

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

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.).

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

PRESENTADO POR
ING. AGR. RICARDO ERNESTO GÓMEZ ORELLANA

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA, ENERO 2019

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

LIC. MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL:

LIC. CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO:

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

SECRETARIO:

MSc. ROBERTO EDUARDO GARCÍA ERAZO

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

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.).

COMITÉ DE TESIS

Ing. Agr. MSc. Andrés Wilfredo Rivas Flores
Docente Asesor y
Miembro del Tribunal Evaluador

Licda. MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos
Miembro del Tribunal Evaluador

Licda. MSc. Coralia de los Ángeles González
Miembro del Tribunal Evaluador y
Coordinadora de Maestría

Licda. MSc. Edith Alicia Torres de Cantón
Coordinadora de Posgrado

TESISTA

Ing. Agr. Ricardo Ernesto Gómez Orellana

Fecha de entrega: enero 2019

DEDICATORIA

A Dios Padre Todopoderoso y a su Hijo; Nuestro Señor y Salvador Jesucristo, por sus innumerables Gracias y abundantes Bendiciones, que en su infinita bondad y misericordia me han brindado *¡Laudetur Iesus Christus! ¡Alabado sea Jesucristo!*

A mis Padres: Ricardo Gómez Rivera y Ana Haydeé de Gómez, por sus ejemplos de fidelísimos Esposos y como Padre y Madre responsables de Familia. Les agradezco su amor siempre incondicional, sus oraciones, sus muestras de servicio, afecto y cariño, sus valorados sacrificios para sacarnos adelante y sus apoyos en lo necesario.

A mi hermana Claudia Gómez, por apoyarme generosamente y acompañarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios Padre Todopoderoso por haberme concedido esta gratificante oportunidad de superación profesional.

A mi Padres: Ricardo y Ana Haydeé, mi hermana Claudia y mi sobrino Eduardo, por sus muestras de afecto y de apoyo incondicional.

A mi Asesor: Ing. Agr. M. Sc. Andrés Wilfredo Rivas Flores; por su generoso apoyo, sugerencias y asesoría en este trabajo de tesis y por sus valiosos aportes en la revisión de la misma.

A mis Maestras Coralia de los Ángeles González y María Evelyn Sánchez de Ramos, por sus apoyos y enseñanzas durante mis estudios y trabajo de tesis. También por sus valiosos aportes en la revisión de la misma.

A Don Pedro Arriaga, presidente de ACOPO de R. L., por permitirme realizar este trabajo en la cooperativa y facilitarme el acceso hacia las diferentes parcelas.

A los Productores de ACOPO de R.L.; Don José Mauricio Hernández, Don Gerardo Hernández, Don Florencio Villanueva, Doña Aminta Landaverde y Doña Elena Díaz, por facilitarme el ingreso y la toma de muestras en sus parcelas.

A Bernardo Antonio Arriaga Landaverde y a Oscar Amilcar Arriaga Landaverde, por apoyarme en los muestreos de agua.

A los Ingenieros Leopoldo Serrano y Saira Santos, por apoyarme en viajes de campo.

A la Licenciada Rosmery Erroa y al M.V.Z. Rudy Ramos por apoyarme en laboratorio.

A mis amigas Glenda Guevara y Tatiana Burgos por apoyarme con medios de cultivos.

A todos aquellos amigo/as que de alguna manera me acompañaron en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	
CAPÍTULO I	
1. Introducción	xix
CAPÍTULO II	
2. Objetivos	22
CAPÍTULO III	
3. Marco Teórico	23
3.1. Bacterias patógenas asociadas a alimentos	25
3.1.1. Bacterias coliformes	25
3.1.2. Bacterias coliformes fecales	26
3.1.3. <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.4. <i>Salmonella spp.</i>	29
3.2. Preparados bioorgánicos y agua de riego	
3.2.1. Bocashi	32
3.2.2. Gallinaza	37
3.2.3. EM-5	38
3.2.4. Uso del agua en la producción de hortalizas	41
3.2.5. Estiércol, biosólidos y otros fertilizantes naturales	45
CAPÍTULO IV	
4. Metodología	49
4.1. Tipo de investigación	49
4.2. Lugar y época de la investigación	49
4.3. Toma de muestras de hortalizas, preparados bioorgánicos y agua para riego	50
4.3.1. Toma de muestras de las hortalizas en campo	50

4.3.2.	Toma de muestras de los preparados bioorgánicos	55
4.3.3.	Toma de muestra del agua de riego	56
4.4.	Análisis microbiológico de hortalizas, preparados bioorgánicos y agua para riego	57
4.4.1.	Análisis microbiológicos de hortalizas	57
4.4.2.	Análisis microbiológicos de Bocashi, EM-5 y gallinaza	59
4.4.3.	Análisis microbiológicos de agua	61
4.5.	Elaboración de Manual de Buenas Prácticas Agrícolas; fertilizantes y productos bioorgánicos	62
4.6.	Capacitación sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la elaboración de preparados bioorgánicos a productores de ACOPO de R. L.	63

CAPÍTULO V

5.	Resultados y Análisis	65
5.1.	Verificación de la presencia de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella spp.</i> en hortalizas frescas tratadas con preparados bioorgánicos	65
5.2.	Cuantificación de la presencia de coliformes fecales en agua utilizada para el riego en el cultivo de hortalizas frescas	73
5.3.	Determinación de la presencia de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella spp.</i> en preparados bioorgánicos utilizados en el cultivo de hortalizas frescas	80
5.4.	Elaboración de manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Elaboración de fertilizantes bioorgánicos	84
5.5.	Capacitación a productores de la Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO DE R. L.) sobre Buenas Prácticas en la Elaboración de fertilizantes bioorgánicos	86

CAPÍTULO VI

6. Conclusiones 89

CAPÍTULO VII

7. Recomendaciones 91

CAPÍTULO VIII

8. Bibliografía

Anexos

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Cuadro descriptivo de la cantidad (gramos) de muestras recolectadas por cultivo en cada parcela	51
Cuadro 2: Georreferenciación de parcelas donde se obtuvieron muestras	51
Cuadro 3: Promedio de producción en las 5 parcelas según hortaliza	52
Cuadro 4: Cantidad necesarias para extraer 100 gramos según cultivo de hortaliza	53
Cuadro 5: Verificación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en las diferentes hortalizas analizadas	66
Cuadro 6: Determinación de colonias sospechosas de <i>Salmonella spp.</i> en Agar XLD y Salmonella-Shigella en muestras de hortalizas	69
Cuadro 7: Reacciones a Pruebas bioquímicas de <i>Salmonella spp.</i>	71
Cuadro 8: Resultados de pruebas bioquímicas a colonias sospechosas en agares XLD y SS en algunas muestras de hortalizas	72
Cuadro 9: Determinación de <i>Salmonella spp.</i> en las diferentes hortalizas analizadas	55
Cuadro 10: Número más probable (NMP) de coliformes totales y coliformes fecales por mililitro de agua en muestras de agua de riego por aspersión utilizada en las parcelas para los cultivos	76
Cuadro 11: Determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en muestras de preparados bioorgánicos	80
Cuadro 12: Determinación de <i>Salmonella spp.</i> en muestras de preparados bioorgánicos	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Placas petrifilm: colonias no coliformes, colonias de coliformes totales y colonias de <i>E. coli</i> (coliformes fecales)	65
Figura 2: Recuento de colonias de coliformes en placas Petrifilm	66
Figura 3: Agar Salmonella-Shigella sin inocular y crecimiento de variadas colonias	68
Figura 4: Agar XLD sin inocular y crecimiento de variadas colonias	68
Figura 5: Pruebas bioquímicas para detección de <i>Salmonella spp.</i> Medio MIO (resultado negativo y positivo, prueba de Indol (negativo y positivo) y prueba de Rojo de metilo (negativo y positivo)	70
Figura 6: Pruebas bioquímicas para detección de <i>Salmonella spp.</i> Prueba Voges Proskauer (resultado negativo y positivo), prueba de TSI (resultados: A/A, K/A, A/A con ácido sulfídrico, y K/A con ácido sulfídrico	70
Figura 7: Riego con aspersores en las parcelas	74
Figura 8: Caldo LMX Fluorocult: sin inocular, en azul turqueza (coliformes totales) y fluorescentes (coliformes fecales; <i>E. coli</i>)	75
Figura 9: Detección de indol con reactivo de Kovac (anillo rojo) como prueba confirmatoria de presencia de <i>E. coli</i>	75
Figura 10: Incubación a 44.5 °C en Baño María. Caldo EC sin inocular y con turbidez y formación de gas en campana de Durham, indicativos de crecimiento de <i>E. coli</i>	76
Figura 11: Pileta recolectora de agua en río donde se conectan los tubos que la trasladan hacia las parcelas	78
Figura 12: Tubos de movilización del agua por gravedad hasta las parcelas de los productores	78

Figura 13:	Calidad de agua del río	79
Figura 14:	Enmendaduras artesanales en tubos conductores del agua	79
Figura 15:	Almacenamiento de bocashi en area alejada de los cultivos, donde se deja pasar el tiempo antes de aplicarse a las parcelas	83
Figura 16:	Toma de muestra de EM-5	84
Figura 17:	Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos	86
Figura 18:	Capacitación a productores de ACOPO sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la Elaboración de Fertilizantes y Productos	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Reacciones Bioquímicas de <i>Salmonella spp.</i>	30
Tabla 2: Criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centroamericano para hortalizas en relación a <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i>	73

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Figura 19: Asociación Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos	101
Figura 20: Hortalizas de la investigación: rábano (<i>Raphanus sativus</i>), cebollín (<i>Allium schoenoprasum</i>), cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>) y lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L. var. longifolia)	101
Figura 21: Parcelas seleccionadas de productores con cultivos de hortalizas tratadas bioorgánicamente	102
Figura 22: Esquema descriptivo de la distribución de parcelas con las hortalizas de estudio	103
Figura 23: Georreferenciación de la ubicación de las parcelas de los productores mediante GPS	104
Figura 24: Indumentaria para muestreos. Desinfestación de tijera de podar. Toma de muestra de hortalizas y depositadas en hielera para su traslado al laboratorio	104
Figura 25: Almacenamiento de bocashi, rotulación de bolsa ziplock y toma de muestra de bocashi	104
Figura 26: Almacenamiento de gallinaza en parcelas, desinfestación con alcohol de palin y toma de muestra de gallinaza	105
Figura 27: Muestra de agua de parcelas en recipiente estéril y depositado en hielera para su traslado al laboratorio	105
Figura 28: Toma de muestra de agua de riego en asperjadores de las parcelas	106
Figura 29: Marcha analítica para determinación de <i>Escherichia coli</i> en muestras de hortalizas	107
Figura 30: Creación de diluciones previo a las inoculaciones	108
Figura 31: Inoculación en placas Petrifilm. Distribución del inóculo	108
Figura 32: Marcha analítica para determinación de <i>Salmonella</i>	109

	<i>spp.</i> en muestras de hortalizas	
Figura 33:	Caldos Rappaport y tetracionato con crecimiento y sin crecimiento bacteriano	110
Figura 34:	Siembra en placas con Agar XLD	110
Figura 35:	Marcha analítica para determinación de <i>Escherichia coli</i> en muestra de Bocashi	112
Figura 36:	Marcha analítica para determinación de <i>Escherichia coli</i> en muestra de EM-5	112
Figura 37:	Marcha analítica para determinación de <i>Escherichia coli</i> en muestra de Gallinaza	113
Figura 38:	Marcha analítica para determinación de <i>Salmonella spp.</i> en muestra de Bocashi y Gallinaza	114
Figura 39:	Marcha analítica para determinación de <i>Salmonella spp.</i> en muestra de EM-5	115
Figura 40:	Pesaje de bocashi y vaciado de Caldo Lactosado para la identificación de <i>Salmonella spp.</i>	116
Figura 41:	Marcha analítica para determinación de coliformes fecales en muestra de agua de riego	117
Tabla 42:	Tabla del Número Más Probable (NMP) para 15 tubos	118
Figura 42:	Equipo de laboratorio de apoyo; contador de colonias, cámara de flujo laminar, estufa, baño María, balanza digital de mesa semianalítica y bortex	119
	Fundamentos de medios de cultivo	120
	Manual “Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos”	127

RESUMEN

El consumo de hortalizas frescas tiene gran valor nutricional puesto que se tiene el aporte de vitaminas y minerales esenciales. Al consumirlas en fresco, existe riesgo de la ocurrencia de alguna enfermedad por causa de algún microorganismo patógeno.

Esta investigación se desarrolló en la Asociación Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO de R. L.) y los análisis microbiológicos en el laboratorio de investigación y Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. Se investigó *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en las hortalizas cultivadas orgánicamente: rábano, cebollín, cilantro y lechuga. Similarmente en los preparados bioorgánicos: gallinaza, bocashi y EM-5 utilizados en las parcelas. También se investigó la presencia de coliformes fecales en agua de riego por aspersión.

Los resultados microbiológicos relativos al agua de riego por aspersión en las parcelas, reflejaron estar contaminadas con coliformes fecales, indicando que no es aceptable para la irrigación de los cultivos. Sin embargo, estos en cantidad no superan los 1000 NMP/ 100 ml según señala la “Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales” de Costa Rica.

Los resultados obtenidos indicaron que de las 20 muestras de hortalizas analizadas, solamente rábano y lechuga de parcelas diferentes, resultaron con presencia de *Escherichia coli*, en todas las demás no se encontró este patógeno. En el caso de *Salmonella*, no se detectó, ya que resultados de pruebas bioquímicas –principalmente la prueba de TSI- no correspondieron a los preestablecidos para esta bacteria. También en la mayoría de los resultados de las pruebas de Rojo de metilo y de Voges Proskauer son similares, contrastando lo que autores ⁽³⁴⁾ mediante estudios señalan que estas pruebas deben ser opuestas si se tratase de *Salmonella*.

En los preparados bioorgánicos, no se detectó *Escherichia coli*. En caso de *Salmonella*; tampoco, al observarse que en los resultados de las pruebas bioquímicas, principalmente en la de TSI no hubo ninguna reportada como K/A con producción de H₂S. El EM-5, demostró no contener también este patógeno.

Se elaboró el manual: “Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos” y se capacitó a productores asociados a la Cooperativa en estos temas a fin de promover las BPAs como herramienta para reducir riesgos y peligros microbiológicos y garantizar así hortalizas seguras para el consumo.

Se recomienda hacer análisis cada seis meses para evaluar la calidad microbiológica del agua de riego y analizar el establecimiento de un sistema de filtrado de agua y un sistema de riego por goteo. También, continuar con capacitaciones y seguir elaborando adecuadamente los preparados bioorgánicos.

Palabras claves: gallinaza, bocashi, EM-5, riego por aspersión, hortalizas frescas, fertilizantes bioorgánicos, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, coliformes fecales.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de hortalizas es vital para la salud humana puesto que poseen innumerables propiedades alimenticias, son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía ⁽²⁰⁾. Sin embargo; éstas por su naturaleza física y química, no son exentas a ser contaminadas por diversos microorganismos y entre éstos están ciertos patógenos importantes de enfermedades de transmisión alimentaria.

Dentro de su cadena de producción, las hortalizas al manejarlas agronómicamente y cosecharlas en el campo, se exponen a patógenos que pueden llegar a ellas de diversas fuentes y formas, entre los que se destacan a los manipuladores, los 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, exigiendo para tal fin, que en el manejo agronómico se usen materiales bioorgánicos a base de ingredientes de origen animal y/o vegetal, entre ellos; fertilizantes e insecticidas, descartando por completo el uso de agroquímicos. Sin embargo, 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, puesto que muchas hortalizas son consumidas en fresco. Patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* pueden ser transportados mediante estos preparados.

Se desarrolló una investigación en época seca, en la Asociación Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO DE R. L), que produce hortalizas bajo el enfoque de agricultura orgánica. Se determinó la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en cuatro hortalizas: lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*), cilantro (*Coriandrum sativum*), rábano (*Raphanus sativus*) y cebollín (*Allium schoenoprasum*). Los resultados se

compararon con el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08; “Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos” (RTCA).

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 atendiendo el “Reglamento para la evaluación y clasificación de la Calidad de Cuerpos de agua superficiales de Costa Rica” ⁽¹⁹⁾.

Los análisis microbiológicos para las hortalizas, los preparados bioorgánicos y el agua de riego, se llevaron a cabo en el laboratorio de Investigación y Diagnóstico del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador durante los meses de marzo, abril y mayo.

Se elaboró un manual técnico sobre Buenas Prácticas Agrícolas y sobre fertilizantes y productos bioorgánicos que servirá como un documento de consulta para contribuir en la orientación de productores de hortalizas frescas en la toma de decisiones relacionadas con la preparación, manejo y aplicación de preparados bioorgánicos. Se realizó también una capacitación sobre referidas Buenas Prácticas a productores de hortalizas frescas asociados a ACOPO de R. L.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

2.1. General

Evaluar 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).

2.2. Específicos

- 2.2.1. Verificar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en hortalizas frescas tratadas con preparados bioorgánicos (Bocashi, EM-5 y Gallinaza).
- 2.2.2. Cuantificar la presencia de coliformes fecales en agua utilizada para el riego en el cultivo de hortalizas frescas seleccionadas (lechuga, cilantro, rábano y cebollín).
- 2.2.3. Determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en preparados bioorgánicos utilizados en el cultivo de hortalizas frescas seleccionadas.
- 2.2.4. Elaborar un manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la elaboración de fertilizantes bioorgánicos dirigido a productores de hortalizas cultivadas orgánicamente.
- 2.2.5. Capacitar a productores de la Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO de R. L.) sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la elaboración de fertilizantes bioorgánicos.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

III. MARCO TEÓRICO

La agricultura orgánica como un sistema de producción viable y productiva para las zonas áridas, semiáridas y tropicales del país y del mundo es un proceso de desarrollo sustentable que debe de utilizarse y extenderse lo más posible entre los productores a todos sus niveles, considerando los costos de producción tan altos en una agricultura tradicional y modernizada dado el uso tan elevado de insumos y maquinaria para la obtención de buenos rendimientos para un cultivo determinado. Sin embargo, es determinante tener en mente todos los componentes que están implícitos en este tipo de agricultura como son: cambio del sistema de producción y uso de abonos orgánicos, normatividad, cultivos, y otros que están involucrados y forman parte directa en la obtención de productos orgánicos ⁽³¹⁾.

