportadoras; AHE: Agua de Hidroenfriado; EM: Manos; FHE: Fruto con hidrogenfriado; AL: Agua de lavado; FADL: Fruto antes de ser lavado; AHT: Agua de hidrotérmico; FHT: Fruto con hidrotérmico; EFE: Fruto empaçado.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 4.** Comparación de medias entre microorganismos y años de muestreo en empaque

**Table 4.** Comparison of means between microorganisms and sampling years in packinghouse

Microorganismo	Año	UFC log 10
<i>Klebsiella</i> spp	2015	3.20 A
<i>Klebsiella</i> spp	2016	2.18 B
<i>E. coli</i>	2015	1.25 C
<i>E. coli</i>	2016	1.07 D
DMS		0.085

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

luego en las manos de los empaçadores, y la menor incidencia se observó en frutos empaçados.

## DISCUSIÓN

Normalmente los tópicos de investigación en patógenos han sido sobre la biología de los mismos; sin embargo, un tema también importante es la generación de datos sobre la naturaleza de los reservorios ambientales de patógenos en los campos de producción (Strawn *et al.*, 2013). Los resultados encontrados en este estudio muestran que la prevalencia de *Klebsiella* spp a través de los factores tipo de muestra, año, huerto y sus interacciones, están significativamente asociados con la frecuencia de muestras positivas para *Klebsiella* spp. Los resultados obtenidos muestran que *Klebsiella* spp se presentó en mayor proporción que *E. coli* en

**Tabla 5.** Comparación de medias entre microorganismo y tipo de muestra en empaque

**Table 5.** Comparison of means between microorganism and sample type in packinghouse

Microorganismo	Muestra	UFC log 10
<i>Klebsiella</i> spp	EB	2.91 A
<i>Klebsiella</i> spp	FHE	2.79 AB
<i>Klebsiella</i> spp	ADL	2.76 AB
<i>Klebsiella</i> spp	AHT	2.73 AB
<i>Klebsiella</i> spp	AHE	2.70 B
<i>Klebsiella</i> spp	FADL	2.68 BC
<i>Klebsiella</i> spp	AP	2.65 BC
<i>Klebsiella</i> spp	AL	2.65BC
<i>Klebsiella</i> spp	FHT	2.63BC
<i>Klebsiella</i> spp	EM	2.60 BC
<i>Klebsiella</i> spp	EFE	2.50 C
<i>E. coli</i>	AP	1.41 D
<i>E. coli</i>	EM	1.33 DE
<i>E. coli</i>	ADL	1.32 DE
<i>E. coli</i>	AHE	1.29 DEF
<i>E. coli</i>	AL	1.25 DEFG
<i>E. coli</i>	FADL	1.17 EFG
<i>E. coli</i>	FHE	1.12 FG
<i>E. coli</i>	EB	1.10 FG
<i>E. coli</i>	AHT	1.05 G
<i>E. coli</i>	FHT	1.05 G
<i>E. coli</i>	EFE	0.67 H
DMS		0.199

ADL: Agua después del lavado; AP: Agua de pozo; EB: Bandas transportadoras; AHE: Agua de Hidroenfriado; EM: Manos; FHE: Fruto con hidrogenfriado; AL: Agua de lavado; FADL: Fruto antes de ser lavado; AHT: Agua de hidrotérmico; FHT: Fruto con hidrotérmico; EFE: Fruto empaçado.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

el año 2015 en muestras de cajas y frutos en huertos iniciales e intermedios; de lo anterior se puede deducir que los frutos en los árboles y las cajas de cosecha representan factores de riesgo de contaminación en campo y para el empaque, asimismo señala falta de lavado y desinfección eficiente de las cajas donde se transporta los frutos al empaque en huertos iniciales e intermedios. Trabajos similares (Hernández *et al.*, 2015; Al-Kharousi *et al.*, 2016) han identificado a *Klebsiella* spp y *E. coli* en productos frescos como mango, calabaza, lechuga, papaya, entre otros. La presencia de *Klebsiella* spp en muestras de suelo se observó con una media de 3.26 UFC log 10/g en la huerta inicial; por su parte Rossmann *et al.*, (2012), describen la incidencia de *Klebsiella* spp en un 11.4 % en la rizósfera del suelo, y también reportan la presencia de enterobacterias con potencial patógeno humano con menos prevalencia tales como *Salmonella* y *E. coli*.

