



Artículo científico

DOI:10.5281/zenodo.10658643

Evaluación de la calidad microbiológica de hortalizas tratadas con preparados bioorgánicos en la Asociación Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO de R. L.)

Evaluation of the microbiological quality of vegetables treated with bioorganic preparations in the Cooperative Association of Agricultural Products and Multiple Services Organic Products

Gómez-Orellana, R.E.¹

Correspondencia:
ernesto.gomez@ues.edu.sv

Presentado:
22 de enero de 2021
Aceptado:
10 de junio de 2021

1 Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Protección Vegetal. Docente de Microbiología y de Calidad e Inocuidad de Productos Agroindustriales

RESUMEN

La investigación consistió en determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en cuatro hortalizas cultivadas orgánicamente: rábano (*Raphanus sativus*), cebollín (*Allium schoenoprasum*), cilantro (*Coriandrum sativum*) y lechuga (*Lactuca sativa* L. var. longifolia), con preparados bioorgánicos: gallinaza, bocashi y EM-5. También se investigó la presencia de coliformes fecales en agua de riego por aspersión. Los análisis microbiológicos del agua de riego por aspersión en las parcelas, reflejaron estar contaminadas con coliformes fecales, esto indica que no es aceptable para la irrigación de los cultivos. Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos para determinación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, en las hortalizas frescas, reflejaron que de 20 muestras analizadas, solamente dos (rábano y lechuga) de parcelas diferentes, resultaron con presencia de *Escherichia coli*. En el caso de *Salmonella*, no se detectó el patógeno. En las muestras de preparados bioorgánicos: gallinaza, bocashi y EM-5 utilizados en los cultivos, no se detectó *Escherichia coli*. La *Salmonella*, tampoco se encontró en bocashi y gallinaza. El EM-5, tampoco resultó con este patógeno al observarse en los medios XLD y *Salmonella Shigella* ausencia de crecimiento bacteriano. Se elaboró un manual titulado "Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos" para promover las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) como herramienta para reducir riesgos, peligros microbiológicos y garantizar hortalizas seguras para el consumo, se capacitó a productores asociados a la Cooperativa.

Palabras clave: gallinaza, bocashi, EM-5, *Escherichia coli*, *Salmonella*, Coliformes fecales.

ABSTRACT

The research consisted of determining the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in four organically grown vegetables: radish (*Raphanus sativus*), chives (*Allium schoenoprasum*), coriander (*Coriandrum sativum*) and lettuce (*Lactuca sativa* L. var. longifolia), with bioorganic preparations: chicken manure, bocashi and EM-5. The presence of fecal coliforms in spray irrigation

water was also investigated. The microbiological analysis of the sprinkler irrigation water in the plots showed that it was contaminated with fecal coliforms, which indicates that it is not acceptable for crop irrigation. The results obtained from the microbiological analysis for *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in fresh vegetables showed that out of 20 samples analyzed, only two (radish and lettuce) from different plots showed the presence of *Escherichia coli*. In the case of *Salmonella*, the pathogen was not detected. In the samples of bioorganic preparations: chicken manure, bocashi and EM-5 used in the crops, *Escherichia coli* was not detected. *Salmonella* was also not found in bocashi and poultry manure. EM-5 was also free of this pathogen, as no bacterial growth was observed in the XLD and Salmonella Shigella media. A manual entitled "Good Agricultural Practices. Fertilizers and Bioorganic Products" was prepared to promote Good Agricultural Practices (GAP) as a tool to reduce risks, microbiological hazards and ensure safe vegetables for consumption. Producers associated with the Cooperative also received training.

Key words: chicken manure, bocashi, EM-5, *Escherichia coli*, *Salmonella*, Fecal coliforms.

INTRODUCCIÓN

El consumo de hortalizas es vital para la salud humana, ya que poseen innumerables propiedades alimenticias, son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía (Rivera *et al.* 2009). Sin embargo, por su naturaleza física y química, están expuestas a ser contaminadas por diversos microorganismos y entre estos ciertos de patógenos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (Rivera *et al.* 2009).

Dentro de su cadena de producción, las hortalizas al manejarlas agrónomicamente y cosecharlas en el campo, se exponen a patógenos que pueden llegar a diversas fuentes y formas, entre las que se destacan: manipuladores, insumos utilizados para el cultivo y las herramientas de trabajo, entre otros. La agricultura orgánica, es una modalidad alternativa a la agricultura convencional, que busca la producción de alimentos hortícolas más saludables. Para tal fin, es imprescindible que en el manejo agronómico se usen materiales bioorgánicos a base de ingredientes de origen animal y/o vegetal, entre ellos: fertilizantes e insecticidas, y descartar el uso de agroquímicos sintéticos. No obstante, por su composición, el uso de éstos preparados bioorgánicos en el cultivo de las hortalizas, representa un riesgo de contaminación de patógenos importantes al que debe prestársele importancia, ya que muchas hortalizas son consumidas en fresco. Patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, pueden ser transportados mediante estos preparados. Los patógenos bacterianos

asociados con los alimentos han sido muy bien descritos. Un amplio número de estos se han visto implicados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados con el consumo de frutas y hortalizas frescas (Rivera *et al.* 2009).