La agricultura está ante retos importantes a los que no se había enfrentado antes, ya que se trata de minimizar riesgos microbianos en espacios abiertos y en donde se manejan aguas, estiércoles, animales domésticos, de trabajo y silvestres y en donde existe también la presencia de trabajadores agrícolas, todos ellos con la potencialidad de contaminar las frutas y hortalizas que se están cultivando. Otra de las causas fundamentales de contaminación lo constituye las heces fecales de los animales y de los humanos, de aquí la necesidad de implementar buenas prácticas agrícolas para el manejo de estiércoles en la agricultura (composteo, no aplicar estiércol crudo, alargar el tiempo entre la aplicación del estiércol y la cosecha, por ejemplo) ⁽³¹⁾. Todo esto es importante tomarlo en consideración para prevenir problemas de salud relacionados con enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), en la cual problemas gastrointestinales toman importante relevancia.

Las enfermedades de transmisión alimentaria incluyen un conjunto de patologías asociadas con la ingestión accidental o intencional de alimentos y agua contaminados por agentes físicos, químicos y biológicos. Por lo general, esta situación se debe a deficiencias cualitativas y cuantitativas en la higiene durante

los procesos de elaboración, manipulación, conservación, transporte, distribución o comercialización de los alimentos ⁽³⁶⁾.

Los alimentos constituyen la segunda vía en importancia de transmisión de microorganismos que pueden causar infecciones o intoxicaciones. De acuerdo con la Organización Mundial de la salud (OMS), entre 70% y 80% de los casos de personas que padecen diarrea se debe a la ingestión de alimentos y agua contaminados ⁽³⁶⁾.

3.1. Bacterias patógenas e indicadoras asociadas a alimentos.

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. Algunos brotes de enfermedades han sido atribuidos a muchas hortalizas contaminadas con bacterias patógenas ⁽²⁹⁾.

3.1.1. Bacterias coliformes

La definición generalmente aceptada para el término “coliformes” describe a estos microorganismos como bacterias anaerobias facultativas que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas, bacilos Gram negativos, no esporulados. La mayoría de los coliformes pueden encontrarse en la flora normal del tracto digestivo del hombre o animales, por lo cual son expulsados especialmente en las heces, por ejemplo *Escherichia coli*. Por esta razón, su presencia es constante en la materia fecal. Los coliformes son el grupo más ampliamente utilizado en la microbiología de alimentos como indicadores de prácticas higiénicas inadecuadas ⁽³³⁾. El grupo comprende los Géneros de la Familia Enterobacteriaceae siguientes: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ⁽²⁶⁾. Como los coliformes también pueden vivir en otros ambientes, se distingue entre coliformes totales y coliformes fecales ⁽³³⁾.

El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para: (i) La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos. (ii) La evaluación de la calidad microbiológica de un producto aunque su presencia, no necesariamente implica un riesgo sanitario, cuando los coliformes son de origen no-fecal. (iii) Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas en el equipo. (iv) La calidad sanitaria del hielo y los distintos tipos de aguas utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos (35).

La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales (35).

En la determinación del grupo coliforme se realiza una diferenciación entre los coliformes de origen fecal y no fecal. El grupo de bacterias coliforme es normalmente encontrado en las heces de animales homeotermos (mamíferos, aves) (7).

3.1.2. Bacterias Coliformes fecales

Las bacterias coliformes fecales forman parte del total del grupo coliforme. Estas son definidas como bacilos gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a $44.5\text{ C}^{\circ} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ dentro de las 24 ± 2 horas (7).

Aproximadamente el 95% del grupo de los Coliformes fecales presentes en heces están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de los animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Estos últimos se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas. Esta es la característica que

diferencia a coliformes totales y fecales. La capacidad de los coliformes fecales de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH y humedad. Desde hace mucho tiempo se han utilizado como indicador ideal de contaminación fecal. Su presencia se interpreta como una indicación de que los organismos patógenos pueden estar presentes y su ausencia indica que el agua o el alimento estudiado se hallan exentos de organismos productores de enfermedades (2).

3.1.3. *Escherichia coli*

Forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente (35). En el hombre encuentra su nicho ecológico en el colon y se convierte en un residente permanente que establece una relación de mutuo beneficio (36). Sin embargo, algunas cepas han desarrollado capacidad para provocar enfermedad en el hombre, como son las infecciones gastrointestinales. Estas cepas patógenas representan la principal causa de diarrea infantil en el mundo (35).

Usualmente es habitante normal del intestino grueso; es un germen antagonista, sintetizador de vitaminas y desdoblador de carbohidratos; sin embargo, fuera del intestino, en otros órganos y sistemas del cuerpo se comporta como patógeno; es la primera causa de infecciones del aparato genitourinario; su importancia radica en servir como índice sanitario en la microbiología sanitaria, tomándose como contaminante fecal de los alimentos y el agua (35).

La capacidad de *E. coli* patógena para producir enfermedad está determinada por los factores de virulencia que le permiten infectar a sus huéspedes y sobreponerse a los mecanismos de defensa, como la producción de adhesinas, enterotoxinas, citotoxinas y otras proteínas que le permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas (35).

Un grupo reducido de esta especie es capaz de producir síndromes gastrointestinales diversos, y que son estudiados con metodologías especiales para determinar sus factores de virulencia incriminados en cada uno de estos eventos:

a) Morfología: Cocobacilo de 1 a 3/0.4 a 0.7 micras, gram negativo, capsulado, no esporulado, móvil por flagelos peritricos ⁽³⁹⁾.

b) Características de cultivo: facultativo, crece en medios simples a pH de 6 a 8, temperaturas entre 20 a 40°C, produce un IMVIC de ++--, sensible al KCN, fermentador de lactosa y manitol, no produce H₂S lisina descarboxilasa ⁽³⁹⁾.

c) Características de colonia: en MacConkey; colonias grandes, húmedas, convexas, opacas, de color rosa intenso con halo turbio del mismo color (indicador de rojo neutro) y cambio del pH al fermentar lactosa. En EMB: colonias fermentadoras de lactosa que producen un color azul marino con brillo metálico de color verdoso a la luz reflejada. En XLD: colonias fermentadoras de lactosa que producen colonias amarillas ⁽³⁹⁾.

d) Síndromes clínicos.

- ✓ **Septicemia:** *E. coli* es el bacilo Gram negativo más aislado en el paciente séptico; el foco primario de la infección suele ser el tracto genitourinario o gastrointestinal ⁽³⁹⁾.
- ✓ **Infecciones del tracto urinario:** responsable de más de 80% de estas infecciones; las cepas más relacionadas son los serotipos aislados de infecciones originadas en el tracto gastrointestinal ⁽³⁹⁾.
- ✓ **Meningitis:** *E. coli*, junto con *Streptococos* del grupo "B" son los gérmenes más frecuentemente aislados de meningitis neonatal ⁽³⁹⁾.

3.1.4. *Salmonella* spp.

Desde hace casi cien años hay información que relaciona a las bacterias del género *Salmonella* con padecimientos en humanos y animales. En la actualidad, la salmonelosis es la principal causa de enfermedad bacteriana transmitida por alimentos en la mayoría de los países desarrollados, y en los subdesarrollados una de las más importantes causas de muerte ⁽³⁶⁾.

El género *Salmonella* debe su nombre a Lignieris, que lo denominó así en 1900 en honor del Doctor D. E. Salmon, bacteriólogo americano codescubridor y que describió por primera vez la *Salmonella enterica* (antes conocida como *Choleraesuis*) ⁽³⁶⁾.

Es una bacteria patógena para el hombre y muchos animales, 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 ⁽³⁴⁾. *Salmonella* es uno de los géneros más estudiados entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos ⁽³⁶⁾.

Aunque en la actualidad existen alrededor de 2500 serovares, todos considerados potencialmente patógenos para el hombre, sólo a 200 se les asocia con enfermedad humana ⁽³⁶⁾.

a) Especies: De 1987 a 1992, estudios de hibridación de DNA definieron dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* con seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizona*, *diarizonae*, *houtanae*, *indica* ⁽³⁵⁾.

b) Morfología: Los integrantes de este género son bacilos Gram negativos, oxidasa negativa, pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae. La mayoría no fermentan la lactosa, son aerobios o anaerobios facultativos, contienen endotoxinas, generalmente son termolábiles, resisten la congelación y algunos

agentes químicos, poseen una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos, recientemente designados como serovares. Todos considerados potencialmente patógenos al hombre. Son cocobacilos de 1 a 3/0.4 a 0.7 micras, capsulado, no esporulados, móvil por flagelos peritricos, es lactosa (-), manitol (+) produce H₂S, lisina descarboxilasa (+), sensible al KCN ⁽³⁵⁾.

c) Características de cultivo: Facultativo, crece en medios simples a pH de 6 a 8, temperaturas entre 15 a 41 °C. Se utilizan medios de enriquecimiento como el caldo selenito o el caldo tetracionato ⁽³⁹⁾.

d) Características de colonia: En MacConkey: colonias pequeñas, brillantes convexas, incoloras o pálidas por no fermentar lactosa. En SS; colonias incoloras con producción de Ácido sulfhídrico (punto negro). En agar sulfito de bismuto; colonias brillantes, convexas, de color negro por reducción del sulfito. En XLD; colonias rojas lactosa negativas con producción de ácido sulfhídrico (punto negro) ⁽³⁹⁾.

Tabla 1. Reacciones Bioquímicas de *Salmonella* spp.

Prueba o Sustrato	Resultados		Reacción
	Positivo	Negativo	
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
Lisina descarboxilasa (LIA)	Fondo púrpura	Fondo amarillo	+
H ₂ S (TSI y LIA)	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
Ureasa	Rosa maravilla	No cambia color	-
Prueba de Indol	Violeta en superficie	Amarillo en superficie	-
Voges-Proskauer	Rosado-rojo	No cambia color	-
Rojo de metilo	Rojo difuso	Amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	Crecimiento, azul	No crecimiento, no cambia color	Verde

Fuente: Venegas, 2010

e) Epidemiología: La distribución de *Salmonella* en la naturaleza es muy extensa, prácticamente existe una para cada vertebrado; el origen fecal de las infecciones en el hombre es por ingestión de agua o alimentos contaminados (exógena o endógena) ⁽³⁵⁾.

f) Síndromes clínicos

- ✓ **Gastroenteritis (enterocolitis):** Forma habitual de la salmonelosis con síntomas que pueden presentarse entre las 6 a 48 horas después de la ingestión de alimentos contaminados, con náusea, vómito, diarrea no sanguinolenta, fiebre baja y dolor abdominal; suelen presentarse también mialgias y cefalea, persistiendo por dos días a una semana con resolución espontánea (bacteremia en 2 al 4% de los casos) ⁽³⁵⁾.
- ✓ **Septicemia:** Todas las *Salmonellas* pueden causarla pero sólo algunas como *S. typhi*, *paratyphi*, *cholerasuis* y *S. dublin* se han incriminado en caso de septicemias con más frecuencia ⁽³⁵⁾.
- ✓ **Fiebre entérica:** Llamada también fiebre tifoidea, que es un cuadro septicémico y la produce *S. typhi*. Se calculan más de 16 millones de casos al año en el mundo. Una forma leve de la enfermedad se le llama fiebre paratifoidea y la producen: *S. paratyphi A* y *S. schottmuelleri* (antes llamada *S. paratyphi B*), *S. hirschfeldi* (antes llamada *S. paratyphi C*) ⁽³⁵⁾.

Presentan un período de incubación de 10 a 14 días, seguido de fiebre remitente que aumenta progresivamente, exantema maculopapular rosado, estreñimiento, bradicardia, cefalea, mialgias, hepatomegalia y esplenomegalia, malestar general, incapacidad, anorexia, durante una o dos semanas seguida de síntomas gastrointestinales por una reinfección intestinal; las lesiones más frecuentes son hiperplasia y necrosis del tejido linfoide (placas de Peyer), hepatitis, necrosis focal de hígado, pulmones periostio y otros órganos, colecistitis, perforación intestinal ⁽³⁵⁾.

g) Reservorio: Se considera que el reservorio de *Salmonella* es el tracto intestinal de animales y hombres. Estudios epidemiológicos indican que las aves constituyen un importante reservorio. Algunos serotipos tienen poca especificidad

de huésped y muestran elevada especificidad de huésped como como: *S. typhi* en humanos, *S. typhimurium* en ratones, *S. gallinarum* en aves de corral, *S. dublin* en bovinos, *S. anatum* en patos, *S. cholerasuis* en porcinos y *S. abortusovis* en ovinos ⁽²⁴⁾. Salmonella es una bacteria primariamente parásita intestinal de los animales incluido el hombre, se libera al medio ambiente por las heces, donde muestra determinada capacidad de supervivencia en los materiales que contacta; en condiciones favorables se multiplica, y los alimentos no son una excepción. Se puede aislar del medio ambiente en general, lo que incluye agua, tierra, etc.; vegetales, animales salvajes, de explotación, acuáticos, domésticos y el hombre. La principal forma de contagio es la vía oral, se puede transmitir de forma directa a través de contacto con las heces fecales de personas enfermas o por medio de alimentos (leche y sus derivados, verduras, frutas, carne, huevos, etc.) o agua contaminada y hasta por objetos infectados por moscas o ratas ⁽³⁵⁾.

h) Diagnóstico de laboratorio: Coprocultivo con enriquecimientos en caldo selenito, caldo tetrionato, hemocultivo o cultivo de médula ósea, así como urocultivo con pruebas bioquímicas y serología ⁽³⁹⁾.

i) Profilaxis: Control total en el manejo higiénico del agua y de los alimentos, control de excretas y de las aguas negras, lavado de las manos, antes de preparar alimentos, coprocultivo a manejadores de alimentos ⁽³⁹⁾.

3.2. Preparados bioorgánicos: bocashi, gallinaza, EM-5, y agua de riego.

3.2.1. Bocashi

El Bocashi es un abono orgánico fermentado que se obtiene procesando materiales que son producto de actividades agrícolas (rastrajo, cascarilla de café, etc.), y que pueden ser utilizados y sustituidos según la disponibilidad que exista en la región. Esto lo convierte en una actividad práctica y de gran beneficio para el

agricultor que quiere aprovechar todos los recursos con los que cuenta en el campo ⁽⁸⁾.

La elaboración del bocashi se puede entender como un proceso de semi-descomposición aeróbica (con presencia de oxígeno) de residuos orgánicos por medio de poblaciones de microorganismos, quimioorganotróficos, que existen en los propios residuos, con condiciones controladas y que producen un material parcialmente estable de lenta descomposición en condiciones favorables y que son capaces de fertilizar a las plantas y al mismo tiempo nutrir la tierra ⁽⁸⁾.

La producción de abono tipo Bocashi es una práctica que fortalece los procesos de producción de los agricultores porque se produce más invirtiendo menos, al tiempo que recupera el suelo y mantiene por más tiempo la humedad ⁽⁸⁾.

La palabra bocashi es del idioma japonés y para el caso de la elaboración de los abonos orgánicos fermentados, significa cocer al vapor los materiales del abono, aprovechando el calor que se genera con la fermentación aeróbica de los mismos ⁽²¹⁾.

3.2.1.1. Ventajas del proceso de elaboración del abono orgánico fermentado.

- ✓ No se forman gases tóxicos ni surgen malos olores debido a los controles que se realizan en cada etapa del proceso de la fermentación, evitándose cualquier inicio de putrefacción.
- ✓ Se facilita el manejo del volumen de abono, su almacenamiento, su transporte y la disposición de los materiales para elaborarlo (se puede elaborar en pequeños o grandes volúmenes, de acuerdo con las condiciones económicas y con las necesidades de cada productor).
- ✓ Se pueden elaborar en la mayoría de los ambientes y climas donde se realicen actividades agropecuarias.

- ✓ Se autorregulan “agentes patogénicos” en la tierra, por medio de la inoculación biológica natural, principalmente de bacterias, actinomicetos, hongos y levaduras, entre otros.
- ✓ Se da la posibilidad de utilizar el producto final en los cultivos, en un período relativamente corto.
- ✓ Por medio de la inoculación y reproducción de microorganismos nativos presentes en los suelos locales y levaduras, los materiales se transforman gradualmente en nutrientes de excelente calidad disponibles para la tierra, las plantas y la propia retroalimentación de la actividad biológica.
- ✓ El crecimiento de las plantas es estimulado por una serie de fitohormonas y fitoreguladores naturales que se activan a través de los abonos fermentados ⁽²¹⁾.
- ✓ Ayuda a la economía del agricultor, debido al bajo costo de su elaboración.
- ✓ Contribuye a obtener mejores resultados en la cosecha,
- ✓ Recupera el suelo y mantiene por más tiempo la humedad.
- ✓ El agricultor obtiene abono de buena calidad en 18 días ⁽⁸⁾.

3.2.1.2. Etapas en el proceso de elaboración del abono orgánico fermentado

La primera etapa por la que pasa la fermentación del abono es la estabilización, en la que la temperatura puede llegar a alcanzar aproximadamente entre 70 °C y 75 °C si no se controla adecuadamente, debido al incremento de la actividad microbiana.

Posteriormente, la temperatura del abono comienza a caer nuevamente, dado el agotamiento o la disminución de la fuente energética que retroalimentaba el proceso. En este momento empieza la estabilización del abono y solamente sobresalen los materiales que presentan una mayor dificultad para su degradación a corto plazo. A partir de aquí, el abono pasa a la segunda etapa, que es la maduración, en la cual la degradación de los materiales orgánicos que todavía

permanecen es más lenta, para luego llegar a su estado ideal para su inmediata utilización ⁽²¹⁾.