La menor incidencia de *Klebsiella* spp se presentó en el año 2016 en muestras de cajas, manos y suelo en los huertos intermedio y certificado, lo que demuestra cierta efectividad de la aplicación de SRRC en la disminución de contaminación microbiológica según el grado de avance del huerto. Estudios previos señalan a *Klebsiella* spp como un patógeno del tracto urinario; sin embargo, también ha sido aislado a partir de fuentes ambientales como suelo, agua, frutas crudas y ensaladas (Aguoru *et al.*, 2015; Piperaki, *et al.*, 2017). La presencia de *Klebsiella* spp en muestras de manos de cosechadores demuestra que la contaminación de las frutas por bacterias puede ser directa desde el momento de la producción en campo o por medio de la contaminación fecal debido a la falta de higiene en los trabajadores, lo que representa un riesgo para la salud del consumidor (Steiner *et al.*, 2016). Babu *et al.* (2015) muestran que *Klebsiella* spp es un patógeno de origen alimentario que es ubicuo en la naturaleza, por lo tanto de fácil adquisición y prevalencia en frutas.

Por su parte *E. coli* genérica se presentó en mayor proporción en el año 2016, en muestras de fruto, manos y suelo en huertos iniciales, y con menor incidencia en muestras de manos y frutos en huertos certificados. Ávila *et al.* (2008), mencionan el hallazgo de coliformes totales en frutos en concentraciones <241 UFC; a su vez Mukherjee *et al.* (2006), reportan la presencia de coliformes fecales en parcelas orgánicas, entre ellas *Klebsiella* spp.

La tendencia a disminuir las UFC conforme se avanza en el grado de aplicación de los SRRC, fue lo esperado (Figura 1), pues la intención de los SRRC es reducir los riesgos de contaminación de origen biológico, químico y físico durante el proceso de producción, cosecha y empaque (SENASICA, 2010). En este estudio se observó esta tendencia pues mayor número de UFC se observó en el huerto inicial y menor número en el huerto intermedio y certificado.

El análisis de peligros en los huertos de este estudio (Figura 2), señala que las muestras analizadas están contaminadas principalmente por *Klebsiella* spp, siendo la tendencia de contaminación de menor a mayor en el suelo, frutos, manos de trabajadores y cajas de cosecha. Para *E. coli* se observó una tendencia contraria a la observada en *Klebsiella* spp. El SENASICA (2010) menciona que la eficacia de los SRRC se sustenta en un profundo conocimiento de las condiciones productivas donde se produce el alimento de origen vegetal (diagnóstico), una valoración adecuada y sustentada sobre los posibles contaminantes que se puedan incorporar de manera directa o indirecta (análisis de peligros), en otros.

Dentro de la empresa empacadora, el agua de pozo y el agua utilizada en el lavado de los frutos, fue la muestra con mayor contaminación por *E. coli*. Sanna *et al.* (2016), detectaron 48% de *E. coli* en agua de riego y la formación de 180 UFC en vegetales frescos. La prevalencia de *E. coli* en muestras de suelo demuestra que la supervivencia de *E. coli* en suelos puede contaminar el agua potable, por lo tanto las frutas y los vegetales (Yao *et al.*, 2014; Kłapeć *et al.*, 2016), sin embargo, no solo el suelo y el agua pueden ser factores

importantes en la contaminación de las frutas; Shamsul *et al.* (2016) en estudios similares observaron la prevalencia de *E. coli* proviene en un 33.3 % en manos de trabajadores durante el periodo del trabajo, por lo cual se debe enfatizar en la importancia de la formación y gestión de todos los empleados en el uso eficaz de lavado de manos (Raspor, 2008). La predominancia de las frutas como vehículo de patógenos como *E. coli* transmitidos por alimentos está aumentando, por lo tanto la acción primaria del lavado de manos es la eliminación mecánica de microorganismos viables, mientras que la acción del jabón antimicrobiano incluye tanto la eliminación, la muerte o inhibición de los microorganismos resistentes (Lambrechts *et al.*, 2014).