Escherichia coli

Forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente. Su importancia radica en servir como índice sanitario en la microbiología sanitaria, tomándose como contaminante fecal de los alimentos y el agua (Torres 2008).

Salmonella sp.

Es una bacteria patógena para el hombre. Produce una enfermedad de origen alimentario conocida como salmonelosis, que se presenta en formas esporádica y de brotes. Es la causa más común de ETA en diversos países (Torres 2013)

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo, lugar y época de la investigación

La investigación fue de campo y experimental. Se hizo en ACOPO DE R. L., en época seca en parcelas de productores orgánicos. Los análisis microbiológicos en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. Los resultados se compararon con el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08;

“Alimentos Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos” (RTCA s.f.).

Estos mismos patógenos se investigaron en preparados bioorgánicos utilizados en los cultivos: bocashi, Gallinaza y EM-5. También se investigó Coliformes Fecales en agua de riego, según dicta el “Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales de Costa Rica” (Ministerio de Ambiente y Energía y Ministerio de Salud 2007).

Muestreo de hortalizas

En cada parcela se tomaron 100 gramos (g) por cada hortaliza. También datos informativos y georreferenciales de las parcelas.

Metodología estadística para muestreo de las hortalizas.

Se determinó en cada una de las parcelas, la producción en libras de cada una de las hortalizas cosechadas. Se obtuvo un total por hortaliza de las cinco parcelas. Se sumaron las producciones de las cuatro hortalizas, se totalizó en libras (Valor “N”) y para determinar la población total del universo de muestreo, se utilizó la fórmula¹:

$$n = \frac{N(Z\alpha)^2 (p/q)}{(d)^2 (N-1) + (p/q)}$$

Dónde:

n= población total del universo de muestreo.

N= total de libras de todas las hortalizas producidas en las seis parcelas en cierto tiempo.

$(Z\alpha)^2 = 1.96^2$ si se trabaja al 95%

p= proporción máxima esperada, si las hortalizas están contaminadas (se asume como máximo el 50%= 0.5).

q= 1-p= (1-0.5)= 0.5

d= precisión al 5%

¹ Rivas, A. 6 ago. 2015. Métodos de muestreo (mesa redonda). San Salvador, El Salvador, UES.

El valor “n” representó al 100%. Con base a eso se calculó el porcentaje correspondiente de cada hortaliza, según su producción de cosecha (libras) y según dicho porcentaje, se aplicó regla de tres simple para calcular las libras de cada hortaliza para extraer de allí 100 gramos, como muestra definitiva para la hortaliza en cuestión. Se tomó 100 gramos por cada hortaliza. Las plantas se seleccionaron al azar. Los 100 gramos se trasladaron en bolsas ziploc y en hieleras al laboratorio (A. Rivas, comunicación personal, 4 de octubre de 2015).

Muestreo de Bocashi

Se determinó la cantidad total de bocashi almacenado. Se aplicó la misma fórmula utilizada en el muestreo de hortalizas, para calcular la cantidad (libras) a tomar en cuenta para extraer 100 gramos. Estos se depositaron en una bolsa ziploc y se trasladaron al laboratorio en hielera.

Muestreo de EM-5

En un recipiente estéril se depositó 1 L de EM-5 a partir de su almacenaje. Se depositó en hielera y se trasladó al laboratorio.

Muestreo de gallinaza

Se determinó la cantidad total de gallinaza almacenada. Se aplicó la misma fórmula utilizada en el muestreo de hortalizas para calcular la cantidad (libras) a tomar en cuenta para extraer 100 gramos estos se depositaron en una bolsa ziploc y se trasladaron al laboratorio en hielera.

Muestreo del agua de riego

El agua de las parcelas se hizo directamente de los aspersores. Se utilizó recipientes plásticos estériles y se colocaron en los aspersores funcionando. Las muestras se trasladaron al laboratorio en hielera.

Análisis microbiológicos

Para la determinación de *Escherichia coli* en hortalizas y preparados bioorgánicos se empleó la técnica de recuento estándar de colonias en placas

y se utilizó placas Petrifilm. Se pesaron 25 gramos de la muestra, se hizo diluciones y posteriormente la siembra y la incubación por 24 horas a 35°C. Para *Salmonella spp.*, los medios utilizados y el protocolo desarrollado consistió en: i) preenriquecimiento (Caldo lactosado 24 hrs/35°C), ii) enriquecimiento selectivo (Rappaport (24 hrs/42°C) y Tetratonato (24 hrs/35°C)), iii) Prueba presuntiva (Agar XLD y *Salmonella-Shigella* (24hrs/35°C)) y iv) pruebas confirmativas (Voges Proskauer, Indol, TSI, Rojo de Metilo y Movilidad (MIO) 24hrs/35°C) (Universidad de El Salvador 2013). Los resultados se compararon con los criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centroamericano correspondiente al grupo de frutas y vegetales frescos (RTCA s.f.).