3.2.1.3. Factores que afectan el proceso de la elaboración de los abonos orgánicos fermentados

Temperatura: Está en función del incremento de la actividad microbiológica del abono, que comienza después de la etapa de la mezcla de todos los ingredientes. Aproximadamente, después de catorce horas de haberlo preparado, el abono debe presentar temperaturas que pueden superar fácilmente a los 50 °C, lo que es una buena señal para continuar con las demás etapas del proceso. La actividad microbiológica puede ser perjudicada por la falta de oxigenación y el exceso o escases de humedad ⁽²¹⁾.

pH (acidez): La elaboración de este tipo de abono requiere que el pH oscile entre un 6 y un 7.5, ya que los valores extremos inhiben la actividad microbiológica durante el proceso de la degradación de los materiales. Sin embargo, al inicio de la fermentación el pH es bien bajo, pero gradualmente se va auto-corrigiendo con la evaluación de la fermentación o maduración del abono ⁽²¹⁾.

Humedad: La humedad óptima para lograr la máxima eficiencia del proceso de la fermentación del abono, oscila entre el 50% y el 60% (en peso) o sea, los materiales están vinculados a una fase de oxidación. Cuando la humedad es inferior al 35%, se da una descomposición aeróbica muy lenta de los materiales orgánicos que hacen parte del compuesto ⁽²¹⁾.

Por otro lado, cuando la humedad supera el 60%, la cantidad de poros que están libres de agua son muy pocos, lo que dificulta la oxigenación de la fermentación, resultando un proceso anaeróbico putrefacto, el cual está vinculado a una fase de reducción de la materia orgánica, que no es lo deseado ni lo ideal para obtener un abono de buena calidad ⁽²¹⁾.

Aireación: la presencia de oxígeno o una buena aireación es necesario para que no existan limitaciones en el proceso aeróbico de la fermentación del abono. Se calcula que como mínimo debe existir de un 5% a un 10% de concentración de oxígeno en los macroporos de la masa. Sin embargo, cuando el microporo se encuentra en estado anaeróbico (sin oxígeno) debido a un exceso de humedad, ello puede perjudicar la aireación del proceso y, en consecuencia, se obtiene un producto de mala calidad ⁽²¹⁾.

Tamaño de las partículas de los ingredientes: la reducción del tamaño de las partículas de los componentes del abono puede presentar la ventaja de aumentar la superficie para su descomposición microbiológica. Sin embargo, el exceso de partículas muy pequeñas puede llevar fácilmente a una compactación que favorece el desarrollo de un proceso anaeróbico, lo que no es ideal para obtener un buen abono orgánico fermentado. En algunos casos, este fenómeno se corrige mezclando al abono materiales de relleno de partículas mayores, como son pedazos picados de maderas, carbón vegetal grueso, etc. ⁽²¹⁾.

Por otro lado, la forma de preparar el bocashi es variada y se ajusta a las condiciones y a los materiales que cada agricultor dispone en su finca o comunidad. Es decir, no existe una única receta o fórmula para hacer los abonos; lo más importante es el entusiasmo y la disponibilidad del tiempo para ser creativo y así intentar superar la crisis que los agricultores heredaron de la agricultura convencional de los venenos y los fertilizantes químicos altamente solubles ⁽²¹⁾.

Relación carbono-nitrógeno: la relación teórica e ideal para la fabricación de un buen abono de rápida fermentación se calcula que es de 1 a 25-35. Las relaciones menores pueden resultar en pérdidas considerables de nitrógeno por volatilización; por otro lado, relaciones mayores resultan en una fermentación y descomposición más lenta, y que en muchos casos es conveniente ⁽²¹⁾.

3.2.1.4. Ingredientes básicos para la preparación de bocashi

- ✓ Gallinaza de aves ponedoras u otros estiércoles
- ✓ Carbón quebrado en partículas pequeñas
- ✓ Pulidura o salvado de arroz
- ✓ Cascarilla de arroz o café o pajas bien picadas o rastrojo
- ✓ Cal dolomita o cal agrícola o ceniza de fogón
- ✓ Melaza o miel de caña de azúcar o jugo de la misma
- ✓ Levadura para pan, granulada o en barra
- ✓ Tierra arcillosa bien cernida
- ✓ Agua (solamente una vez y al momento de prepararlo) ⁽²¹⁾.

3.2.2. Gallinaza

Es fuente principal de nitrógeno en la elaboración de abonos orgánicos fermentados. Su aporte básico consiste en mejorar las características vitales y la fertilidad de la tierra con algunos nutrientes, principalmente con fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre y boro, entre otros elementos. Dependiendo de su origen, puede aportar inóculo microbiológico y otros materiales orgánicos en mayor o menor cantidad, los cuales mejoran las condiciones biológicas, químicas y físicas del terreno donde se aplicarán los abonos ⁽²¹⁾.

La experiencia desarrollada por muchos agricultores en toda Latinoamérica viene demostrando que la mejor gallinaza para la elaboración de abonos orgánicos es la que se origina de la cría de gallinas ponedoras bajo techo y con piso cubierto con materiales secos mezclados con harina de rocas. Ellos evitan el uso de la pollinaza que se origina a partir de la cría de pollos de engorde, porque presenta una mayor cantidad de agua, es putrefacta y muchas veces en la misma están presentes los residuos de coccidiostáticos y antibióticos, los cuales interfieren en muchos casos, en el proceso de la fermentación de los abonos. Algunos agricultores han venido experimentando con éxito la utilización de otros estiércoles

de: conejos, caballos, ovejas, cabras, cerdos, vacas, codornices y patos, para no utilizar la gallinaza. En algunos casos muy puntuales, la gallinaza o el estiércol puede ser sustituido en parte o totalmente por harinas de sangre, plumas, hueso y pescado, esta situación dependerá de las condiciones de la oferta de los materiales en cada lugar y de las condiciones económicas de cada productor ⁽²¹⁾.

3.2.3. EM-5

Las plagas y enfermedades son limitantes, especialmente para la producción de hortalizas, porque se han buscado alternativas para proteger los cultivos haciendo uso de productos naturales ⁽²²⁾.

El EM-5 es un líquido con acción repelente de plagas, fungicida y bioestimulante que ayuda al desarrollo de las plantas. Fue desarrollado y aplicado en forma empírica por agricultores de diferentes países y poco a poco se ha mejorado. En la Zona Oriental de El Salvador, se ha utilizado EM-5, observándose resultados positivos como mejoras en la producción, disminución de plagas y enfermedades en hortalizas y otros cultivos; además disminuye daños en el suelo, agua y salud de productores ⁽²²⁾.

La preparación de EM-5 además de utilizar microorganismos de montaña reproducidos en medio líquido utiliza cinco productos básicos:

- ✓ Vinagre
- ✓ Aguardiente
- ✓ Melaza
- ✓ Agua sin cloro
- ✓ Vegetales como: cebolla, ajos, chile picante, jengibre, hojas de epasina, eucalipto, manzanilla ó menta (se puede utilizar otras especies de plantas en las que se observe que no son atacadas por plagas, y que hay disponibilidad de ellas en la finca) ⁽²²⁾.

3.2.3.1. Efectos del EM-5

- ✓ Funciona como repelente principalmente de chinches, mosca blanca, ácaros, pulgones, gusanos, gallina ciega y babosas.
- ✓ Funciona como fungicida preventivo.
- ✓ Es estimulante del vigor y del crecimiento para los cultivos.
- ✓ Sirve para contrarrestar daños ocasionados por enfermedades, plagas o factores ambientales ⁽²²⁾.

3.2.3.2. Ventajas del EM-5

- ✓ Posibilita producir y comercializar alimentos sin agroquímicos.
- ✓ Fomenta una nueva cultura de producción protegiendo el ambiente y salud de productores.
- ✓ No daña organismos benéficos ⁽²²⁾.

3.2.3.3. Microorganismos Efectivos

Los Microorganismos Efectivos conocidos por su sigla en inglés –EM–, son una mezcla de tres grupos de microorganismos completamente naturales que se encuentran comúnmente en los suelos y en los alimentos ⁽¹⁹⁾. Consiste en un cultivo mixto de microorganismos benéficos, de ocurrencia natural, que pueden ser aplicados como inoculantes para incrementar la diversidad microbial de los suelos y plantas. Fue desarrollado por el Prof. Teruo Higa y su equipo en la Universidad de Ryukus, Okinawa, Japón. Sus aplicaciones son múltiples una de ellas es en la agricultura como promotor del crecimiento de las plantas y supresor de enfermedades. Investigaciones han arrojado que la inoculación de cultivos de EM al ecosistema suelo / planta pueden mejorar la calidad, salud del suelo, el crecimiento, producción y calidad de los cultivos. EM contiene especies seleccionadas de microorganismos incluyendo poblaciones predominantes de bacterias ácido lácticas, levaduras y un número más pequeño de bacterias

fotosintéticas. Todos estos compatibles mutuamente unos con otros y capaces de coexistir en un cultivo líquido ⁽¹⁰⁾.

El EM contiene Lactobacillus, similares a los que se utilizan para fabricar el yogur y los quesos, levaduras, como las que se emplean para elaborar el pan, la cerveza o los vinos, bacterias Fototróficas o Fotosintéticas, habitantes comunes de los suelos y de las raíces de las plantas ⁽¹⁰⁾.

Estos microorganismos no son nocivos, ni tóxicos, ni genéticamente modificados por el hombre; por el contrario son naturales, benéficos y altamente eficientes. Producen sustancias que ayudan a controlar algunos patógenos que atacan a las plantas. Las levaduras, miembros de los EM, producen sustancias que actúan como hormonas naturales y promueven el crecimiento y el desarrollo de las plantas ⁽¹⁰⁾.

El EM posee la ventaja con respecto a los insecticidas que es totalmente seguro y no tiene ningún tipo de riesgo de intoxicación, lo que lo hace especialmente conveniente para aquellos locales donde se manipulan alimentos o donde frecuentan los niños o personas irresponsables ⁽¹⁰⁾.

El uso de la tecnología de los Microorganismos Efectivos proporciona amplios beneficios a la agricultura permitiendo mejorar los suelos, aumentar la producción y prevenir o disminuir el ataque de varias plagas y enfermedades ⁽¹⁰⁾.

Los principales efectos del EM en área agrícola son los siguientes: Promueve el crecimiento de las raíces y el desarrollo de las plantas, mejora la capacidad fotosintética de las plantas, ayuda a las plantas a desarrollar resistencia a plagas y enfermedades y suprime algunos patógenos que habitan en el suelo ⁽¹⁰⁾.

Las aplicaciones foliares al cultivo con EM previenen el ataque de varios patógenos, y a medida que no se usen plaguicidas químicos en el cultivo, se

favorece el desarrollo de hongos entomopatógenos (hongos que atacan a los insectos) y otros agentes de control biológico, disminuyendo por lo tanto las plagas (10).

3.2.4. USO DEL AGUA EN LA PRODUCCIÓN DE HORTALIZAS FRESCAS

El agua utilizada para fines agrícolas deberá ser de calidad adecuada para el uso previsto (5). El agua de insuficiente calidad puede constituir una fuente directa de contaminación y un medio para diseminar contaminación localizada en el campo (21).

Cuando el agua entra en contacto con frutas y hortalizas, la posibilidad de contaminación de estos productos por microorganismos patógenos depende de la calidad de la misma, y si los microorganismos sobreviven en dichos alimentos pueden causar enfermedades. El agua puede transmitir muchos microorganismos, como las variedades patógenas de *Escherichia coli*, y especies de *Salmonella* (29).

Es difícil identificar con certeza la fuente de la contaminación microbiológica de frutas y hortalizas frescas. No se sabe la proporción de dichos productos que pueden ser contaminados por el agua utilizada en la agricultura o las operaciones de empaque, pero existen estudios que demuestran que el uso de agua de riego contaminada puede incrementar la frecuencia de microorganismos patógenos detectados en el producto cosechado (38).

La calidad del agua, y la forma y el momento en que se usa, así como las características de la cosecha afectan la posibilidad de contaminación de las frutas y hortalizas. En general se puede decir que la calidad del agua en contacto directo con la parte comestible de las frutas y hortalizas debe ser superior a la del agua que tiene contacto mínimo con dichas áreas. También existen otros factores, como el estado y tipo del cultivo, el tiempo transcurrido entre el contacto y la cosecha, y la forma en que se manipulan las frutas y hortalizas una vez

recolectadas que determinan la posibilidad de contaminación con microorganismos patógenos transmitidos por el agua, y el riesgo de que éstos causen enfermedades a través de los alimentos ⁽³⁸⁾.

La calidad del agua de uso agrícola varía, especialmente entre las aguas superficiales que pueden estar expuestas a contaminación temporal e intermitente. El agua subterránea que se ve afectada por el agua superficial, también puede estar expuesta a contaminación. Entre las medidas para asegurar la debida calidad del agua se encuentran: tratar el agua para reducir la cantidad de contaminante y usar diferentes métodos de aplicación del agua para restringir su contacto con las frutas y hortalizas. La viabilidad de estas y otras medidas dependerá de las fuentes de agua disponibles, del uso que se planee dar al agua, así como de las necesidades y recursos de la operación en cuestión ⁽³⁸⁾.

Las necesidades de riego varían dependiendo del cultivo y la región. Los agricultores deben concentrarse antes que nada en proteger y mantener la calidad del agua, pero en los lugares donde se desconozca o no se pueda controlar dicha calidad, deben considerar la adopción de prácticas de riego que reduzcan el contacto entre el agua y la parte comestible del cultivo ⁽³⁸⁾.

Por otra parte si se ha analizado el agua o se sabe que es de buena calidad, existirá poco riesgo de que constituya una fuente directa de contaminación microbiológica sea cual sea el sistema de riego utilizado. En algunas cosechas, como las de raíces o las que crecen al ras del suelo, puede que resulte imposible reducir eficientemente el contacto entre el agua de riego y la parte comestible de la planta ⁽³⁸⁾.

Los productores deberán identificar las fuentes del agua utilizada en la explotación agrícola (abastecimiento municipal, agua de riego reutilizada, pozo, canal abierto, embalse, ríos, lagos, estanques piscícolas, etc.). Deberán evaluar su calidad

microbiológica y química y su idoneidad para el uso previsto, e identificar medidas correctivas para prevenir o reducir al mínimo la contaminación ⁽⁶⁾.

3.2.4.1. Análisis microbiológicos del agua de riego en la producción de hortalizas frescas

Cuando sea necesario, los productores deberán analizar el agua de riego que utilizan para detectar contaminantes microbianos. La frecuencia de los análisis dependerá de la fuente de la que procede el agua y de los riesgos de contaminación ambiental, incluida la contaminación temporal o intermitente (por ejemplo, lluvias intensas, inundaciones, etc.). Si se observa que la fuente de agua está contaminada, deberán tomarse medidas correctivas a fin de garantizar que el agua resulte idónea para el uso previsto ⁽⁶⁾.

Hay una serie de problemas científicos sin respuesta en el programa de análisis microbiológico del agua de uso agrícola, por lo que es posible que dicho análisis no resulte muy útil. Los agricultores que estén preocupados por la calidad del agua deben antes que nada concentrarse en adoptar Buenas Prácticas Agrícolas (en el manejo del estiércol y el control del desagüe, por ejemplo) para mantener y proteger la calidad de sus fuentes de agua ⁽³⁸⁾.

Los agricultores pueden analizar periódicamente la contaminación microbiológica de su suministro de agua, utilizando para ello indicadores estándares de contaminación fecal, como las pruebas para detectar la presencia de *E. coli*, que pueden realizarse en laboratorios privados o del gobierno estatal y local. Pero la ausencia de bacterias en el agua no indica necesariamente que esté libre de protozoarios o virus ⁽³⁸⁾.

La calidad del agua, especialmente en el caso del agua superficial, puede variar con el tiempo (por ejemplo entre una estación y otra, o incluso de hora en hora), por lo que un sólo análisis probablemente no sea indicativo de la contaminación

que puede existir. Asimismo, es posible que el análisis del agua no indique la presencia de ciertos microorganismos patógenos si están presentes en bajas cantidades; sin embargo, los análisis microbiológicos pueden ser útiles para confirmar la calidad del agua en situaciones extremas (como en el caso de una fuente de agua contaminada) ⁽³⁶⁾.

Existen normas oficiales para determinar si el agua a usarse para riego es apta o no para tal fin. Algunos países poseen las suyas propias y otros como en el caso de El Salvador no. El indicador microbiológico común para algunas normas consultadas de ciertos países es coliformes fecales con un parámetro máximo aceptable de 1000 NMP por 100 ml de agua. Así por ejemplo, la Norma chilena: Requisitos de calidad del agua para diferentes usos ⁽²³⁾, establece que el contenido de coliformes fecales en aguas de riego destinadas al cultivo de verduras y frutas que se desarrollan a ras de suelo y que habitualmente se consumen en estado crudo, debe ser menor o igual a 1000 coliformes fecales por 100 ml.

La Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua ⁽²⁴⁾, de Ecuador, en su apartado de “Criterios de calidad de aguas de uso agrícola o de riego” admite como Límite máximo permisible de coliformes fecales: 1000 NMP/100 ml de agua.

La Ley Federal de Desechos; Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales 2014 ⁽¹⁵⁾, creada por la Comisión Nacional del Agua en México, establece como Parámetros microbiológicos en agua para riego agrícola también un máximo de 1000 coliformes fecales por 100 ml.

En Costa Rica existe el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales ⁽²⁸⁾. En ellas, las aguas que deseen utilizarse bajo el criterio de “Riego de plantas sin limitación, irrigación de hortalizas que se consumen crudas o de frutas que son ingeridas sin eliminación de la

cáscara” pueden utilizarse siempre y cuando sean de Clases 1 y 2 puesto que exigen menos de 20 para la primera y de 20 a 1000 NMP para la segunda de coliformes fecales por 100 ml.

3.2.4.2. Agua para la aplicación de fertilizantes, otros productos y para la lucha contra las plagas

El agua utilizada para la aplicación en el campo de fertilizantes y productos solubles en agua no deberá contener contaminantes microbianos en cantidades que puedan perjudicar la inocuidad de las frutas y hortalizas frescas. Deberá prestarse especial atención a la calidad del agua cuando se utilicen técnicas de distribución de fertilizantes (por ejemplo, aspersión) que exponen directamente la parte comestible de las frutas y hortalizas frescas al agua, sobre todo en fechas próximas a la cosecha ⁽³⁸⁾.