Estudios previos (Strawn y Danyluk, 2010), muestran que *E. coli* puede sobrevivir a cambios de temperatura, una razón probable que explica porque se encontró *E. coli* en frutos después de ser sometidos al proceso de hidrotérmico e hidroeñfriado. Los organismos aislados en este estudio como *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp y *E. coli* son de importancia, porque han sido involucrados en diferentes brotes causados por alimentos (Odebisi *et al.*, 2015). Además, se sabe que pueden contener factores genéticos que le confieren resistencia a antibióticos y que pueden ser intercambiados entre cepas de la misma especie y aún entre especies diferentes (Piperaki *et al.*, 2017). La importancia de la detección de *Klebsiella* spp y *E. coli* es que son los principales representantes de la producción de las  $\beta$ -lactamasas con espectro extendido y que proporciona resistencia a cefalosporinas de tercera generación en enterobacterias (Woodford *et al.*, 2007; Önnberg *et al.*, 2011). Por otra parte, Bhutani *et al.* (2014) señalan que la mayoría de los antibióticos que son aplicados en los animales son excretados como metabolitos y pueden promover el crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos, las cuales se han encontrado en niveles bajos en suelos y agua. En este estudio *Salmonella* spp fue detectada en una de las tres muestras de agua de pozo, mientras que *E. coli* y *Klebsiella* en el total de muestras de agua, lo cual señala que el agua de pozo presenta contaminación fecal (Kovacic *et al.*, 2017).

López *et al.* (2009) indican que en ambientes hostiles las bacterias se encuentran en un estado viable pero no cultivable lo que dificulta su aislamiento en medios selectivos, pudiendo ser esta una de las causas de la baja prevalencia encontrada en este estudio; la incidencia de patógenos en agua también se ve asociado a factores ambientales como pH, temperatura y precipitación. Falardeau *et al.* (2017), reportan a *Salmonella* spp fuertemente correlacionada con la precipitación, y es importante señalar que los pozos poco profundos, se ven afectados por el agua superficial o con grietas en su revestimiento, lo que los hace estar expuestos a contaminación. Para mantener la seguridad del producto es crucial la calidad microbiológica del agua de riego, ya que el agua es una fuente de contacto entre el producto y *Salmonella* spp; sin embargo, el agua contaminada con *Salmonella* spp además de actuar como vehículo de transferencia de patógenos a la superficie del producto, también puede contaminar el suelo (Fatica y Schneider, 2011). Por

otra parte la importancia de la detección de *Salmonella* spp es que presenta resistencia antimicrobiana a betalactámicos, aminoglucosidos, fluoroquinolonas, entre otros (Weiler *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los mangos fueron contaminados con *E. coli* y *Klebsiella* en las diferentes etapas del proceso, durante la cadena productiva. La desinfección del fruto es un factor importante, con los resultados obtenidos en este estudio se puede asumir que el tratamiento con cloro en la tina de lavado, no fue del todo efectivo cuando se tomaron las muestras en 2015, distinto a lo que sucedió en el 2016; sin embargo, a pesar de que el tratamiento fue efectivo para *Klebsiella* spp en 2016, no lo fue para *E. coli*. Los resultados sugieren tomar acciones correctivas que minimicen el riesgo de contaminación microbiológica durante el proceso de producción y empaquetado. En ambos muestreos se encontró una notable disminución de contaminación en el fruto empaquetado, debido a que este ya había sido sometido a procesos de desinfección; sin embargo, la contaminación en los huertos fue el esperado según la hipótesis de trabajo, mostrando una reducción de contaminación según el grado de avance de los huertos en los SRRC. Finalmente, estos resultados pueden servir como una base de esquema de muestreo a productores de mango y profesionales relacionados con la inocuidad de alimentos para intentar detectar patógenos transmitidos por frutas y hortalizas en los ambientes precosecha y procesamiento (empaquete).