Para la determinación de Coliformes fecales en agua, se empleó la técnica del Número Más Probable (NMP) (Aycachi 2008). Se inoculó 10, 1 y 0.1 ml en tres series de cinco tubos. Los medios utilizados y el protocolo desarrollado consistió en: i) Prueba presuntiva (Caldo LMX Fluorocult 24hrs/35°C) y ii) prueba confirmativa (Caldo EC 48hrs/44.5°C).

Elaboración de Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de fertilizantes bioorgánicos

Se creó un manual técnico titulado: “Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la Elaboración de Fertilizantes Bioorgánicos”, con el fin de entregarlo a ACOPO de R. L. y a productores asociados, para que sea un documento práctico de consulta en un momento determinado. Se escribió de manera comprensible para dar a conocer aspectos importantes y fundamentales relacionados con la preparación, manejo y aplicación de fertilizantes bioorgánicos y otros preparados bioorgánicos bajo la modalidad de Buenas Prácticas Agrícolas.

La información contenida en el manual se obtuvo de fuentes bibliográficas confiables, y se enriqueció con dibujos y fotografías para facilitar la comprensión del mensaje a transmitir.

Capacitación sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la elaboración de preparados bioorgánicos

Se realizó una capacitación dirigida a productores asociados a ACOPO de R. L. para dar a conocer los resultados obtenidos en la investigación y presentar tópicos importantes sobre Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas en la elaboración de preparados bioorgánicos en la producción de hortalizas bajo la modalidad de agricultura orgánica. Para tal actividad, se convocó a los productores de la Cooperativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Verificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en hortalizas frescas

Escherichia coli

Se analizaron las 20 muestras de hortalizas obtenidas de las cinco parcelas. Se utilizaron placas petrifilm. Se buscó la formación de colonias características; *E. coli*: colonias azules con formación de gas (Petrifilm Microbiology 2009) (Figura 1).

Figura 1

Placa Petrifilm: *E. coli* (Coliformes fecales; azules con formación de gas)



Se hizo recuento de colonias características de *E. coli*. De las 20 muestras de hortalizas analizadas, solamente rábano y lechuga de dos parcelas diferentes, presentaron *Escherichia coli*, en todas las demás no se encontró este patógeno. Las hortalizas fueron irrigadas por aspersión, para lo cual, FDA-CFSAN (1998), señalan que el agua puede transmitir muchos microorganismos, como las variedades patógenas de *Escherichia coli*.

El rábano y la lechuga, hortalizas con hojas anchas y rugosas, son más vulnerables a la adopción de

patógenos (FDA-CFSAN 1998), indicando que las hortalizas con superficies amplias, se puedan adherir con facilidad o quedar atrapados organismos patógenos (superficies rugosas, por ejemplo), teniendo mayor riesgo de contaminación.

La irrigación de las hortalizas se efectúa principalmente por la mañana, por tanto, Bihn *et al.* (2004), mencionan que al aplicar riego por aspersión durante la mañana, genera máxima eficiencia del uso de agua y reduce el tiempo de secado de las hojas. Un secado rápido y la luz ultravioleta reduce la supervivencia de los patógenos, tanto de vegetales como de humanos, en los cultivos. Esto puede explicar en parte la ausencia de *Escherichia coli* en las demás hortalizas.

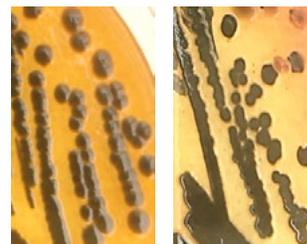
Las 20 muestras de hortalizas representan un 100%, con esto se puede decir que solo un 10% resultó con contaminación. La mayoría de las hortalizas pueden consumirse con la seguridad de que no causarán enfermedad por *Escherichia coli*.

Salmonella spp.

El género *Salmonella* está constituido por dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Cepas de *S. enterica* subesp. *Entérica*, habitan en animales de sangre caliente, mientras que el resto de cepas pertenecientes a la especie *bongori*, habitan en animales de sangre fría y medio ambiente. Para la verificación de *Salmonella spp.* en las muestras de hortalizas se utilizó los agares XLD y Salmonella Shigella. La selectividad en Agar Salmonella- Shigella y XLD es alta (Terragno *et al.* 2008).

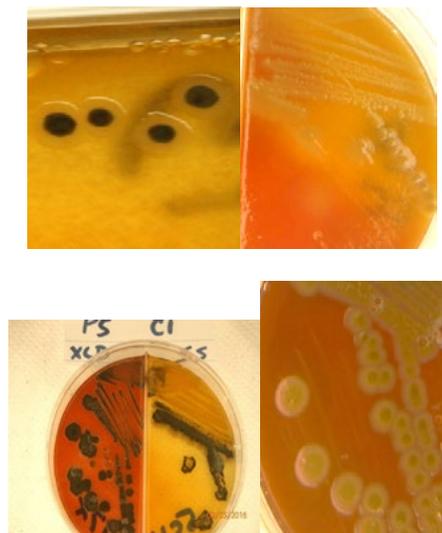
Se buscaron posibles colonias sospechosas. En Agar Salmonella-Shigella (SS) las colonias características se presentan incoloras, transparentes con centro negro debido a la reducción del azufre y halo delgado claro. Estas bacterias no fermentan la lactosa en este medio, a diferencia de otras bacterias entéricas que si lo hacen como *Proteus* y que también reducen el azufre (Leboffe y Pierce 2011), como resultado de la fermentación de lactosa se produce viraje de color (Figura 2).