3.2.5. Estiércol, biosólidos y otros fertilizantes naturales

El empleo de estiércol, biosólidos y otros fertilizantes naturales en la producción de frutas y hortalizas frescas deberá hacerse de manera que se limite la posibilidad de contaminación microbiana. Cuando sea necesario se deberá adoptar procedimientos apropiados de tratamiento (por ejemplo, compostaje, secado por calor, secado al sol o combinaciones de éstos) para reducir o eliminar los agentes patógenos en el estiércol, los biosólidos y otros fertilizantes naturales ⁽⁶⁾.

Cuando se examine la idoneidad de las diferentes aplicaciones, deberá tenerse en cuenta el grado de reducción de patógenos conseguido. El estiércol, los biosólidos y otros fertilizantes naturales no tratados o parcialmente tratados podrán utilizarse únicamente si se adoptan medidas correctivas adecuadas para reducir los contaminantes microbianos, como por ejemplo aumentar al máximo el tiempo transcurrido entre la aplicación y la cosecha de las frutas y hortalizas frescas.

Deberá reducirse al mínimo el contacto directo o indirecto del estiércol, los biosólidos y otros fertilizantes naturales con las frutas y hortalizas frescas, sobre todo en fechas próximas a la cosecha ⁽⁶⁾. Se sugiere no abonar los cultivos de frutas y hortalizas con estiércol fresco o en lodo. Si se requiere abono, se debe aplicar un estiércol bien descompuesto o muy viejo (de más de un año) ⁽⁵⁾.

El uso de estiércol que no fue añejado o tratado apropiadamente puede incrementar el riesgo microbiano y contribuir a las enfermedades causadas por alimentos. La posibilidad de que la materia fecal entre en contacto con el producto, y de que el agua pueda salpicar patógenos del estiércol hacia los productos del campo hace ambas preocupaciones importantes. Los patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, y *Campylobacter* pueden estar presentes en el estiércol y en el suelo hasta 3 meses o más, dependiendo de las condiciones de temperatura y del suelo. Es un problema para los productores el hecho de que la bacteria *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir en el suelo hasta 3 meses. La bacteria *Yersinia enterocolitica* puede sobrevivir, pero no crecer en el suelo durante casi un año ⁽⁶⁾.

El estiércol animal puede ser una fuente valiosa de nutrientes, pero también puede ser una fuente de patógenos humanos si no se maneja debidamente. La preparación completa y apropiada del estiércol convirtiéndolo en composta, incorporándolo a la tierra antes de la siembra y evitando el contacto del cultivo con el mismo, son pasos importantes en la disminución del riesgo de contaminación microbiana ⁽⁵⁾.

El estiércol y los desechos biológicos sólidos constituyen un fertilizante inócuo y efectivo si se tratan debidamente. Si el tratamiento es inapropiado o inexistente, o se vuelven a contaminar y se utilizan como fertilizante para mejorar la composición del suelo, o se introducen en el agua superficial o las aguas subterráneas por desagüe, es posible que contenga microorganismos patógenos que pueden contaminar las frutas y hortalizas y representar un peligro para la salud. Los

cultivos que crecen dentro de la tierra o al ras del suelo son los que corren mayor peligro de contaminación por los microorganismos patógenos que pueden sobrevivir en el terreno. Las frutas y hortalizas que crecen a poca altura del suelo, y que pueden ser salpicadas con tierra durante el riego o por lluvias fuertes también corren peligro si los microorganismos patógenos del estiércol sobreviven en la tierra. Los productos cuya porción comestible generalmente no entra en contacto con la tierra corren menos riesgo de contaminación. Los agricultores que utilicen estiércol o desechos biológicos sólidos tienen que adoptar buenas prácticas agrícolas para reducir en lo posible el riesgo microbiológico. El uso de desechos biológicos sólidos o estiércol (incluido estiércol sólido o el líquido que escurre del mismo) tiene que controlarse cuidadosamente para reducir la posibilidad de contaminación con microorganismos patógenos ⁽³⁸⁾.

CAPÍTULO IV
METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación

La investigación que se llevó a cabo fue de campo y experimental.

De campo: porque los datos reales provinieron del sitio donde se cultivan las hortalizas en estudio y por tanto la toma de muestras se hizo en el lugar en donde se desarrollaron los hechos a investigar.

Experimental: ya que se realizó análisis microbiológicos en laboratorio para determinar la presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en muestras de agua para riego, preparados bioorgánicos y hortalizas.

4.2. Lugar y época de la investigación

La investigación se llevó a cabo en la Asociación Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO de R. L.), ubicada en Cantón Los Planes, La Palma, Chalatenango, El Salvador (Anexo N° 1; Fig. 20), el cual se localiza a una altura de 1880 m.s.n.m. y en la latitud 14° 23' 30" N y longitud 89° 06' 00" oeste; con temperatura promedio de 15.8 °C y humedad relativa promedio de 81%, con una precipitación acumulada de 1,900 mm anuales (20). Específicamente en parcelas de productores asociados a la cooperativa. Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de Investigación y Diagnóstico del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

El muestreo y los análisis microbiológicos de las hortalizas, los preparados bioorgánicos y el agua para riego se hicieron en época seca.

4.3. Toma de muestras de hortalizas, preparados bioorgánicos y agua para riego

Se determinó y se cuantificó los patógenos: *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en muestras de cuatro tipo de hortalizas fertilizadas y cultivadas orgánicamente: lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*), cilantro (*Coriandrum sativum*), rábano (*Raphanus sativus*) y cebollín (*Allium schoenoprasum*) (Anexo N° 1; Fig. 21); en muestras de tres tipos de preparados bioorgánicos: Bocashi, EM-5 y gallinaza. También se determinó coliformes fecales en muestras de agua utilizadas para el riego de las hortalizas colectadas directamente de la parcela de los productores. Fueron 20 muestras para hortalizas, 7 para preparados bioorgánicos y 5 para agua. El total de muestras analizadas fue de 32.

4.3.1. Toma de muestras de las hortalizas en campo

Se seleccionaron cinco parcelas pertenecientes a productores asociados a la Cooperativa (Anexo N° 2; Fig. 22). Cada parcela tuvo cultivada las cuatro hortalizas en estudio (Anexo N° 3; Fig. 23), y se tomó en cada parcela una muestra de 100 g por cada hortaliza de estudio (cuatro muestras de 100 g por parcela). En total fueron 20 muestras que se tomaron por las cinco parcelas de estudio (4 muestras por parcela por 5 parcelas= 20 muestras) (Cuadro 1).

Además se tomó datos informativos y georreferenciales de la ubicación de las parcelas (Cuadro 2). Estos datos fueron: dirección, altura sobre el nivel del mar, productor de la parcela y coordenadas geográficas (Anexo N° 4; Fig. 24).

Cuadro 1. Cuadro descriptivo de la cantidad (gramos) de muestras recolectadas por cultivo en cada parcela.

Parcela muestreada	Hortaliza cultivada. (Muestra)		Cantidad colectada
1	1	Rábano	100 gr
	2	Lechuga	100 gr
	3	Cilantro	100 gr
	4	Cebollín	100 gr
2	5	Rábano	100 gr
	6	Lechuga	100 gr
	7	Cilantro	100 gr
	8	Cebollín	100 gr
3	9	Rábano	100 gr
	10	Lechuga	100 gr
	11	Cilantro	100 gr
	12	Cebollín	100 gr
4	13	Rábano	100 gr
	14	Lechuga	100 gr
	15	Cilantro	100 gr
	16	Cebollín	100 gr
5	17	Rábano	100 gr
	18	Lechuga	100 gr
	19	Cilantro	100 gr
	20	Cebollín	100 gr

Cuadro 2. Georreferenciación de parcelas donde se obtuvieron las muestras.

Parcela	Coordenadas Geográficas	Altura sobre el nivel del mar (Metros)
1	N 14.32426° W 089.09386°	1,963 m
2	N 14.31903° W 089.09041°	1,905 m
3	N 14.31793° W 089.09091°	1,902 m
4	N 14.31553° W 089.08994°	1,919 m
5	N 14.31996° W 089.09590°	2, 020 m

4.3.1.1. Metodología estadística para toma de muestras de las hortalizas.

Se calculó el tamaño de muestra a tomar por cada hortaliza de estudio de las cuatro en total. Primeramente se determinó en cada parcela, cuanto es la producción en libras de cada una de las cuatro hortalizas cultivadas allí, y próximas a cosechar por el productor. Esto se hizo en las cinco parcelas de estudio y se obtuvo un total por hortaliza de las cinco parcelas.

Se sumó las producciones por tipo de hortaliza por las cinco parcelas y se obtuvo un total en libras, esta cantidad se dividió entre 5 y se obtuvo un promedio como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3: Promedio de producción en las 5 parcelas según hortaliza

Hortaliza	Promedio de producción en las 5 parcelas según hortaliza (libras)
Rábano	7,750 lb
Cilantro	5,857 lb
Lechuga	4,400 lb
Cebollín	3,600 lb
TOTAL	21,607 lb

El total se designó como “N” y se utilizó en la siguiente formula:

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

Dónde:

n= Universo de muestreo (población total)

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

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

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

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

d = precisión al 5%

Esta fórmula se aplicó para determinar el universo de muestreo (población total).

Sustituyendo datos se obtuvo:

$$n = (21,607) (1.96)^2 (0.5)(0.5)/(0.05)^2 (21,606) + (1.96)^2(0.5) (0.5)$$

$n = 377.33 \approx 377$

Universo de muestreo (población total)= 377 hortalizas

Tomando en cuenta la población total del universo de muestreo ($n=377$) y asumiendo que esa cantidad representó un 100%, entonces se calculó el porcentaje correspondiente (en base a ese 100%) de cada hortaliza según su producción de cosecha (lb) en el campo; y de acuerdo al porcentaje obtenido de cada hortaliza y aplicando regla de tres simple, se calculó la cantidad en libras de cada hortaliza de estudio que se tomó en cuenta para extraer de allí 100 gr que fue la muestra definitiva para la hortaliza en cuestión (Cuadro 4).

Cuadro 4: Cantidad necesaria para extraer 100 gramos según cultivo de hortaliza

Hortaliza	Promedio de Producción por cultivo de hortaliza en las 5 parcelas (libras)	%	Cantidad necesaria para extraer 100 g según cultivo de hortaliza
Rábano	7,750 lb	35.87 %	135.22 lb
Cilantro	5,857 lb	27.11 %	102.20 lb

Lechuga	4,400 lb	20.36 %	76.75 lb
Cebollín	3,600 lb	16.66 %	62.80 lb
TOTAL	21,607 lb	100 %	377 lb

Las plantas cultivadas se seleccionaron al azar a manera de “zig-zag”. En el laboratorio, al momento de hacer los análisis microbiológicos, se tomó 25 g de los 100 g obtenidos por cultivo de hortaliza por parcela.

4.3.1.2. Descripción del muestreo

Se utilizó los siguientes materiales y equipo: bolsas de cierre hermético tipo ziplock (26.8 cm x 27.3 cm), balanza manual, brocha pequeña, palín, asperjador con alcohol, libreta, lápiz, hielera, papel absorbente, cuchillo, tijera de podar.

Portando la indumentaria necesaria (guantes de látex, gabacha, cubreboca, redecilla, botas) para evitar contaminación microbiana, se extrajo del suelo las hortalizas que sirvieron para extraer de entre todas ellas; una muestra de 100 g. De cada planta, se tomó una pequeña parte representativa. Esto se hizo por cada tipo de hortaliza en las cinco parcelas del estudio.

Se quitó la mayor parte del suelo que contenía la hortaliza en su superficie (principalmente rábano y cebollín) con una pequeña brocha desinfectada y posteriormente se tomó una pequeña parte de esta planta (hortaliza) que se depositó en una bolsa ziplock. Luego se extrajo otra hortaliza, se limpió, y de nuevo se tomó solo una pequeña parte de esta, que se depositó en la misma bolsa. Este procedimiento se repitió en todas las hortalizas que se tomaron en cuenta de tal manera que al final se obtuvo una muestra de 100 g pesados con una balanza manual. Se utilizó un palín para remover el suelo, el cual previamente y después de la extracción de la hortaliza, se desinfectó con alcohol. La bolsa ziplock que contenía la muestra a analizar, se rotuló con datos de la parcela, hortaliza, fecha, productor, y otro que se consideró importante. La muestra se

depositó inmediatamente en una hielera para detener crecimiento microbiano, mantenerla fresca y protegerla del calor (Anexo N° 4; Fig. 25). El mismo procedimiento se utilizó para todas las demás muestras según tipo de hortaliza. Una vez recolectadas se trasladaron al laboratorio de Investigación y Diagnóstico del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la UES y se procesó inmediatamente. Algunas muestras que no se alcanzaron a procesar en el momento de su llegada, se almacenaron en refrigerador a 4°C para evitar el crecimiento bacteriano.

4.3.2. Toma de muestras de los preparados bioorgánicos

Se tomó muestras de siete preparados bioorgánicos utilizados por los productores para el cultivo orgánico de las hortalizas en estudio. Estos corresponden a cinco muestras de gallinaza (una muestra por parcela), una muestra de Bocashi, y una muestra de EM-5.

Se tomó una muestra definitiva de 100 g de gallinaza, 100 ml de EM-5 y 100 g de bocashi.

4.3.2.1. Toma de muestra de Bocashi

Se seleccionó una parcela en la cual el productor elabora bocashi. Este lo ofrece en venta a los demás productores si desearan aplicar a sus cultivos. En dicha parcela el productor lo utiliza para sí. Para toma de la muestra, se conoció en primer instante la cantidad total de bocashi almacenado. Con la cantidad conocida se aplicó la misma fórmula utilizada en el muestreo de hortalizas para calcular la cantidad (libras) a tomar en cuenta para extraer 100 g de bocashi, que fue la cantidad definitiva de muestra a tomar (Anexo N° 4; Fig. 26).

4.3.2.2. Toma de muestra de EM-5

Se seleccionó una parcela en la cual el productor elabora EM-5. Este lo comercializa a los demás productores para que lo utilicen en sus cultivos. Este producto se comercializa en litros. La muestra colectada consistió en la obtención de un litro de EM-5, que se trasladó en un recipiente estéril al laboratorio de Investigación y Diagnóstico para su análisis microbiológico.

4.3.2.3. Toma de muestra de gallinaza

Para toma de la muestra, se conoció en primer instante la cantidad total de gallinaza almacenada. Con la cantidad conocida se aplicó la misma fórmula utilizada en el muestreo de hortalizas para calcular la cantidad necesaria (libras) a tomar en cuenta para extraer 100 g de gallinaza, que fue la cantidad definitiva de muestra a tomar en cada una de las cinco parcelas. En total fueron cinco muestras de gallinaza de 100 g cada una. Una muestra por parcela.

En cada parcela, con la indumentaria personal necesaria (botas, gabacha, guantes, cubrebocas), se pesó y se tomó 100 g de gallinaza, procurando hacerlo de diferentes puntos representativos de la gallinaza almacenada en sacos (Anexo N° 5; Fig. 27). Los 100 gramos se depositaron en una bolsa ziplock, se rotuló y esta se colocó en una hielera. Se trasladó al laboratorio de Investigación y Diagnóstico para su análisis microbiológico.

4.3.3. Toma de muestra del agua de riego

El agua utilizada por los productores para el riego de las hortalizas, proviene específicamente de un río cercano a la zona de las parcelas. En un lugar estratégicamente seleccionado en el río, los productores artesanalmente han construido una pileta cuadrada no mayor de 1 m por lado, de donde conectan tubos de poliducto para conducir el agua colectada allí, y ser conducida por gravedad en una distancia no menor a 1 km hasta las parcelas para sus riegos. El riego en cada parcela se efectúa mediante aspersión. En total fueron 5 muestras

de agua que se tomaron por las 5 parcelas en donde el agua llega por gravedad y se distribuye a los cultivos por aspersión.

El agua muestreada en las parcelas de los productores se hizo directamente de los aspersores que utilizan para hacer el riego. Se utilizó similarmente un recipiente plástico estéril y se colocó en el aspersor funcionando (Anexo N° 6; Fig. 29). Los recipientes se rotularon y se depositaron en una hielera (Anexo N° 5; Fig. 28). Las muestras se trasladaron al laboratorio de Investigación y Diagnóstico para su análisis microbiológico.

4.4. Análisis microbiológico de hortalizas, preparados bioorgánicos y agua para riego

Para los análisis microbiológicos e interpretación de resultados de las hortalizas, los preparados bioorgánicos y el agua de riego, se utilizaron diversos medios de cultivos selectivos y de enriquecimiento, diversa cristalería, equipo especializado, Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) ⁽¹⁾.

4.4.1. Análisis microbiológicos de hortalizas

4.4.1.1. Determinación de *Escherichia coli* en muestras de hortalizas ⁽¹⁸⁾
(Anexo N° 7; Fig. 30).

Procedimiento en laboratorio:

1. Se pesó 25 g de muestra de la hortaliza en una bolsa ziplock. Se le agregó 225 ml de agua peptonada buferada y se agitó vigorosamente para homogenizar. Esta fue la dilución 10^{-1} .
2. A partir de la dilución anterior se realizó dos diluciones más hasta la 10^{-3} (Anexo N° 8; Fig. 31).

3. Se depositó con una pipeta, 1 ml de cada dilución en 2 Placas Petrifilm EC, siguiendo la metodología de siembra sugerida en este tipo de placas (Anexo N°8; Fig. 32).
4. Se incubó por 24 horas a 35 °C.
5. Se observó resultados: Colonias rojas-rosadas sin formación de gas: Resultado Positivo para bacterias no coliformes. Colonias rojas-rosadas y producción de gas: Resultado positivo para coliformes totales. Colonias azules con producción de gas: Resultado positivo para *Escherichia coli* (coliformes fecales).
6. Recuento de colonias: con el apoyo de un contador de colonias se contaron las colonias características de coliformes cecales en las dos placas de Petrifilm de la dilución mayor (10^{-3}), estas cantidades se promediaron. El promedio se multiplicó por el valor recíproco de la dilución empleada que en este caso fue de 1000. Se reportó el valor resultante como “Unidades Formadoras de Colonias por 25 gr de muestra de hortaliza”. Similarmente se hizo para coliformes totales (aunque no fueron objeto de estudio).
7. Se aplicó criterio microbiológico de inocuidad para *Escherichia coli* utilizando el Reglamento Técnico Centroamericano, específicamente en su apartado que corresponde al grupo de frutas y vegetales frescos (grupo 4 y subgrupo 4.1 respectivamente).