## REFERENCIAS

- Aguoru, C.U., Maaji, S. y Olasan, J.O. 2015. Bacteria Contaminants on Surfaces of Some Edible Fruits Sold in Makurdi Metropolis, Benue State, Nigeria. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 4: 334-340.
- Al-Kharousi, Z.S., Guizani, N., Al-Sadi, A., Al-Bulushi, I.M. y Shaharoon, B. 2016. Hiding in Fresh Fruits and Vegetables: Opportunistic Pathogens May Cross Geographical Barriers. *Int J Microbiol.* 2016: 1-14.
- Andrews, W., Wang, H., Jacobson, A. y Hammack, T. 2007. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 5. *Salmonella* [Consultado el 13 de abril de 2015]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070149.htm>.
- Ávila, G., Sánchez, G., Muñoz, E., Martínez, L. y Villalobos, E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Revista Internacional de Botánica Experimental.* 77: 129-136.
- Babu, I., Shripat, H. y Vardhan, H. 2015. Incidence of *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* in food and environmental samples isolated from Mysore City, India and its antibiogram. *Int J Pharma Bio Sci.* 4: 635-641.
- Bhutani, N., Muraleedharan, C., Talreja, D., Walia, S., Rana, S., Walia, S., Kumar, A. y Walia, S. 2014. Occurrence of Multidrug Resistant Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria on Iceberg Lettuce Retailed for Human Consumption. *BioMed Research International.* 2015: 1-10.
- Erlacher, A., Cardinale, M., Grube, M. y Berg, G. 2015. Biotic Stress Shifted Structure and Abundance of Enterobacteriaceae in the Lettuce Microbiome. *PLoS One.* 10: 1-14.
- Falardeau, J., Johnson, R.P., Pagotto, F. y Wang, S. 2017. Occurrence, characterization, and potential predictors of verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in surface water used for produce irrigation in the Lower Mainland of British Columbia, Canada. *PLoS ONE.* 12: 1-22.
- Fatem, M. 2011. The Incidence of Enterobacteriaceae Causing Food Poisoning in Some Meat Products. *Adv J Food Sci Technol.* 3: 116-121.
- Fatica, M.K. y Schneider, K.R. 2011. *Salmonella* and produce survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence.* 6: 1-7.
- Feng P., Weagant S.D. y Jinneman K. 2011. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 4A. Diarrheagenic *Escherichia coli* [Consultado el 13 de abril de 2015]. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>
- Hernández, J.A., Castillo, A.M., Pérez, M.H., Avitia, E., Trejo, L.I., Osuna, J.A. y García, M. R. 2015 Fertilización con boro y su relación con la producción de frutos sin semilla en mango 'Ataulfo'. *Rev Mex De Cienc Agric.* 6: 1757-1768. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070149.htm>.
- Kłapeć, T., Cholewa, A., Cholewa, G., Dutkiewicz, J. y Wójcik, A. 2016. Microbiological characterization of vegetables and their rhizosphere soil in Eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 23: 559-565.
- Kovacic, A., Huljev, Z. y Susic, E. 2017. Ground water as the source of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Epidemiology and Global Health.* 7: 181-184.
- Lambrechts, A.A., Human, I.S., Doughari, J.H. y Lues, J.F. 2014. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries. *Pak J Med Sci.* 30: 755-757.
- Lass, A., Szostakowska, B., Myjak, P. y Korzeniewski, K. 2016. Fresh fruits, vegetables and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis* in highly endemic areas of Poland: reply to concerns. *Parasitology Research.* 115: 3637-3642.
- López, O., León, J., Jiménez, M. y Chaidez, C. 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Rev Fitotec Mex.* 32: 119 - 126.
- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A., Buesing, K. y Diez, F. 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. *Journal of Food Protection.* 69: 1928-1936.
- Odebisi, M.B., Oke, M.A., Ahmed, A.M., Ajijolakewu, A.K. y Salaudeen, B.I. 2015. Microbiological Quality and Safety of pre-cut fruit retailled in Ilorin, Kwara State, Nigeria. *Fountain Journal of Natural and Applied Sciences.* 4: 19 - 26.
- Önnberg, A., Mölling, P., Zimmermann, J. y Söderquist, B. 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum b-lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. *APMIS.* 119: 287-295.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Inocuidad de los alimentos [consultado el 13 de mayo 2016] 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