Figura 2
Crecimiento de variadas colonias y viraje de color en agar Salmonella-Shigella



El Agar XLD es un medio selectivo y diferencial que contiene desoxicolato de sodio, xilosa, L-lisina y citrato de amonio férrico. La xilosa es un hidrato de carbono fermentable, la L-lisina es un aminoácido para la descarboxilación y el citrato de amonio férrico es un indicador de reducción de azufre. El rojo fenol es amarillo cuando es ácido y rojo o rosa cuando es alcalino, este funciona como indicador de pH. Los organismos que fermentan la xilosa acidificarán el medio y producirán colonias amarillas. Organismos como *Proteus* son capaces de reducir el azufre, produciendo un precipitado negro (Leboffe y Pierce 2011). Las especies de *Salmonella* aparecen como colonias rojas con centros negros (Terragno *et al.* 2008), esto debido a la reducción de azufre (Figura 3). Las colonias de Salmonella se muestran en el Cuadro 1.

Figura 3
Crecimiento de variadas colonias en agar XLD



Cuadro 1

Determinación de colonias sospechosas de *Salmonella spp.* en Agar XLD y Agar *Salmonella-Shigella* (ASS) en muestras de hortalizas

Parcela	Muestra Hortaliza	Colonias sospechosas	
		ASS	AXLD
1	Cilantro	X	X
	Lechuga	X	X
3	Cebollín		X
	Rábano		X
5	Cilantro	X	X

Se pasaron a pruebas bioquímicas las colonias sospechosas por reducir el azufre con producción de H₂S, mostraron color negro. Las pruebas bioquímicas empleadas; y recomendadas entre otras por Le Minor y Richard, citados por autores (Terragno *et al.* 2008), fueron de Indol, Movilidad, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y TSI.

La mayoría de las serovariedades (99.8%) de *Salmonella* aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* y tienen propiedades bioquímicas características (Terragno *et al.* 2008) (Cuadro 2).

Cuadro 2

Reacciones a Pruebas bioquímicas de *Salmonella spp*

<i>Salmonella spp.</i>				
I	RM	VP	MIO	TSI
-	+	-	+	K/A (H ₂ S)

I: Indol, RM: Rojo de Metilo, VP: Voges Proskauer, MIO: Movilidad Indol Ornitina, TSI: Tres azucares y hierro.
Fuente: Terragno, 2008

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas a partir de colonias sospechosas, según muestra de hortaliza (Cuadro 3), se observa que las cinco pruebas bioquímicas no son iguales, no coinciden todas al compararse con resultados indicados en el Cuadro

2, según debería ser para especies de *Salmonella*. Por ejemplo, ninguna prueba de TSI resultó ser K/A, por tanto, no hubo fermentación de glucosa y ninguna produjo H₂S, esta prueba fue determinante para confirmar la ausencia de *Salmonella* en las muestras. Estudios de Terragno *et al.* (2008), indican que en aislamientos de *Salmonella spp.*, el 100% han reaccionado positivamente a la prueba TSI en la fermentación de glucosa, produciéndose resultados alcalino sobre ácido (K/A), y un 91.6% con producción de H₂S. También, en la mayoría de los casos, los resultados de la prueba rojo de metilo y de Voges Proskauer son similares, es decir positivas. Al respecto, estudios realizados (Terragno *et al.* (2008), señalan que el 100% de aislamientos han reaccionado negativo a la prueba Voges Proskauer y que la mayoría de los miembros de la familia Enterobacteriaceae, a la cual pertenece *Salmonella*, dan reacciones opuestas entre el rojo de metilo y VP.

Por tanto, al no coincidir completamente todas las reacciones y al destacar los resultados en la prueba del TSI, todas las muestras de hortalizas estudiadas resultaron negativas para patógeno.

Al determinarse ausencia en las muestras de hortalizas y comparar estos resultados con los criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA s.f.) (Cuadro 4), se reporta que estas son aceptables para el consumo y que por haber ausencia de *Salmonella spp.* no representan riesgo de contraer enfermedad al consumirse.

Cuadro 3

Resultados de pruebas bioquímicas a colonias sospechosas en agares XLD y SS en muestras de hortalizas

P	MH	AGAR XLD/SS	I	RM	VP	MIO	TSI
1	Ci	XLD	-	+	+	+	A/A H ₂ S
		SS	-	+	+	+	A/A

P	MH	AGAR XLD/SS	I	RM	VP	MIO	TSI
	Le	XLD	-	-	+	-	A/A
		SS	-	+	+	+	A/A H2S
3	Ce	XLD	-	+	+	+	A/A H2S
		SS	-	+	+	+	A/A H2S
	Rá	XLD	-	+	+	+	A/A H2S
5	Ci	XLD	-	-	-	+	A/A
		SS	-	+	+	-	A/A

P: Parcela, MH: Muestra hortaliza, Ci: Cilantro, Le: Lechuga, Ce: Cebollín, Ra: Rábano, XLD: Agar Xilosa Lisina Descarboxilasa, Agar Salmonella-Shigella, I: Indol, RM: Caldo Rojo de Metilo, VP: Caldo Voges Proskauer, MIO: Medio Movilidad Indol Ornitina, TSI: Triple Azúcar Hierro, A/A: ácido sobre ácido, H2S: ácido sulfhídrico.