4.4.1.2. Determinación de *Salmonella spp.* en muestras de hortalizas ⁽¹⁸⁾

(Anexo N° 9; Fig. 33).

Procedimiento en laboratorio:

1. Se pesó 25 g de muestra y se incubó por 24 horas a 35 °C en 225 ml de caldo lactosado contenido en un Erlenmeyer. Esta fue la dilución 10^{-1} .
2. De la dilución 10^{-1} se pipeteó 1 ml a un tubo con Caldo Tetratonato y 0.1 ml a un tubo con Caldo Rappaport. Esto como un preenriquecimiento.

3. Se incubó a 35 °C por 24 horas el Caldo Tetrionato y a 42 °C por 24 horas el Caldo Rappaport. El crecimiento bacteriano es indicado por medio de turbidez en los caldos (Anexo N° 10; Fig. 34).
4. De cada tubo se tomó una asada y se estrió en dos cajas de Petri con Agar XLD (Anexo 10; Fig. 35) y similarmente en dos con Agar Salmonella-Shigella. Esto como prueba confirmativa.
5. Se incubó a 35 °C por 24 horas.
6. Se determinó la presencia o ausencia de colonias sospechosas de *Salmonella spp.* mediante la observación de colonias características en las placas. En Agar XLD: Colonias de color rojo con o sin centro negro (prueba positiva). Colonias no rojas (prueba negativa).
En Agar Salmonella-Shigella: Colonias de color negro brillante (prueba positiva). Colonias no negro brillante: prueba negativa.
7. Se realizó pruebas bioquímicas (TSI, MR-VP, MIO, INDOL) a colonias sospechosas en placas para confirmar los resultados.
8. Los resultados obtenidos se confrontaron con el Reglamento Técnico Centroamericano, específicamente en su apartado que corresponde al grupo de frutas y vegetales frescos (grupo 4 y subgrupo 4.1 respectivamente).

4.4.2. Análisis microbiológicos de Bocashi, EM-5 y gallinaza

4.4.2.1. Determinación de *Escherichia coli* en muestras de Bocashi, EM-5 y gallinaza ⁽¹⁸⁾ (Anexo N° 11; Fig. 36, Anexo N° 12; Fig. 37, Anexo N° 13; Fig. 38).

Procedimiento en laboratorio:

1. Se pesó 25 g de bocashi en una bolsa ziplock al cual se le agregó 225 ml de agua peptonada buferada, se agitó vigorosamente. Esta fue la dilución 10^{-1} . Similarmente se hizo también para gallinaza.

2. En el caso de EM-5, se midió 25 ml y se agitó igualmente como en el caso anterior (fueron diluciones 10^{-1}). Se procedió como sigue para Bocashi, EM-5 y gallinaza.
3. A partir de la dilución 10^{-1} se realizó dos diluciones más hasta la 10^{-3} .
4. Se depositó con una pipeta, 1 ml de cada dilución en 2 Placas Petrifilm EC siguiendo la metodología de siembra sugerida en este tipo de placas.
5. Se incubó por 24 horas a 35 °C.
6. Se observó resultados: Colonias rojas-rosadas con formación de gas: Resultado Positivo para bacterias coliformes totales. Colonias azules y producción de gas: Resultado positivo para coliformes fecales.
7. Se hizo recuentos numéricos y se reportó similarmente como en el recuento de coliformes en muestras de hortalizas.

4.4.2.2. Determinación de *Salmonella spp.* en muestras de Bocashi, EM-5 y gallinaza ⁽¹⁷⁾ (Anexo N° 14; Fig. 39, Anexo N° 15; Fig. 40).

Procedimiento en laboratorio:

1. Se pesó 25 g de bocashi y se incubó por 24 horas a 35 °C en 225 ml de caldo lactosado contenido en un Erlenmeyer (dilución 10^{-1}). Similarmente se hizo para gallinaza (Anexo N° 16; Fig. 41).
2. En el caso de EM-5, se midió 25 ml y se incubó igualmente como en el caso anterior (fueron diluciones 10^{-1}). Se procedió como sigue para bocashi, EM-5 y gallinaza.
3. De la dilución 10^{-1} se pipeteó 1 ml a un tubo con Caldo Tetrionato y 0.1 ml a un tubo con Caldo Rappaport. Esto como un preenriquecimiento.
4. Se incubó a 35 °C por 24 horas el Caldo Tetrionato y a 42 °C por 24 horas el Caldo Rappaport. El crecimiento bacteriano es indicado por medio de turbidez en los caldos.
5. De cada tubo se tomó una asada y se estrió en dos cajas de Petri con Agar XLD y similarmente en dos con Agar Salmonella-Shigella. Esto como prueba presuntiva.

6. Se incubó a 35 °C por 24 horas.
7. Se determinó la presencia o ausencia de colonias sospechosas de *Salmonella spp.* mediante la observación de colonias características en las placas.
8. Se realizó pruebas bioquímicas (TSI, MR-VP, MIO, INDOL) a colonias sospechosas en placas para confirmar los resultados.

4.4.3. Análisis microbiológicos de agua

4.4.3.1. Determinación de coliformes fecales en muestra de agua de riego ⁽¹⁷⁾ (Anexo N° 17; Fig. 42).

Procedimiento en laboratorio:

1. La muestra de agua se agitó vigorosamente unas 25 veces antes de analizarse, para asegurar una buena homogenización.
2. Se preparó una serie de 5 tubos conteniendo 10 ml de Caldo LMX Fluorocult de concentración doble y 2 series de 5 tubos con 10 ml de concentración simple. En total 15 tubos, tres series. Se rotularon.
3. Se inocularon con pipeta 10 ml del agua a analizar en 5 tubos con caldo LMX Fluorocult de concentración doble.
4. Se inocularon con pipeta 1 ml en 5 tubos con caldo LMX Fluorocult de concentración simple.
5. Se inocularon con pipeta 0.1 ml en los otros 5 tubos con caldo LMX Fluorocult de concentración simple.
6. Se incubó los tubos por 24 horas a 35 °C.
7. Se observaron resultados. Los tubos con viraje de color y formación de gas; indicaron presencia de coliformes totales.
8. Recuento de coliformes: se registró por cada serie de tubos el número de tubos con viraje de color. La serie obtenida se comparó con la tabla de NMP ⁽³²⁾ (Anexo N° 18). El valor NMP se reportó como coliformes por 100 ml de agua.

9. Los tubos positivos de CT se observaron por medio de lámparas UV (Anexo 31). Si hubo fluorescencia indicó presuntivamente presencia de *Escherichia coli* (coliformes fecales).
10. A los tubos fluorescentes se les agregó reactivo de indol (2 a 3 gotas). La formación de un anillo rojizo en el medio indicó presencia confirmativa de *Escherichia coli* (coliformes fecales).
11. De los tubos positivos de CF se pasó a Caldo EC y campana de Durham; y se incubó a 44.5 °C por 48 horas en Baño María. Esto como prueba confirmativa para *E. coli*.
12. Se observó resultados: Tubo positivo: presencia de turbidez y gas en campana, tubo negativo: ausencia de turbidez y gas en campana.
13. Se hizo recuento y se reportó los resultados aplicando tabla del NMP.
14. Los resultados obtenidos se confrontaron con el Criterio microbiológico para valorar la calidad microbiológica del agua de riego de acuerdo a la “Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales” ⁽²⁸⁾, Costa Rica.

4.5. Elaboración de Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la Elaboración de fertilizantes bioorgánicos

El manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la elaboración de fertilizantes bioorgánicos, se elaboró con el fin de ser entregado a ACOPO de R. L. y a productores de las parcelas, para que sea un documento práctico de consulta en un momento determinado. El manual se hizo con escritura comprensible y entendible por el lector. En él, se pretendió 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. El manual contuvo texto e ilustraciones para mejor transmisión de la información que fue de carácter técnico y científico, bajo un lenguaje apropiado.

El manual se elaboró a partir de datos e información que se colectó de diferentes maneras y de diversas fuentes confiables; primarias y secundarias. Se utilizó diferentes recursos para reunir información, entre éstas estuvieron entrevistas que se hicieron a los productores, ésta contuvo preguntas relacionadas a diferentes tópicos que bajo Buenas Prácticas de elaboración de fertilizantes y preparados bioorgánicos deben de considerarse y relacionarse con el fomento a la inocuidad de las hortalizas para que su consumo sea seguro. Estos tópicos tuvieron relación con el manejo y aplicación de los fertilizantes y preparados bioorgánicos en estudio, actitudes de higiene de los productores, instalaciones de elaboración y otros aspectos importantes.

Se recolectó información sobre la composición y elaboración de los preparados bioorgánicos, con el fin de señalar aspectos importantes de consideración para que las acciones tomadas en la elaboración y manejo estén dentro del marco de las Buenas Prácticas Agrícolas. Se observó con criterio técnico y se recolectó imágenes como elementos auxiliares.

4.6. Capacitación sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la elaboración de preparados bioorgánicos a productores de ACOPO de R. L.

Con la finalidad de dar a conocer los resultados obtenidos por 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; se realizó una capacitación dirigida a productores asociados a ACOPO de R. L. Para tal actividad, se convocó a los participantes en la cooperativa tomando en consideración la disponibilidad de los mismos. La presentación se hizo de forma expositiva y para tal fin se hizo uso de equipo tecnológico como computadora tipo laptop, proyector de imágenes, pasador de diapositivas, puntero laser.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y ANÁLISIS

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. Verificación de la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en hortalizas frescas tratadas con preparados bioorgánicos.

Verificación de *Escherichia coli*

Se analizaron las 20 muestras de hortalizas obtenidas de las cinco parcelas para la verificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Se utilizó placas petrifilm y una vez inoculadas se incubaron y se observó formación de colonias características; Coliformes totales: colonias rosas-rojizas con formación de gas, *E. coli*, colonias azules con formación de gas y colonias no coliformes: rojizas con ausencia de gas (Figura 1).

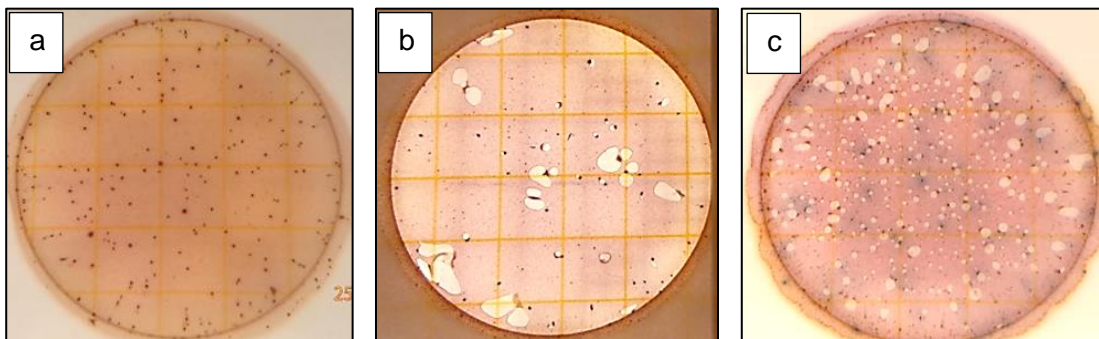


Figura 1. Placas Petrifilm: a) colonias no coliformes, b) colonias de coliformes totales (rosas-rojizas con formación de gas) y c) colonias de *E. coli* (Coliformes fecales; azules con formación de gas).

Se hizo recuento de colonias características de coliformes totales y *E. coli*, para estimar cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra. Se utilizó la placa con siembra de la dilución mas alta (Figura 2).



Figura 2. Recuento de colonias de coliformes y *E. coli* en placas Petrifilm.

Los recuentos estimados de coliformes totales y *E. coli* por gramos de muestra según hortalizas se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Verificación de coliformes totales y *Escherichia coli* en las diferentes hortalizas analizadas.

Parcela	Muestra de hortaliza	Recuento estimado: coliformes totales /g de muestra	Recuento estimado: <i>Escherichia coli</i> /g de muestra	Límite máximo permitido para <i>Escherichia coli</i> (RTCA 67.04.50:08)
1	Rábano	0 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cilantro	2000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Lechuga	2000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cebollín	3000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
2	Rábano	2000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cilantro	0 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Lechuga	5000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cebollín	6000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
3	Rábano	0 UFC/g	500 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cilantro	3000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Lechuga	0 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cebollín	0 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
4	Rábano	0 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cilantro	2000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Lechuga	0 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cebollín	0 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
5	Rábano	3000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cilantro	9000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g
	Lechuga	3000 UFC/g	4000 UFC/g	10 ² UFC/g
	Cebollín	21000 UFC/g	0 UFC/g	10 ² UFC/g

De las 20 muestras de hortalizas analizadas, solamente dos (rábano y lechuga) de dos parcelas diferentes, resultaron con presencia de *Escherichia coli*, en todas las demás no se encontró este patógeno. Las hortalizas son irrigadas por aspersión, autores ⁽³⁸⁾, señalan que el agua puede transmitir muchos microorganismos, como las variedades patógenas de *Escherichia coli*.

Siendo el rábano y lechuga, hortalizas con hojas anchas y rugosas, son más vulnerables a la adopción de patógenos, tal como señala ciertos autores ⁽³⁸⁾, que indican que las hortalizas con superficies amplias y aquellas en que, debido a sus características se puedan adherir con facilidad o quedar atrapados en ellas organismos patógenos (superficies rugosas, por ejemplo), corren mayor riesgo de contaminación.

La irrigación de las hortalizas se efectúa principalmente por la mañana, autores ⁽⁵⁾ mencionan que aplicando riego por aspersión por la mañana, la eficiencia del uso de agua es llevada al máximo y se 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 justificar en parte la ausencia de *Escherichia coli* en las demás hortalizas.

Considerando que las 20 muestras de hortalizas representan un 100%, se puede decir que solo un 10% resultó con contaminación. La mayoría de las hortalizas pueden consumirse con la seguridad de que éstas no causarán enfermedades gastrointestinales por *Escherichia coli* y otras relacionadas a este patógeno.

Verificación de *Salmonella* spp.

Luego de inocularse e incubarse, se observó crecimiento bacteriano para identificar posibles colonias sospechosas. En Agar Salmonella-Shigella (SS) las colonias características de *Salmonella* 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 sí lo hacen como *Proteus* y que también reducen el azufre ⁽¹⁴⁾ (Figura 3). Como resultado de la fermentación de lactosa se produce viraje de color.

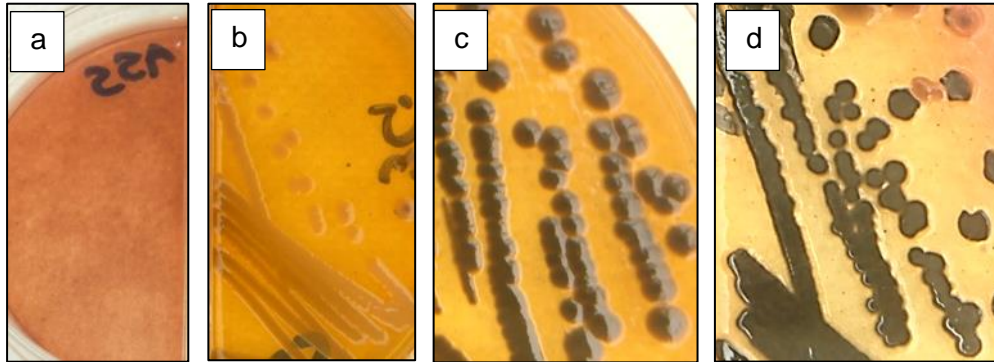


Figura 3. a) Agar SS sin inocular y b), c) y d) crecimiento de variadas colonias y viraje de color en medio de cultivo (fermentación de lactosa).

Luego de la incubación se observaron colonias en el medio XLD (Figura 4).

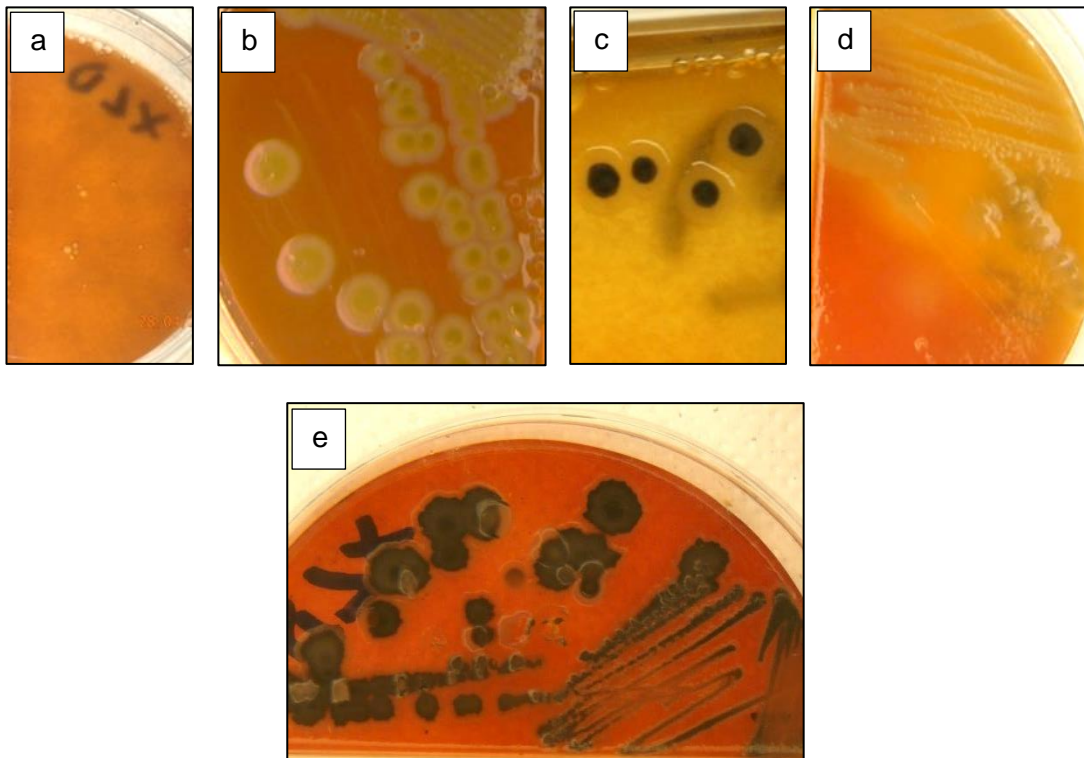


Figura 4. a) Agar XLD (rojizo) sin inocular, b), c), y d) crecimiento de variadas colonias y e) colonias sospechosas.