- Piperaki, E.T., Syrogiannopoulos, G.A., Tzouvelekis, L.S. y Daikos, G.L. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. The Pediatric Infectious Disease Journal. 36: 1002-1005.
- Raspor, P. 2008. Total Food Chain Safety: How good practices can contribute. Trends Food Sci Technol. 19: 405-412.
- Rossmann, B., Müller, H., Smalla, K., Mpiira, S., Baptist, J., Staver, Ch. y Berg, G. 2012. Banana-Associated Microbial Communities in Uganda Are Highly Diverse but Dominated by *Enterobacteriaceae*. Applied and Environmental Microbiology. 78: 4933-494.
- SAGARPA. Cierre de producción agrícola por estado. [consultado 11 abr 2016] 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Sanna, A., Meloni, B., Ruggeri, A., Succa, S., Sanna, C., Carraro, V. y Coroneo, V. 2016. Microbiological Quality of the Water used in Agriculture in Sardinia. Ann Ig. 28: 158-170.
- Savin, C., Leclercq, A. y Carniel, E. 2012. Evaluation of a Single Procedure Allowing the Isolation of Enteropathogenic *Yersinia* along with Other Bacterial Enteropathogens from Human Stools. PLoS One. 7: 1-8.
- Schwentesi, R. y Sangerman, D. 2014. Desempeño competitivo de la fruticultura mexicana, 1980-2011. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 5: 1287-1300.
- SENASICA. 2010. Anexo Técnico 1. Requisitos Generales para el Reconocimiento y Certificación de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación en la Producción Primaria de Alimentos de Origen Agrícola. [consultado 12 enero 2017]. Disponible en: <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=15261>
- Shamsul, B.M.T., Adamu M.T., Mohd, M.N. y Khairani, S. 2016. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Enterobacteriaceae* on Hands of Workers in Halal Cattle Abattoirs in Peninsular Malaysia. Malays J Med Sci. 23(5): 65-71.
- Steiner, M., Akwaa, O., Vuvor, F. y Tano, K. 2016. Quality evaluation of processed clay soil samples. Pan Afr Med J. 24: 1-6.
- Strawn, L.K. y Danyluk, M.D. 2010. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. International Journal of Food Microbiology. 138: 78-84.
- Strawn, L.K., Fortes, E.D., Bihn, E.A., Nightingale, K.K., Gröhn, Y.T., Worobo, R.W., Wiedmann, M. y Bergholz, P. 2013. Landscape and Meteorological Factors Affecting Prevalence of Three Food-Borne Pathogens in Fruit and Vegetable Farms. Applied and Environmental Microbiology. 79: 588-600.
- Vázquez, C., Gallegos, M.A., Salazar, E., Orona, I., García, J.J., Trejo, H.I. y Mendoza, S.S. 2015. Manure Solarization from Cattle, Goat and Poultry and its Effect on Survival of *Salmonella* spp. Journal of Pure and Applied Microbiology. 9: 151-158.
- Vera, A.M., Venegas, A.M., Pertuz, S.L. y Agulo, R. 2015. Análisis de los factores medioambientales condicionantes de la inocuidad de hortalizas cultivadas y consumidas en el área rural de Tenjo, Colombia. Rev. Fac. Med. 63: 57-68.
- Weiler, N., Orrego, M., Alvarez, M., Huber, C., Ortiz, F., Nuñez, L., Piris, L. y Perez J. 2017. Primeros resultados de la vigilancia integrada de la resistencia antimicrobiana de patógenos transmitidos por alimentos, *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp en tres poblaciones distintas. Paraguay. 2011-2012. Mem Inst Investig Cienc Salud. 15: 64-72.
- White, I.R., Blake, R.S., Taylor, A.J. y Monks, P.S. 2016. Metabolite profiling of the ripening of Mangoes *Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins' by real-time measurement of volatile organic compounds. Metabolomics. 12: 1-9.
- Woodford, N., Reddy, S., Fagan, E.J., Hill, R.L., Hopkins, K.L., Kaufmann, M.E., Kistler, J., Palepou, M.I., Pike, R., Ward, M.E., Cheesbrough, J. y Livermore, D.M. 2007. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC b-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 59: 102-105.
- Yao, Z., Wang, H., Wu, L., Wu, J., Brookes, P. y Jianming, Xu. 2014. Interaction between the Microbial Community and Invading *Escherichia coli* O157:H7 in Soils from Vegetable Fields Applied and Environmental Microbiology. 80: 70-76.