Cuadro 4

Criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centroamericano para hortalizas en relación a *Salmonella* y *E. coli*.

Parámetro	Límite máximo permitido
<i>Salmonella ssp/25 g</i>	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	10 ² UFC/g

Fuente: Tomado del Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 67.04.50:08

Cuantificación de Coliformes Fecales en agua para riego de hortalizas frescas.

El agua aplicada en los cultivos, proviene de un río cercano de la zona y esta se conduce en tubería por gravedad hasta las parcelas, en donde -con el empleo de aspersores- se lleva a cabo el riego (Figura 4). El agua superficial es la fuente más común para la irrigación de cultivos de hortalizas; sin embargo, se considera como posible fuente de microorganismos peligrosos, ya que puede tener patógenos que causan enfermedades (Bihn *et al.* 2004). En los lugares donde se desconoce o no se pueda controlar dicha calidad, se debe considerar la adopción de prácticas de riego adecuadas para reducir el contacto entre el agua y la parte comestible del cultivo (Quintanilla 2014). La comunidad científica en general coincide en que las prácticas de riego que exponen la parte comestible de las plantas al contacto directo con agua contaminada,

pueden incrementar el riesgo microbiológico (FDA-CFSAN 1998).

Figura 4

Riego con aspersores en las parcelas.

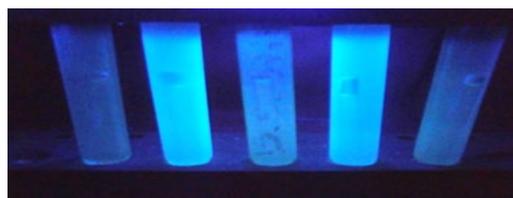


Bihn *et al.* (2004), recomiendan utilizar riego por goteo siempre que sea posible. Este método reduce el riesgo de contaminación de los cultivos, porque las partes comestibles de la mayoría de los cultivos no se mojan directamente.

Se empleó Caldo LMX Fluorocult para investigar coliformes fecales. Viraje de color y fluorescencia del medio: coliformes fecales (Universidad de El Salvador 2013) (Figura 5).

Figura 5

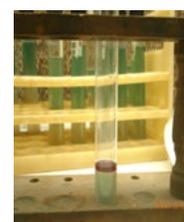
Caldo LMX Fluorocult fluorescentes; positivo para coliformes fecales (*E. coli*).



Se realizó también prueba de Indol en los tubos positivos fluorescentes, dando como resultado reacción positiva a la detección de este producto metabólico químico como resultado de la degradación del triptofano (Figura 6).

Figura 6

Detección de indol con reactivo de Kovac (anillo rojo) como prueba confirmatoria de presencia de *E. coli*.



A partir de los tubos positivos, se inoculó en tubos con Caldo EC, para confirmar la presencia de coliformes fecales. Los tubos con turbidez y formación de gas en campana de Durham indicaron positivo para *Escherichia coli* (Coliformes fecales) (Figura 7).

Figura 7

Caldo EC sin inocular y con turbidez y formación de gas en campana de Durham, indicativos de crecimiento de *E. coli*.



Se utilizó el Número Más Probable (NMP) por mililitro de agua para detectar coliformes fecales, según muestra de agua por parcela (Cuadro 5).

Cuadro 5

NMP de Coliformes Totales y Coliformes Fecales por mililitro de agua en muestra de agua de río

N° Parcela	Caldo LMX (Valores NMP/ml de agua en muestras de agua de riego).	
	Coliformes Fecales	
1	23	
2	33	
3	49	
4	79	
5	63	

Las cinco muestras resultaron contaminadas con coliformes fecales, esto indica que no es agua aceptable para la irrigación de los cultivos. Si bien es cierto, los coliformes fecales están presentes en el agua, en cantidad que no superan los 1000 NMP/100 ml por muestra que señala la "Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales" de Costa Rica (Ministerio de Ambiente y Energía y Ministerio de Salud 2007). Esto significa que el agua en su uso

es segura para que las hortalizas no representen riesgo de enfermedad al ser consumidas. El agua preferiblemente debe ser potable, ya que contacta directamente a alimentos frescos de consumo inmediato, consecuentemente para el caso, ésta no es recomendable para una producción libre de patógenos, pero es aceptable de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 6.

Cuadro 6

Criterio microbiológico para valorar la calidad microbiológica del agua de riego en hortalizas frescas

Parámetro	Límite máximo permitido en NMP/100 ml para la utilización del agua
Coliformes fecales NMP/100 ml	1000 CF

Fuente: Ministerio de Ambiente y Energía y Ministerio de Salud 2007.