Cuadro 6: Determinación de colonias sospechosas (reducción de azufre) de *Salmonella spp.* en Agar XLD (AXLD) y Agar Salmonella-Shigella (ASS) en muestras de hortalizas.

Parcela	Muestra de Hortaliza	Colonias sospechosas		
		Presencia		Ausencia
		ASS	AXLD	ASS Y AXLD
1	Rábano			X
	Cilantro	X	X	
	Lechuga			X
	Cebollín			X
2	Rábano			X
	Cilantro			X
	Lechuga			X
	Cebollín			X
3	Rábano			X
	Cilantro			X
	Lechuga	X	X	
	Cebollín		X	
4	Rábano			X
	Cilantro			X
	Lechuga			X
	Cebollín			X
5	Rábano		X	
	Cilantro	X	X	
	Lechuga			X
	Cebollín			X

Se consideró pasar a pruebas bioquímicas aquellas colonias consideradas sospechosas por reducir el azufre con producción de H₂S, mostrando color negro. Las pruebas bioquímicas empleadas; y recomendadas entre otras por Le Minor y Richard citados por autores ⁽³⁴⁾ fueron de Indol, Movilidad, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y TSI (Figura 5 y 6).

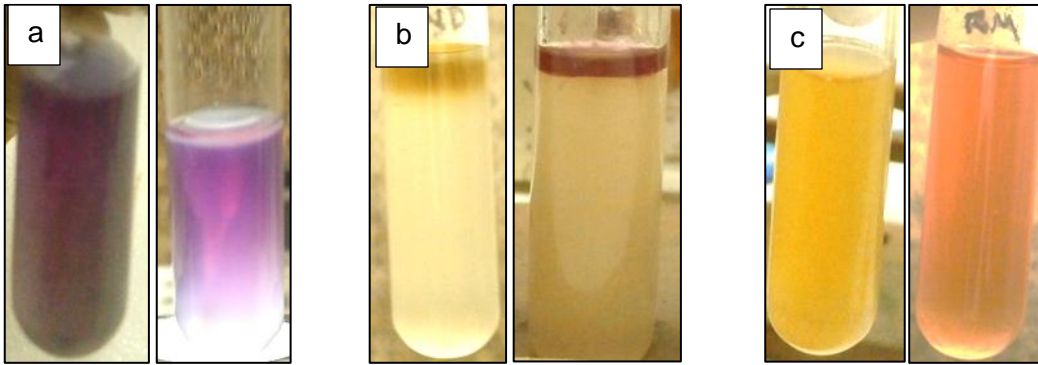


Figura 5. Pruebas bioquímicas para detección de *Salmonella spp.*: a) Medio MIO (resultado negativo y positivo (evidencia de movilidad)), b) prueba de Indol (negativo y positivo (anillo rojo)) y c) prueba de Rojo de metilo (negativo y positivo (rojo)).

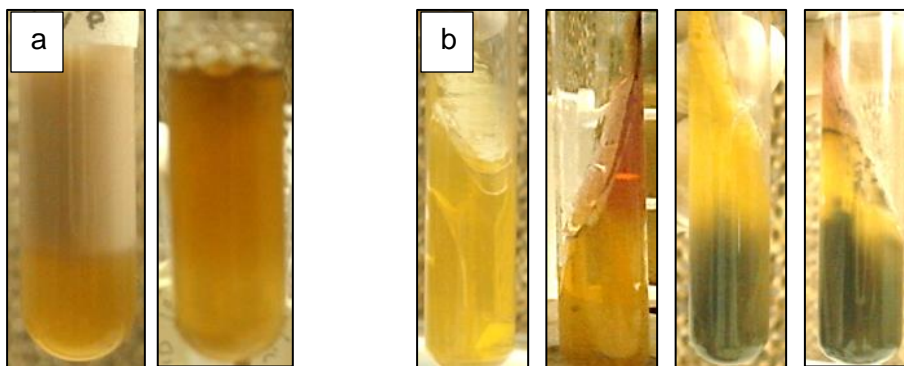


Figura 6. Pruebas bioquímicas para detección de *Salmonella spp.*: a) Prueba Voges Proskauer (resultado negativo y positivo), b) prueba de TSI (resultados de izquierda a derecha: A/A, K/A, A/A con ácido sulfídrico, y K/A con ácido sulfídrico).

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 ⁽³⁴⁾ (Cuadro 7).

Cuadro 7: Reacciones a Pruebas bioquímicas de *Salmonella spp.*

	Indol	RM	VP	MIO (Movilidad)	TSI
<i>Salmonella spp.</i>	-	+	-	+	K/A (Con producción de H ₂ S)

Fuente: Terragno, 2008

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas a partir de colonias sospechosas según muestra de hortaliza se presentan en el Cuadro 8, en donde se observa que los resultados obtenidos de las cinco pruebas bioquímicas no son iguales, no coinciden todas al compararse con resultados indicados en el Cuadro 7, según debiera ser para especies de *Salmonella*. Por ejemplo, ninguna en la prueba de TSI resultó ser K/A, por tanto no hubo fermentación de glucosa y ninguna produjo H₂S, siendo esta prueba determinante para no confirmar presencia de *Salmonella* en las muestras. Estudios ⁽³⁴⁾ indican que de aislamientos de *Salmonella spp.*, el 100% ha reaccionado positivamente a la prueba TSI en la fermentación de glucosa, produciéndose resultados alcalino sobre ácido (K/A), y con un 91.6% con producción de H₂S. También, en la mayoría de los casos, los resultados de la prueba rojo de metilo y la de Voges Proskauer son similares, es decir positivas, al respecto, en estudios realizados ⁽³⁴⁾, 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, la cual es perteneciente *Salmonella*, dan reacciones opuestas entre el rojo de metilo y VP.

Por tanto, al no coincidir completamente todas las reacciones; destacando resultados en la prueba del TSI, todas las muestras de hortalizas resultaron ser negativas para este patógeno (Cuadro 9).

Cuadro 8: Resultados de pruebas bioquímicas a colonias sospechosas en agares XLD y SS en muestras de hortalizas.

Parcela	Muestra de hortaliza	AGAR XLD/SS	Indol	RM	VP	MIO	TSI
1	Cilantro	XLD	-	+	+	+	A/A H ₂ S
		SS	-	+	+	+	A/A
3	Lechuga	XLD	-	-	+	-	A/A
		SS	-	+	+	+	A/A H ₂ S
	Cebollín	XLD	-	+	+	+	A/A H ₂ S
		SS	-	+	+	+	A/A H ₂ S
5	Rábano	XLD	-	+	+	+	A/A H ₂ S
	Cilantro	XLD	-	-	-	+	A/A
		SS	-	+	+	-	A/A

XLD: Agar Xilosa Lisina Descarboxilasa, Agar Salmonella-Shigella, 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 9: Determinación de *Salmonella spp.* en las diferentes hortalizas analizadas.

Parcela	Muestra de Hortaliza	Presencia/ Ausencia	Límite máximo permitido para <i>Salmonella spp.</i> /25g (RTCA 67.04.50:08)
1	Rábano	Ausencia	Ausencia
	Cilantro	Ausencia	Ausencia
	Lechuga	Ausencia	Ausencia
	Cebollín	Ausencia	Ausencia
2	Rábano	Ausencia	Ausencia
	Cilantro	Ausencia	Ausencia
	Lechuga	Ausencia	Ausencia
	Cebollín	Ausencia	Ausencia
3	Rábano	Ausencia	Ausencia
	Cilantro	Ausencia	Ausencia
	Lechuga	Ausencia	Ausencia
	Cebollín	Ausencia	Ausencia
4	Rábano	Ausencia	Ausencia
	Cilantro	Ausencia	Ausencia

	Lechuga	Ausencia	Ausencia
	Cebollín	Ausencia	Ausencia
5	Rábano	Ausencia	Ausencia
	Cilantro	Ausencia	Ausencia
	Lechuga	Ausencia	Ausencia
	Cebollín	Ausencia	Ausencia

Al determinarse ausencia en las muestras de hortalizas, y al comparar estos resultados con los criterios microbiológicos del Reglamento Técnico Centroamericano (Tabla 2), se reporta que las hortalizas son aceptables para el consumo y que por haber ausencia de *Salmonella spp.* no representan riesgo de contraer enfermedad al consumirse.

Tabla 2: 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: Adaptado de Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 67.04.50:08

5.2. Cuantificación de la presencia de coliformes fecales en agua utilizada para el riego en el cultivo de hortalizas frescas

En cada una de las cinco parcelas de donde se obtuvo las hortalizas, se colectó una muestra de agua de riego para analizarlas y determinar presencia de coliformes fecales en ellas.

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 7). 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 y puede causar enfermedades ⁽⁵⁾. 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 (27).

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 (38).



Figura 7. Riego con aspersores en las parcelas.

Algunos autores (5), 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. Los niveles de enfermedad en las plantas se pueden reducir también y la eficiencia del uso del agua de riego permanece al máximo con este método (5).

El análisis de las aguas muestreadas en las parcelas, se llevó a cabo empleando la técnica del NMP para 15 tubos y se hizo mediante: presunción y confirmación, en la cual se emplearon medios de cultivos selectivos y diferenciales. En la presunción –prueba presuntiva- se empleó Caldo LMX Fluorocult con el propósito de determinar –posible- presencia de coliformes totales y coliformes fecales. Se detectaron ambos grupos bacterianos: viraje de color indicó presencia de coliformes totales y fluorescencia indicó coliformes fecales (Figura 8).

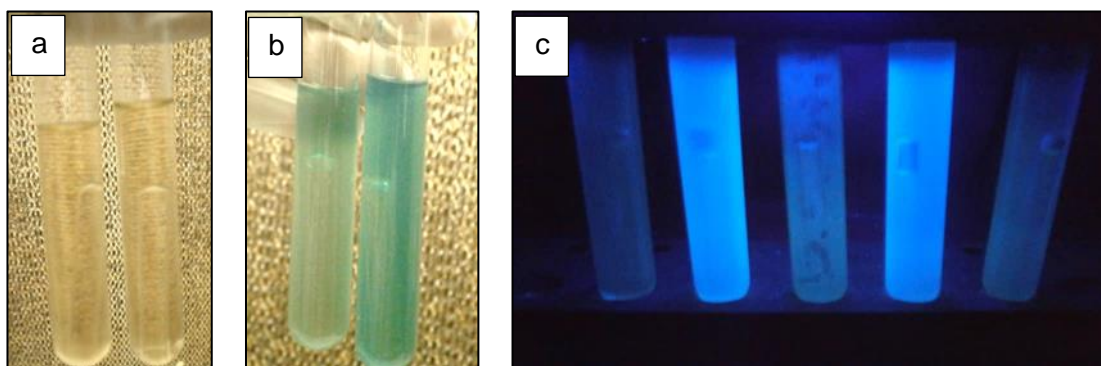


Figura 8. a) Caldo LMX Fluorocult: sin inocular, b) en azul turquesa (coliformes totales) y c) fluorescentes (coliformes fecales; *E. coli*).

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 9).



Figura 9. Detección de indol con reactivo de Kovac (anillo rojo) como prueba confirmatoria de presencia de *E. coli* (de izquierda a derecha).

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 10).

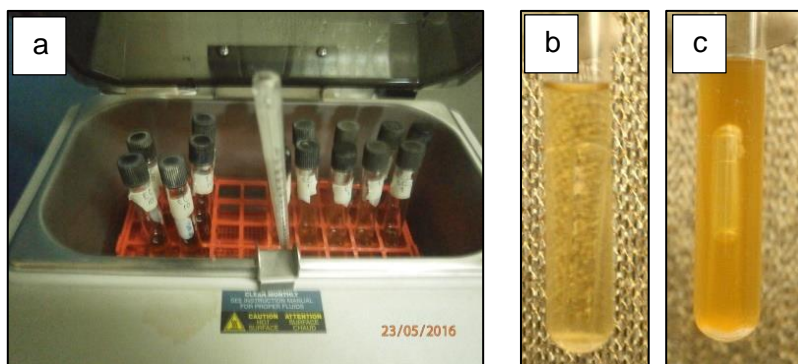


Figura 10. a) Incubación a 44.5 °C en Baño María, b) Caldo EC sin inocular y c) Caldo con turbidez y formación de gas en campana de Durham, indicativos de crecimiento de *E. coli*.

Se empleó tabla de NMP. El Número más probable por mililitro de agua de coliformes totales y fecales según muestra de agua por parcela se presenta en el Cuadro 10.

Cuadro 10: Número más probable (NMP) de coliformes totales y coliformes fecales por mililitro de agua en muestras de agua de riego por aspersión utilizada en las parcelas para los cultivos.

N° Parcela	Caldo LMX (Valores NMP/100 ml de agua en muestras de agua de riego).		*Límite máximo permitido en NMP/100 ml para la utilización del agua
	Coliformes totales	Coliformes fecales	
1	10	23	1000 CF
2	33	33	1000 CF
3	240	49	1000 CF

4	>1600	79	1000 CF
5	140	63	1000 CF
*Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales” de Costa Rica.			

Según los resultados de los análisis, las cinco muestras resultaron contaminadas con coliformes fecales, si bien es cierto están presente en el agua, estos no superan los 1000 NMP/ 100 ml por muestra que señala la “Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales” de Costa Rica. 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 considerando 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 por la normativa citada.

El agua de uso agrícola es frecuentemente un recurso compartido. En algunas regiones el agua de uso agrícola procede de aguas superficiales que recorren ciertas distancias antes de llegar al área de cultivo (27).

Al movilizarse el agua mediante tubería directamente del río hacia las parcelas, se demuestra que éste es fuente y vehículo de coliformes fecales (Figura 11 y 12). Investigadores de la Universidad de California concluyeron tras previos estudios sobre 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. De acuerdo a esta afirmación, el agua utilizada por los productores de ACOPO para el riego de las hortalizas puede emplearse para tal fin.

Si se utiliza agua superficial para el riego por aspersión, se debe examinar la fuente de agua (5), sugerencia aplicable para los mismos productores de la cooperativa quienes emplean este método de riego.



Figura 11. Pileta para provisión de agua en río donde se conectan tubos que la trasladan hacia las parcelas.



Figura 12. Tubos de movilización del agua por gravedad hasta las parcelas de los productores.

La calidad del agua puede ser más importante en casos en donde ésta entra en contacto directo con la parte comestible de la planta, especialmente cerca del período de cosecha ⁽⁵⁾. Para el caso, como ejemplo de esta aseveración se puede mencionar a las cuatro hortalizas del estudio, puesto que el agua entra en contacto directo con partes que son consumidas.

El conocimiento de la calidad del agua de riego asistirá 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 utilizando agua potable ⁽⁵⁾.



Figura 13. Calidad de agua del río.



Figura 14. Enmendaduras artesanales en tubos conductores del agua.

5.3. Determinación de la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en preparados bioorgánicos utilizados en el cultivo de hortalizas frescas.

Se analizó microbiológicamente los preparados bioorgánicos que utilizan los productores de ACOPO en sus cultivos, para determinar presencia de los patógenos *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Los preparados utilizados en las parcelas son gallinaza, bocashi y EM-5. La gallinaza es comprada por 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 (Figura 16).

Verificación de *Escherichia coli*

Cuadro 11: Determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de preparados bioorgánicos.

N° Parcela	Preparado Bioorgánico	Recuento estimado: coliformes totales /g de muestra	Recuento estimado: <i>Escherichia coli</i> /g de muestra
1	Gallinaza	4000 UFC/g	0 UFC/g
2	Gallinaza	1000 UFC/g	0 UFC/g
3	Gallinaza	0 UFC/g	0 UFC/g
4	Gallinaza	0 UFC/g	0 UFC/g
5	Gallinaza	0 UFC/g	0 UFC/g
	Bocashi	2000 UFC/g	0 UFC/g
	EM-5	0 UFC/g	0 UFC/ml

Tanto en la gallinaza, como en el bocashi y el EM-5 no se encontró la presencia del patógeno. Esto significa que los preparados bioorgánicos son seguros en su

aplicación a los cultivos de las hortalizas, puesto que no suponen riesgos microbiológicos de contaminación con este patógeno.

Verificación de *Salmonella spp.*

Se investigó también la presencia de *Salmonella spp.* en los mismos preparados bioorgánicos. Para el análisis microbiológico y la observación de colonias sospechosas -similarmente que para los análisis de las hortalizas-, se emplearon los mismos medios de cultivos y se emplearon las mismas pruebas bioquímicas como medios confirmatorios. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 12.

Cuadro 12: Determinación de *Salmonella spp.* en muestras de preparados bioorgánicos.

Par-cela	Preparado Bioorgánico	Colonias sospechosas <i>Salmonella spp.</i>		Pruebas Bioquímicas				
		ASS	AXLD	Indol	RM	VP	MIO	TSI
1	Gallinaza	X		-	-	-	-	A/A
2	Gallinaza		X	-	-	+	-	K/A GAS
3	Gallinaza		X	+	-	+	+	K/A GAS
4	Gallinaza	X	X	+	+	+	+	K/A GAS
5	Gallinaza		X	+	-	-	-	K/A
	Bocashi	X		+	+	+	+	K/A GAS
	EM-5	Ninguna	Ninguna					

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.