El agua de uso agrícola es frecuentemente un recurso compartido. En algunas regiones procede de aguas superficiales que recorren ciertas distancias antes de llegar al área de cultivo (Quintanilla 2014).

Al trasladar el agua mediante tubería directamente del río hacia las parcelas, se demuestra que este es fuente y vehículo de coliformes fecales (Figura 8). Investigadores de la Universidad de California concluyeron tras previos estudios de la calidad del agua de riego que 1,000 coliformes fecales en 100 ml de agua era aceptable basado en estudios de sobrevivencia de varios patógenos en las hortalizas. Si se utiliza agua superficial para el riego por aspersión, se debe examinar la fuente de agua (Bihn *et al.* 2004).

La calidad del agua puede ser más importante en casos donde entra en contacto directo con la parte comestible de la planta, especialmente cerca del periodo de cosecha. El conocimiento de la calidad del agua de riego determinará en la selección de las prácticas de riego que reduzcan los riesgos de esparcir

patógenos al producto fresco. Los riesgos de microbios en el riego por aspersión son reducidos al utilizar agua potable (Bihn *et al.* 2004).

Figura 8

Pileta para provisión de agua en río donde se conectan tubos que la trasladan hacia las parcelas



El agua de río no es potable, por tanto, no es de buena calidad microbiológica para ser empleada en la irrigación de las hortalizas. Esta agua –conducida en tubos ensamblados– se contamina en los puntos de unión de los tubos donde han sido enmendados artesanalmente.

Determinación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en preparados bioorgánicos

Los preparados utilizados en las parcelas son gallinaza, bocashi y EM-5. La gallinaza la compran los productores y generalmente a un mismo proveedor, el bocashi y el EM-5 son preparados por ciertos productores asociados a la Cooperativa, quienes los comercializan a los otros productores para el uso en sus diferentes parcelas. Se recolectó una muestra de gallinaza por cada parcela, y una muestra de bocashi y EM-5.

Escherichia coli

Se emplearon placas petrifilm, se realizó recuento de colonias características de la misma manera que se hizo para investigar este patógeno en las hortalizas. Tanto en la gallinaza, como en el bocashi y el EM-5, no se encontró presencia del patógeno. Esto significa que los preparados bioorgánicos son seguros y se pueden aplicar a los cultivos de las hortalizas, ya que no suponen riesgos microbiológicos de contaminación con este patógeno.

Salmonella spp.

Para el análisis microbiológico y la observación de colonias sospechosas al igual que para los análisis de las hortalizas, se emplearon los mismos medios de cultivos y pruebas bioquímicas como medios confirmatorios. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 7.

Se observaron las reacciones preestablecidas que tiene *Salmonella spp.* a las pruebas bioquímicas empleadas, mostradas en el Cuadro 2. En el caso de las cinco muestras de gallinaza, al compararse los resultados obtenidos con los indicados en el referido cuadro, se evidencia que no coinciden los resultados de todas las pruebas –si bien algunas–, y en ninguna de las pruebas de TSI se presentó producción de ácido sulfhídrico, que es una propiedad fisiológica característica de este patógeno. En la mayoría de los casos la prueba de Indol reportó ser positivo, esto no corresponde a lo preestablecido por la bacteria que indica lo contrario, es decir, negativo. También, en la mayoría de casos los resultados de las pruebas Rojo de metilo y de Voges Proskauer son similares, lo que contrasta con los resultados preestablecidos que indican que éstos deben ser opuestos.

Lo anterior demuestra que el empleo de este biopreparado por los productores en los cultivos es seguro para este patógeno, además de ser incorporado al suelo antes de la siembra. Bihn *et al.* (2004), sugieren la incorporación, puesto que se sabe que muchos patógenos perjudiciales no sobreviven por mucho tiempo en el suelo.

En el caso del bocashi, las pruebas de Indol y Voges Proskauer resultaron positivas, esto demuestra la no confirmación del patógeno *Salmonella*, ya que como se presenta en el Cuadro 2, este patógeno es negativo a las mismas. Además, no existió producción de ácido sulfhídrico en la prueba de TSI (a pesar de la fermentación de glucosa manifestado por ser K/A). Por tanto, esté preparado bioorgánico no se considera vehículo de este patógeno, por tanto es seguro su empleo en el cultivo de las hortalizas.

Cuadro 7

Determinación de *Salmonella spp.* en muestras de preparados bioorgánicos

Parcela	PB	Colonias sospechosas <i>Salmonella spp.</i>		Pruebas Bioquímicas				
		ASS	A XLD	I	RM	VP	M I O	TSI
1	G	X		-	-	-	-	A/A
2	G		X	-	-	+	-	K/A GAS
3	G		X	+	-	+	+	K/A GAS
4	G	X	X	+	+	+	+	K/A GAS
5	G		X	+	-	-	-	K/A
	B	X		+	+	+	+	K/A GAS
EM-5		Ninguna	Ninguna					

PB: Preparado Bioorgánico, G: Gallinaza, B: Bocashi, ASS: Agar Salmonella-Shigella, AXLD: Agar Xilosa Lisina Descarboxilasa, RM: Rojo de Metilo, VP: Voges Proskauer, MIO: Movilidad Indol Ornitina, TSI: Agar Triple Azúcar y Hierro, A/A: ácido sobre ácido, K/A: alcalino sobre ácido.

El bocashi como preparado bioorgánico, es elaborado localmente para luego ser comercializado a los productores asociados a ACOPO de R. L., se elabora con materiales sólidos de desecho: carbón, granza, melaza, lechugas y gallinaza, entre otros (que contiene estiércol de gallinas). La materia fecal animal es una fuente conocida de microorganismos patógenos que puede causar enfermedades transmitidas por los alimentos. El bocashi, como parte de su preparación se voltea diariamente para que los procesos químicos-biológicos internos se lleven a cabo eficazmente. Los desechos biológicos sólidos constituyen un fertilizante inócuo y efectivo si se tratan debidamente (FDA-CFSAN 1998).

Se puede utilizar una variedad de tratamientos para reducir los microorganismos patógenos. Estos tratamientos se basan principalmente en el paso del tiempo y en factores ambientales (como la presencia de rayos ultravioletas) para reducir el nivel de microorganismos patógenos (FDA-CFSAN 1998).

El tratamiento del bocashi, se lleva a cabo en un área alejada de los cultivos y una vez finalizado el proceso,

se deja pasar el tiempo y se mantiene almacenada (Figura 9) antes de aplicarse a las parcelas. (Bihn *et al.* (2004), instruyen que se debe almacenar lo más lejos posible de las áreas en que se cultivan y se manejan las hortalizas frescas, como mecanismo para evitar su contaminación.

Se desconoce hasta qué punto los microorganismos patógenos que sobreviven al tratamiento pueden volver a multiplicarse en el estiércol tratado que se almacena antes de su utilización. En la conversión del estiércol en abono (como el estiércol contenido en la gallinaza), es importante dejar pasar el tiempo. Al igual que en otros tratamientos esto reduce los microorganismos patógenos (FDA-CFSAN, 1998).

En el caso del EM-5, no se hizo análisis con pruebas bioquímicas, porque no hubo crecimiento bacteriano en los medios diferenciales, es decir, en los agares XLD y SS (Figura 10). Al no producirse crecimiento, se confirma ausencia del patógeno.

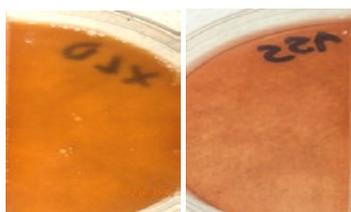
Figura 9

Almacenamiento de bocashi en área alejada de los cultivos, donde se deja pasar el tiempo antes de aplicarse a las parcelas



Figura 10

Ausencia de crecimiento en agares XLD y Salmonella Shigella



Elaboración de manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y productos bioorgánicos.

Se elaboró un manual técnico titulado: “Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos” (Figura 11), dirigido principalmente a productores asociados a ACOPO de R. L. quienes utilizan en sus cultivos algunos fertilizantes y otros productos preparados de manera bioorgánica.

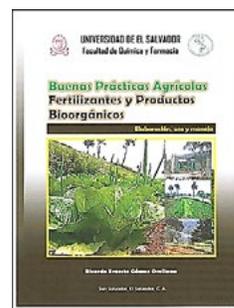
El manual se elaboró con la finalidad de apoyar en el conocimiento y uso de productos bioorgánicos. Los productores que utilicen estiércol o desechos biológicos sólidos, tienen que adoptar las instrucciones del manual “Buenas Prácticas Agrícolas” para reducir en lo posible el riesgo microbiológico. El manual contiene sugerencias o consejos de buenas prácticas aplicables en las diferentes etapas de desarrollo de los cultivos, desde la selección de la parcela antes de la siembra hasta la cosecha y actividades de poscosecha. El uso del manual “Buenas Prácticas Agrícolas”, puede reducir el riesgo de contaminación microbiológica de hortalizas (FDA-CFSAN 1998).

Las sugerencias están enfocadas al uso del agua, manejo del suelo, uso de fertilizantes, actitud de trabajadores agrícolas, condiciones de instalaciones,

entre otros, y manifiestan de manera implícita la importancia de atenderlos en la medida de lo posible para la producción de hortalizas inocuas. El manual se entregó formalmente en un acto oficial preparado en las instalaciones de ACOPO de R. L.

Figura 11

Portada de Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos



Capacitación a productores de ACOPO de R.L. sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la Elaboración de Fertilizantes y Productos Bioorgánicos.

Se desarrolló en ACOPO de R. L., capacitación a cerca de las buenas prácticas agrícolas (APA) en la elaboración de fertilizantes y productos bioorgánicos. Es imprescindible contar con trabajadores agrícolas capacitados para la labor que desempeñarán (Quintanilla 2014). La capacitación fue dirigida a productores de hortalizas frescas cultivadas orgánicamente asociados a la Cooperativa. En la capacitación se expuso definiciones, importancia y sugerencias relativas a las BPA, dentro de las cuales se enfatizó la importancia de aplicarlas en la elaboración, manejo y uso de productos bioorgánicos utilizados por ellos en sus parcelas.