Se observó las reacciones preestablecidas que tiene *Salmonella spp.* a las pruebas bioquímicas empleadas, mostradas en el Cuadro 5. En el caso de las cinco muestras de gallinaza, al compararse los resultados obtenidos con los indicados en el referido cuadro, se observa 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, siendo una propiedad fisiológica característica de este patógeno. En la mayoría de los casos la prueba de Indol reportó ser positivo, no correspondiendo a lo preestablecido por esta bacteria que indica lo contrario, es decir; negativo. También en la mayoría de los casos los resultados de las pruebas Rojo de metilo y de Voges Proskauer son similares, contrastando los resultados preestablecidos que indican que éstos deben ser opuestos.

Esto 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. Autores ⁽⁵⁾, sugieren la incorporación, puesto que se sabe que muchos patógenos perjudiciales no sobreviven por mucho tiempo en el suelo.

En el caso del bocashi, los resultados no coincidentes con los señalados en el Cuadro 5 fueron los de la prueba de Indol y Voges Proskauer, que debieron ser negativos si se tratase de confirmación del patógeno, además que también no hubo producción de ácido sulfhídrico en la prueba de TSI, (a pesar de la fermentación de glucosa manifestado por ser K/A). Por tanto, este preparado bioorgánico no se considera vehículo de este patógeno, por tanto es seguro su empleo en el cultivo de las hortalizas.

El bocashi como preparado bioorgánico, es elaborado localmente para luego ser comercializado a los productores asociados a ACOPO, se elabora empleando materiales sólidos de desecho entre otros; carbón, granza, melaza, lechugas y gallinaza (que contiene estiércol de gallinas). La materia fecal animal es una

fuente conocida de microorganismos patógenos que puede causar enfermedades transmitidas por los alimentos ⁽³⁸⁾.

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 ⁽³⁸⁾. El bocashi elaborado en la cooperativa es preparado debidamente, el volteo diario es considerado y esto contribuye a que este fertilizante se produzca eliminando microorganismos patógenos.

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 ⁽³⁸⁾.



Figura 15. Almacenamiento de bocashi en area alejada de los cultivos, donde se deja pasar el tiempo antes de aplicarse a las parcelas

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



Figura 16. Toma de muestra de EM-5.

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

Se elaboró un manual técnico de consulta el cual se tituló: “Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y productos Bioorgánicos; elaboración, uso y manejo” (Figura 17), dirigido principalmente a productores de hortalizas asociados a ACOPO de R. L. quienes utilizan en sus cultivos algunos fertilizantes y otros productos preparados bioorgánicamente, también está dirigido a personas interesadas en conocer sobre las temáticas tratadas en el manual, como estudiantes, profesionales y personas tomadoras de decisiones.

El manual se elaboró con la finalidad de apoyar a los productores de ACOPO de R. L. en el conocimiento y uso de productos bioorgánicos. Ellos utilizan para sus cultivos: gallinaza, bocashi y EM-5, y por tal motivo la información presentada en el manual responde enfáticamente a fortalecer esas áreas. Los productores que utilicen estiércol o desechos biológicos sólidos tienen que adoptar Buenas Prácticas Agrícolas para reducir en lo posible el riesgo microbiológico ⁽³⁸⁾.

El uso y manejo irresponsable de productos bioorgánicos, supone un riesgo de contaminación microbiológica a las hortalizas mientras se cultivan, importantemente con microorganismos patógenos entre los cuales se puede

destacar a los estudiados en esta investigación, por consiguiente se deben poner en práctica acciones orientadas a disminuir a niveles seguros dichos riesgos mientras se preparan, manejan y se usan. Este conjunto de acciones se integran en las denominadas Buenas Prácticas Agrícolas. Por ello, el manual elaborado también contiene información relacionada con la misma, en donde se expresan sugerencias o consejos de buenas prácticas aplicables en las diferentes etapas por las cuales se desarrollan los cultivos, desde la selección de la parcela antes de la siembra hasta la cosecha y actividades de poscosecha. El uso de Buenas Prácticas Agrícolas, puede reducir el riesgo de contaminación microbiológica de hortalizas ⁽³⁸⁾.

La información contenida en el manual se obtuvo de fuentes bibliográficas confiables, y va acompañada de dibujos y fotografías para facilitar y enriquecer la comprensión del mensaje que se desea transmitir. El documento consta de 98 páginas y se divide ordenadamente en ocho capítulos distribuidos en dos partes: i) Fertilizantes y productos bioorgánicos y ii) Buenas Prácticas Agrícolas. En la primera se presenta información referida a la preparación, uso y manejo de bocashi, EM-5 y biofertilizantes, sus beneficios, recursos e insumos y ejemplos prácticos de elaboración. En la segunda parte en relación a Buenas Prácticas Agrícolas se presentan consejos y sugerencias de acciones adoptables orientadas a proteger los recursos naturales, salvaguardar la salud del productor, producir hortalizas libres de contaminantes y sobre todo libre de patógenos.

Las sugerencias hacen alusión 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. Personal representante de la misma recibieron el documento (Figura 18).

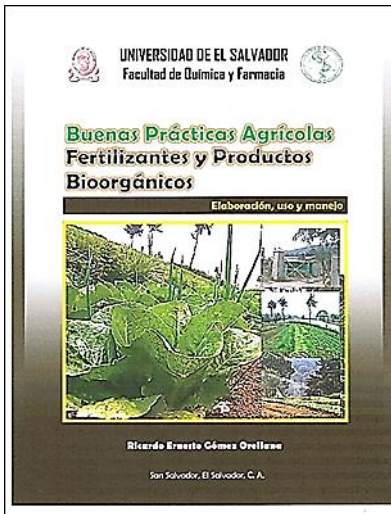


Figura 17. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos.

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

En instalaciones de ACOPO de R. L. se desarrolló una capacitación sobre Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la Elaboración de Fertilizantes y Productos Bioorgánicos. Es imprescindible contar con trabajadores agrícolas capacitados para la labor que desempeñarán ⁽²⁷⁾. 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 importantemente en la elaboración, manejo y uso de productos bioorgánicos utilizados por ellos en sus parcelas. Las consideraciones expuestas se orientaron a proteger y hacer buen uso de los recursos naturales como también salvaguardar el bienestar de los productores.

Como resultado de ésta capacitación, los productores obtuvieron conocimiento sobre los riesgos y peligros asociados con malas prácticas agrícolas y 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 generó

conciencia sobre la importancia de cultivar hortalizas libre de patógenos y por consiguiente que no enfermen en su consumo al fresco.

En la jornada también se socializó los resultados obtenidos de esta investigación.



Figura 18. Capacitación a productores de ACOPO sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la Elaboración de Fertilizantes y Product Bioorgánicos a representante de ACOPO de R. L.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Las hortalizas frescas analizadas microbiológicamente, son inocuas en el 90% y 100% para el caso de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* respectivamente.
2. El riego por aspersión no es el adecuado para el cultivo de las hortalizas, el agua presentó coliformes fecales, sin embargo puede ser empleada ya que no supera los 1000 CF/100 ml que declara la normativa consultada.
3. Las hortalizas de hojas anchas como rábano y lechuga, son especialmente vulnerables a contaminación por patógenos por medio del agua de riego, debido a que exponen mayor área superficial de contacto en sus hojas.
4. La aplicación de gallinaza, EM-5 y bocashi en el cultivo de las hortalizas no representa riesgo de contaminarlas, ya que no se encontró en ellos especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*, produciéndose así vegetales libres de éstos patógenos.
5. El Manual: “Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y productos bioorgánicos”, es de gran beneficio para los productores de ACOPO, puesto que proporciona algunos principios básicos y prácticas recomendadas para reducir al mínimo el riesgo microbiológico en la producción de las hortalizas frescas.
6. La capacitación a productores de ACOPO, sobre Buenas Prácticas Agrícolas en la Elaboración de Fertilizantes y Productos Bioorgánicos, fue importante porque se dio a conocer los peligros biológicos a las que se exponen las hortalizas y se concientizó sobre la importancia de aplicar Buenas Prácticas Agrícolas y producir fertilizantes y productos bioorgánicos con las medidas pertinentes necesarias.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

1. Analizar microbiológicamente otras hortalizas producidas por ACOPO de R.L. no consideradas en este estudio; como zanahoria y espinaca, para determinar la presencia de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*.
2. Analizar microbiológicamente cada seis meses, el agua de riego a efectos de valorar la cantidad y diversidad de microorganismos patógenos transmitidos –en especial coliformes fecales- y determinar su aceptabilidad o no para tomar decisiones importantes.
3. Aplicar riego por goteo en el cultivo de las hortalizas, ya que el agua no contacta directamente a las mismas y se disminuye el riesgo por contaminación de patógenos.
4. Valorar la conveniencia de establecer un sistema que permita filtrar el agua que se emplea para el riego de las hortalizas.
5. Analizar microbiológicamente la gallinaza y bocashi para determinar la presencia de posibles parásitos patógenos que puedan transmitirse en las mismas, y a la vez, analizar las hortalizas frescas para verificar una posible correlación.
6. Fortalecer las prácticas de cultivo de las hortalizas frescas con la aplicación de las “Buenas Prácticas Agrícolas” a efectos de reducir los peligros microbiológicos y producir hortalizas más seguras.
7. Capacitar periódicamente a los productores y demás manipuladores de ACOPO en temas de inocuidad de hortalizas frescas, para que conozcan y sean concientes de las fuentes y formas de transmisión de peligros microbiológicos tanto en el campo como en la planta procesadora.

CAPÍTULO VIII
BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos. Reglamento Técnico Centroamericano. NSO. RTCA. 67.0450:08. [internet] PDF. Grupo N° 4. Pág. 13 [Consulta el 7 de agosto de 2013]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/74028080/RTCA-67-04-50-08-NSO-CRITERIOS-MICROBIOLOGICOS-PARA-LA-INOCUIDAD-DE-ALIMENTOS>
2. Aycachi Inga R. Determinación de Coliformes Totales y Fecales. Método de recuento por dilución en tubo: NMP [Internet]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Escuela Profesional de Biología; 2008. [consulta el 29 de Mayo de 2015]. Disponible a: <http://www.monografias.com/trabajos89/determinacion-coliformes-totales-fecales/determinacion-coliformes-totales-fecales.shtml>.
3. Becton Dickinson GmbH. 2013. BD AGAR XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato). INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR. Consultado 24 de Sep 2016. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8783>
4. Becton Dickinson GmbH. 2013. BD Salmonella Shigella Agar. INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR. Consultado 24 de Sep 2016. Disponible en: <http://www.bd.com/resource.aspx?id=8779>
5. Bihn E, Ansuya Rangarajan, Gravani R, Scott D, Pritts M, Vidal J. La Seguridad de los Alimentos Empieza en el Campo: Una Guía para el Productor Buenas Prácticas Agrícolas para Frutas y Hortalizas Frescas. [Internet]. [Consulta el 22 de Noviembre de 2015]. Disponible en: http://extensionespanol.net/pubs/fsbf_span.pdf

6. Código de prácticas de higiene para las frutas y hortalizas frescas [Internet]. [consulta el 10 de noviembre de 2015]. Disponible en:
[Http://www.fao.org/ag/agn/cdfruits_es/others/docs/alinorm03a.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/cdfruits_es/others/docs/alinorm03a.pdf)
7. Coliforme fecal. Determinación del número más probable de coliforme fecal por la técnica de los tubos múltiples [Internet] [consulta el 29 de Mayo de 2015]. Disponible en:
<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/013761/013761-03.pdf>
8. Colección buenas prácticas; aboneras tipo bocashi. [internet]. Guatemala: FAO. Programa extraordinario de apoyo a la seguridad alimentaria y nutricional; 2011 [Consulta el 24 de julio de 2013]. Disponible en:
http://www.coin.fao.org/coinstatic/cms/media/.../aboneras_final_alta_resolucion.pdf
9. Hernández–Domínguez C, Hernández–Anguiano A, Cháidez–Quiroz C, Rendón–Sánchez G, y Suslow T. Detección de Salmonella y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón "Cantaloupe". Agric. Téc. Méx vol.34 no.1 [Internet]. 2006 [Consulta el 10 de mayo de 2015]; Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172008000100009
10. Higa T, Parr J. Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible. Centro Internacional de Investigación de Agricultura Natural. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [Internet]. [Consulta el 29 de Mayo de 2015] Disponible en:
http://www.fundases.com/userfiles/file/MicroorG_Benef_Efect.pdf
11. Laboratorios Britania S.A. Caldo EC. Consultado 26 de Oct. 2017. Disponible en:

<http://www.britanialab.com/producto/B02168%20REV%2001EC%20MEDIO.pdf>

12. Laboratorios Britania S.A. Caldo Lactosado. Consultado 26 de Oct. 2017.

Disponible en:

<http://www.britanialab.com/productos/B02155%20REV%2001LACTOSADO%20CALDO.pdf>

13. Laboratorios Britania S.A. Caldo Tetrionato. Consultado 26 de Oct. 2017.

Disponible en:

<http://www.britanialab.com/productos/B02145%20REV%2001TETRATONATO%20CALDO%20BASE.pdf>

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

15. Ley Federal de Derechos Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales 2014. Comisión Nacional del Agua. [Consulta el 24 de Noviembre de 2015]. Disponible en:

<http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/LeyFederaldeDerechos.pdf>

16. Lira, LB. *et. al.* Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Zaragoza. 2003.

17. Manual de laboratorio. Agentes Patógenos. Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. CENSALUD. 2013.

18. Manual de laboratorio. Microbiología de alimentos. Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. CENSALUD. 2013.

19. Manual práctico de uso de EM. Banco Interamericano de Desarrollo. Proyecto de Reducción de Pobreza y Mejora de las Condiciones Higiénicas de los Hogares de la Población Rural. 2009.
20. MARN (Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales, SV). Boletín Climatológico Anual 2014. Informe anual 2014. El Salvador. 2014.
21. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Elaboración y uso del bocashi. Programa especial para la seguridad alimentaria en El Salvador. 11 p.
22. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Repelente natural y bioestimulante EM-5, Guía Técnica 9. Proyecto para el Apoyo a Pequeños Agricultores en la zona Oriental (PROPA-Oriente).
23. Norma chilena. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos. [Consulta el 24 de Noviembre de 2015]. Disponible en:
http://ciperchile.cl/pdfs/11-2013/norovirus/NCh1333-1978_Mod-1987.pdf
24. Norma de Calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua. [Consulta el 24 de Noviembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.industrias.ec/archivos/CIG/file/CARTELERA/Reforma%20Anexo%2028%20feb%202014%20FINAL.pdf>
25. Petrifilm™ Microbiology 3M™. 2009. Guía de interpretación. Placas Petrifilm™ para el recuento de E. coli/Coliformes. Consultado 24 de Sep 2016. Disponible en:
http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

26. Prácticas Microbiológicas de alimentos [Internet]. 1997. [Consulta el 27 de Mayo de 2015]. Disponible en:
<https://books.google.com.sv/books?id=Tq8nBgAAQBAJ&pg=PA67&lpg=PA67&dq=bacterias+coliformes+fecales+citrobacter,+klebsiella,+e.+coli,+enterobacter&source=bl&ots=dtbkGqTN2Z&sig=DIRewCahEEi7y2stipDSwQywrEq&hl=es419&sa=X&ei=sIRoVcTIHoXeoASjnoJA&ved=0CFQQ6AEwCQ#v=onepage&q&f=false>
27. Quintanilla Escobar ZA. Manual ilustrado de buenas prácticas agrícolas para la producción con inocuidad de frutas y hortalizas, considerando el Cambio Climático. La Paz, Bolivia. Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras (MDRyT); 2014.
28. Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales. La Gaceta Digital. Diario Oficial. [Consulta el 24 de Noviembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.hacienda.go.cr/centro/datos/Decreto/Decretos%2033903MINAESReglamento%20para%20Evaluaci%C3%B3n%20y%20Clasificaci%C3%B3n%20de%20Cuerpos%20agua%20Superficiales-La%20Gaceta%20178-17%20SET-2007.pdf>
29. Rivera Jacinto M, Rodríguez Ulloa C, López Orbegoso J. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública [Internet]. 2009 [Consulta el 29 de Mayo de 2015]. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/medicina_experimental/v26_n1/pdf/a09v26n1.pdf
30. Rodríguez García MO, Torres Vitela MR, Olea Rodríguez M de los A, Muñiz Flores JA. Manual de Prácticas de Laboratorio. Microbiología Sanitaria.

- Guadalajara, MX. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías; 2016.
31. Salazar Sosa E, Fortis Hernández M, Vázquez Alarcón A, Vázquez Vázquez C. Agricultura Orgánica. México. Facultad de Agricultura y Zootecnia de la UJED. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. 2003.
32. Tabla NMP Series de 5 tubos [Internet]. Slideshare [Consulta el 20 de Julio de 2015]. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/egrandam/tabla-9221-nmp-series-de-5-tubos>
33. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos [Internet]. México: Facultad de Química, UNAM; 2009 [consulta el 29 de Mayo de 2015]. Disponible en:
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tecnic-Basicas-Coliformes-en-placa_6528.pdf
34. Terragno R, Caffer M, Insztein N. Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp.* Ministerio de Salud. Cordova, Argentina [Internet]. 2008 [Consulta el 6 de Mayo de 2018]. Disponible en:
http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Salmonella_2008.pdf
35. Torres Caballero, AE. Temas de Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba. Ciencias Médicas; 2008.
36. Torres Vitela, MR. Riesgos asociados al consumo de alimentos. Guadalajara, MX. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías; 2013.
37. Torres Vitela, MR. Seguridad Alimentaria. Guadalajara, MX. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías; 2016.

38. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 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. [Internet]. [consulta el 10 de Noviembre de 2015]. Disponible en:
<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM186594.pdf>
39. Venegas Alarcón, AM. Compendio de Bacteriología. Guadalajara, MX. Centro Universitario de Ciencias Exactas; 2010.

ANEXOS

Anexo N° 1



Figura 19. Asociación Cooperativa de Productos Agropecuarios y Servicios Múltiples Productos Orgánicos (ACOPO de R.L.).