Como resultado de ésta capacitación, los productores obtuvieron conocimiento de los riesgos y peligros asociados con malas prácticas agrícolas, con el mal uso y manejo de productos bioorgánicos, tomando en consideración la falta de higiene y la creación de ambientes favorables para patógenos. También, se enfatizó en la importancia de cultivar hortalizas libre de patógenos y por consiguiente que no enfermen a la población que los consume frescos.

CONCLUSIONES

Las hortalizas frescas analizadas microbiológicamente en este estudio, son inocuas en el 90% y 100% para el caso de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, respectivamente.

El riego por aspersión no es el adecuado para el cultivo de las hortalizas, el agua presentó coliformes fecales, sin superar los 1000 CF/100 ml que declara la normativa consultada.

Las hortalizas de hoja ancha como rábano y lechuga, son especialmente vulnerables a contaminación por patógenos a través del agua de riego, debido a que exponen mayor área superficial de contacto en sus hojas.

La aplicación de gallinaza, EM-5 y bocashi en el cultivo de las hortalizas no representa riesgo de contaminarlas.

El Manual “Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Fertilizantes y Productos Bioorgánicos”, es de gran beneficio para los productores de ACOPO de R.L., ya que les proporciona algunos principios básicos y prácticas recomendadas para reducir al mínimo el riesgo microbiológico en la producción de las hortalizas frescas.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO de R.L.) y a sus productores asociados por su colaboración para el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aycachi Inga R. 2008. Determinación de Coliformes Totales y Fecales. Método de recuento por dilución en tubo: NMP (En línea). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Escuela Profesional de Biología; Consultado 29 may. 2015. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos89/determinacion-coliformes-totales-fecales/>

determinacion-coliformes-totales-fecales.shtml

Bihn EA., Rangarajan, A., Gravani RB., Scott DL., Pritts MP, Vidal JR. 2004. La Seguridad de los Alimentos Empieza en el Campo: Una Guía para el Productor Buenas Prácticas Agrícolas para Frutas y Hortalizas Frescas. (en línea). New York, EEUU, Universidad de Cornell. 32p. Consultado 22 de Nov. 2020. Disponible en <https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/2210>

FDA-CFSAN (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA) - Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN)). 1998. Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, para Frutas y Hortalizas Frescas. (en línea). 50 p. Consultado 10 de Nov. 2015. Disponible en <https://www.fda.gov/media/77823/download>

Leboffe, MJ, Pierce BE. 2011. A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory. Morton Publishing, United States of America. 253 p.

Ministerio de Ambiente y Energía y Ministerio de Salud. 2007. Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales de Costa Rica (en línea). Decreto No. 33903-MINAE-S. Diario Oficial La Gaceta No. 178. Costa Rica. 16 p. Consultado 24 Nov 2015. Disponible en <https://www.aya.go.cr/centroDocumetacion/catalogoGeneral/Reglamento%20evaluaci%C3%B3n%20y%20clasificaci%C3%B3n%20de%20calidad%20de%20cuerpos%20de%20agua%20superficiales.pdf>

Petrifilm™ Microbiology 3M™. 2009. Guía de interpretación. Placas Petrifilm™ para el recuento de E. coli/Coliformes. (en línea) Consultado 24 de Sep 2016. Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

Quintanilla Escobar ZA. 2004. Manual ilustrado de buenas prácticas agrícolas para la producción con inocuidad de frutas y hortalizas, considerando el Cambio Climático. Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras (MDRyT). La Paz, Bolivia. 81 p.

RTCA s.f. Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos. Reglamento Técnico

- Centroamericano. NSO. RTCA. 67.04.50:08. (en línea). 36 p. Consultado 7 Ago. 2020. Disponible en https://www.oirsa.org/contenido/2017/El_Salvador_INOCUIDAD/26.%20RTCA%2067%2004%2050%2008%20CRITERIOS%20MICROBIOLOGICOS%20PARA%20LA%20INOCUIDAD%20DE%20ALIMENTOS.pdf
- Rivera Jacinto M, Rodríguez Ulloa C, López Orbegoso J. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamara. Rev Peru Med Exp Salud Pública; 26(1). Perú (en línea). Consultado 29 May. 2020. Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/medicina_experimental/v26_n1/pdf/a09v26n1.pdf
- Terragno R, Caffer M, Insztein N. 2008. Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp.* (en línea). Cordova, Argentina, Ministerio de Salud. Consultado 6 May. 2018. Disponible en http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Salmonella_2008.pdf
- Torres C. 2008. Temas de Higiene de los Alimentos. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. 387 p.
- Torres V. 2013. Riesgos asociados al consumo de alimentos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Guadalajara, México. 449 p.
- Universidad de El Salvador. 2013. Manual de laboratorio. Microbiología de alimentos. Facultad de Química y Farmacia, UES. CENSALUD. 56 p.