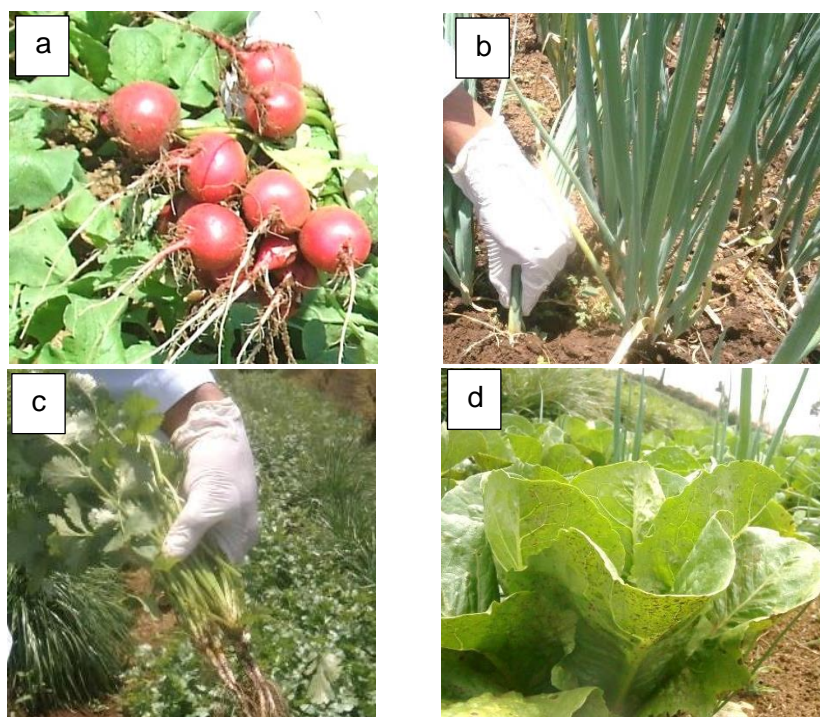


Figura 20. Hortalizas de la investigación: a) rábano (*Raphanus sativus*), b) cebollín (*Allium schoenoprasum*), c) cilantro (*Coriandrum sativum*) y d) lechuga (*Lactuca sativa* L. var. longifolia).

Anexo N° 2



Figura 21. Parcelas seleccionadas de productores con cultivos de hortalizas tratadas bioorgánicamente.

Anexo N° 3

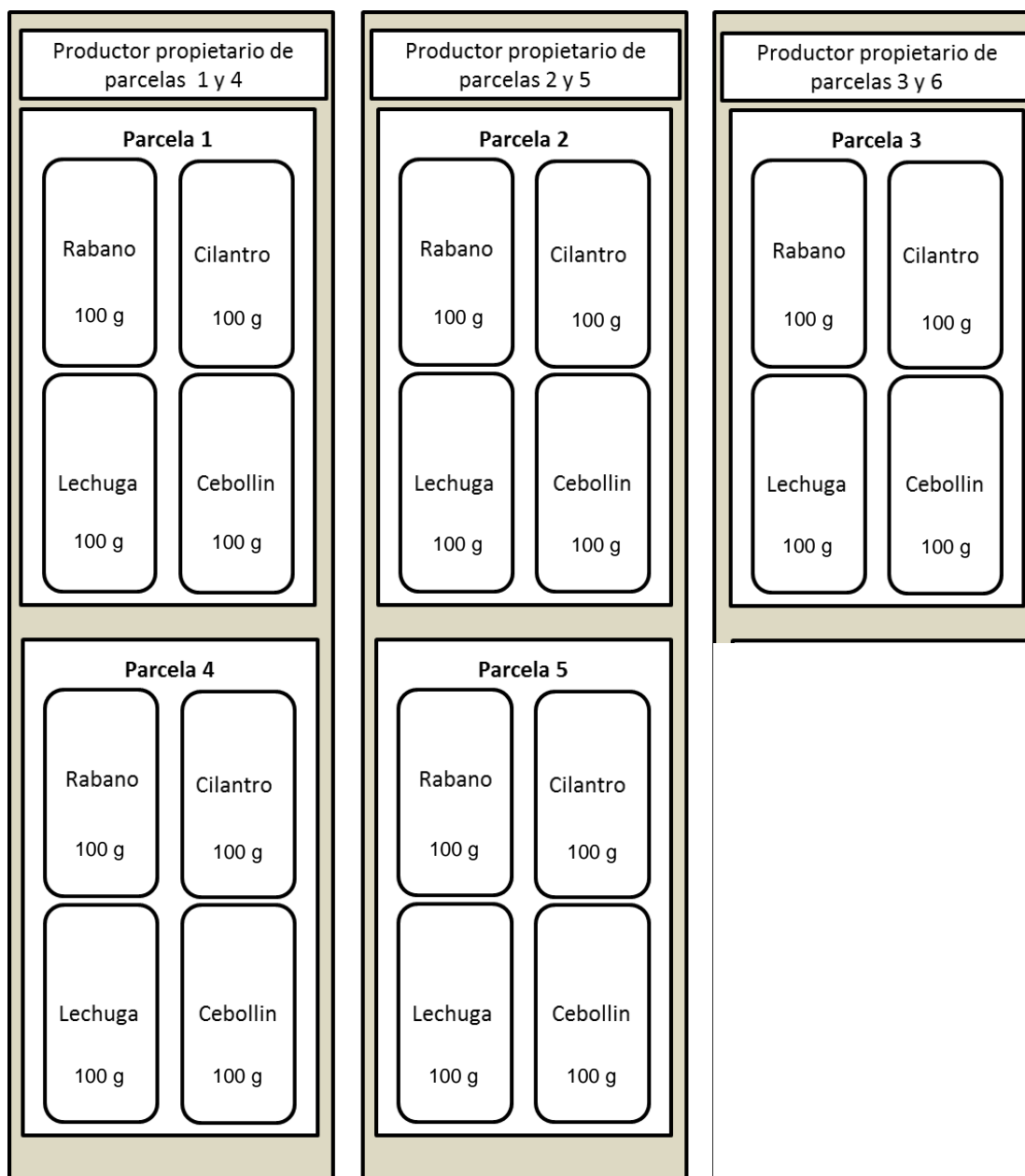


Figura 22. Esquema descriptivo de la distribución de parcelas con las hortalizas de estudio. Cinco parcelas en total. Cada parcela con los cuatro cultivos de las hortalizas de estudio: rábano, cilantro, lechuga y cebollín.

Anexo N° 4



Figura 23. Georreferenciación de la ubicación de las parcelas de los productores mediante GPS.



Figura 24. a) Indumentaria para muestreos. b) Desinfección de tijera de podar. c) Toma de muestra de hortalizas y d) depositadas en hielera para su traslado al laboratorio.



Figura 25. a) Almacenamiento de bocashi, b) rotulación de bolsa ziplock y c) toma de muestra de bocashi.

Anexo N° 5



Figura 26. a) Almacenamiento de gallinaza en parcelas, b) desinfección de palín con alcohol y c) toma de muestra de gallinaza.



Figura 27. Muestra de agua de riego de parcelas en recipiente estéril y depositado en hielera para su traslado al laboratorio.

Anexo N° 6



Figura 28. Toma de muestra de agua de riego en asperjadores de las parcelas.

Anexo N° 7

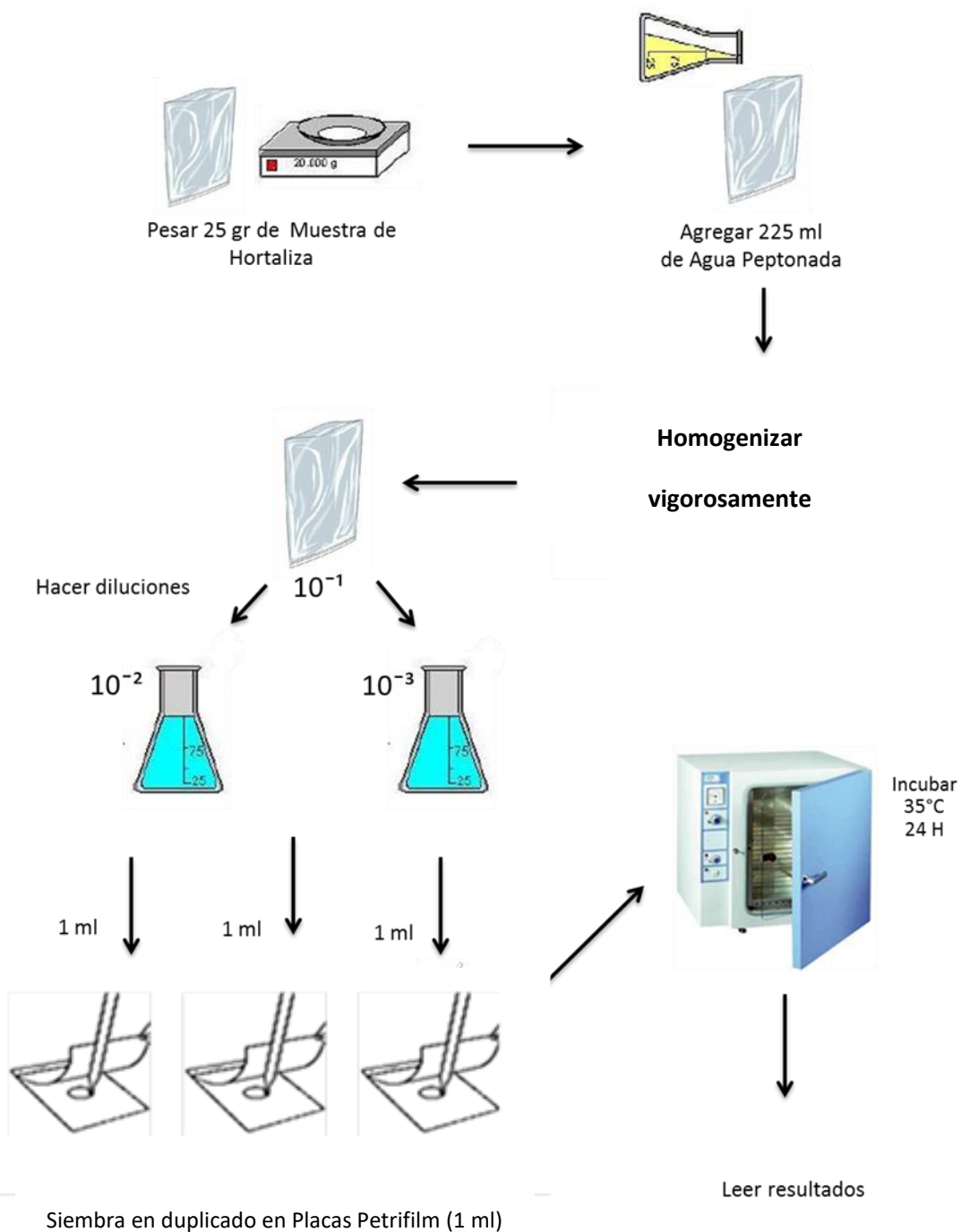


Figura 29. Marcha analítica para determinación de *Escherichia coli* en muestras de hortalizas.

Anexo N° 8



Figura 30. Creación de diluciones previo a las inoculaciones.

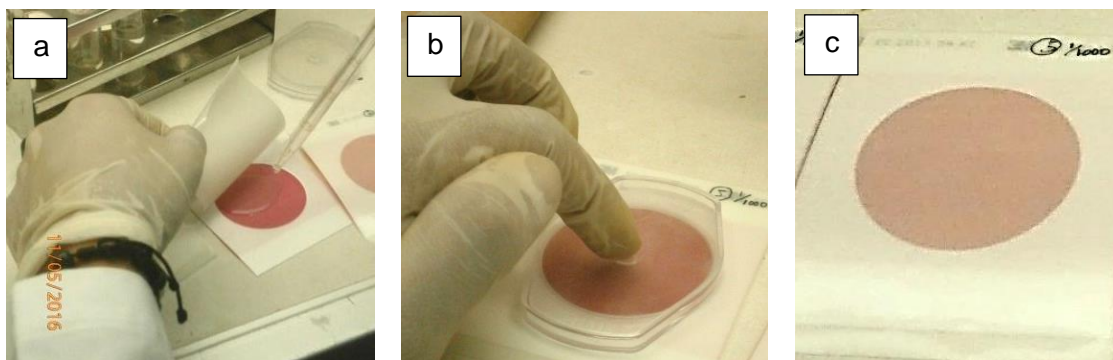


Figura 31. a) Inoculación (siembra) en placas Petrifilm, b) distribución del inóculo a leve presión y c) placa inoculada lista a incubarse.

Anexo N° 9

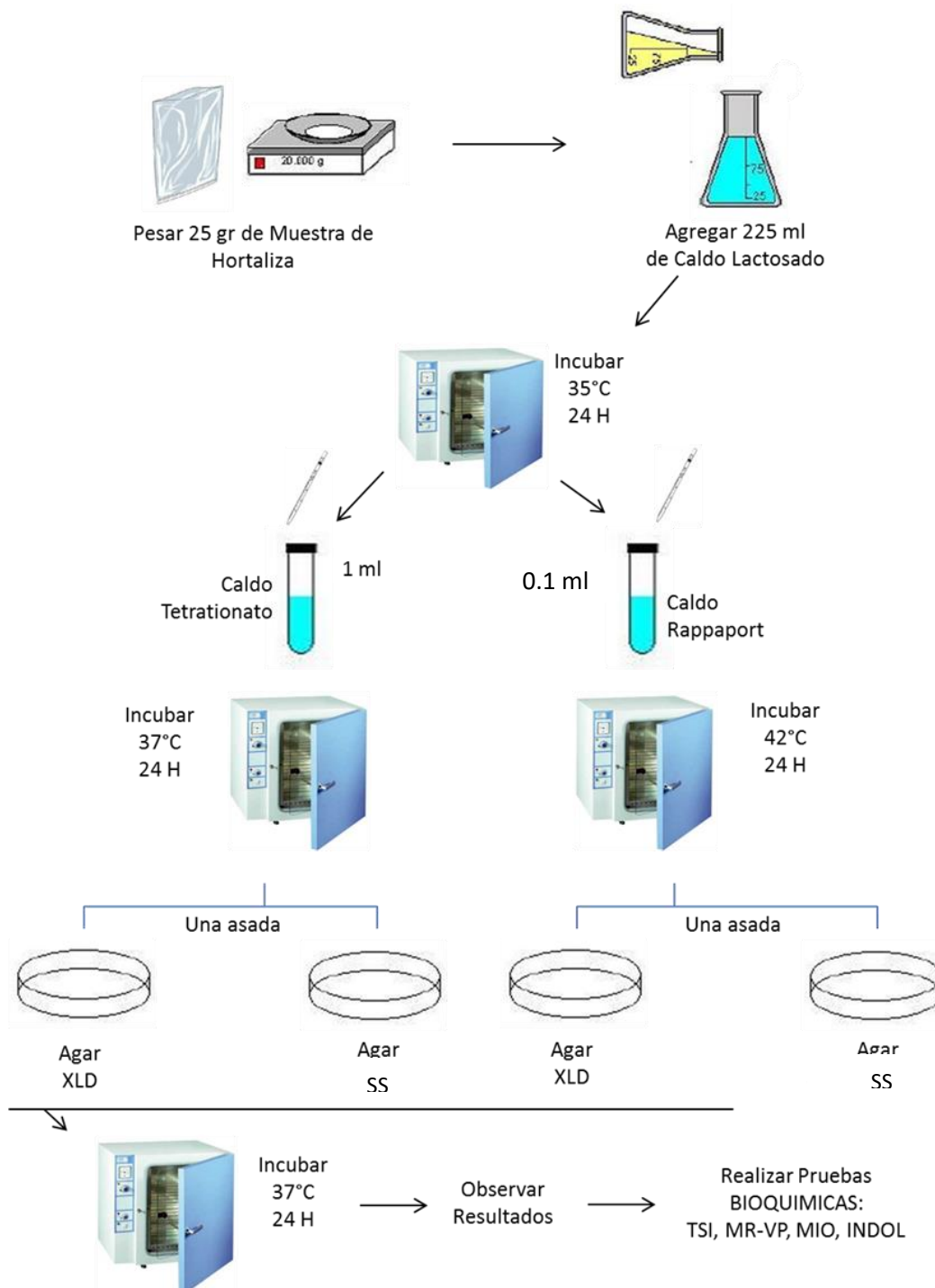


Figura 32. Marcha analítica para determinación de *Salmonella* spp. en muestras de hortalizas.

Anexo N° 10

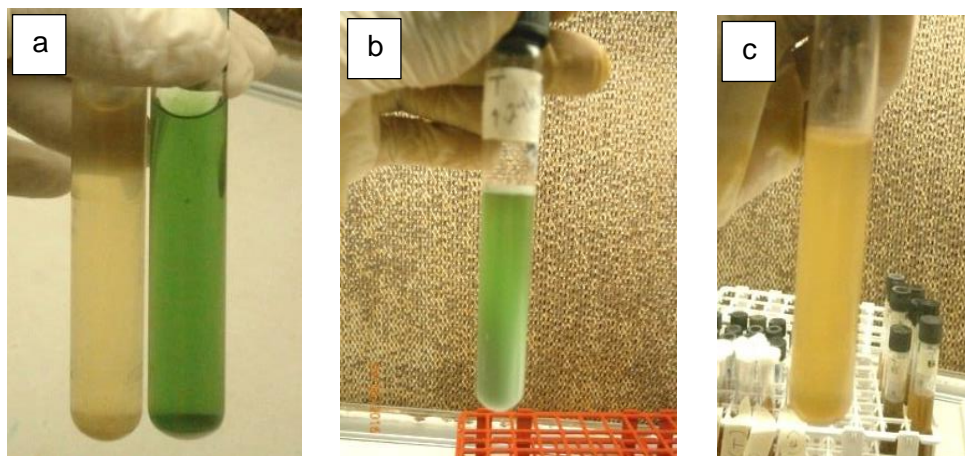


Figura 33. a) Caldos: Rappaport (amarillo claro) y tetratonato (verde), b y c) Caldos con crecimientos bacterianos.



Figura 34. Siembra en placas con Agar XLD

Anexo N° 11

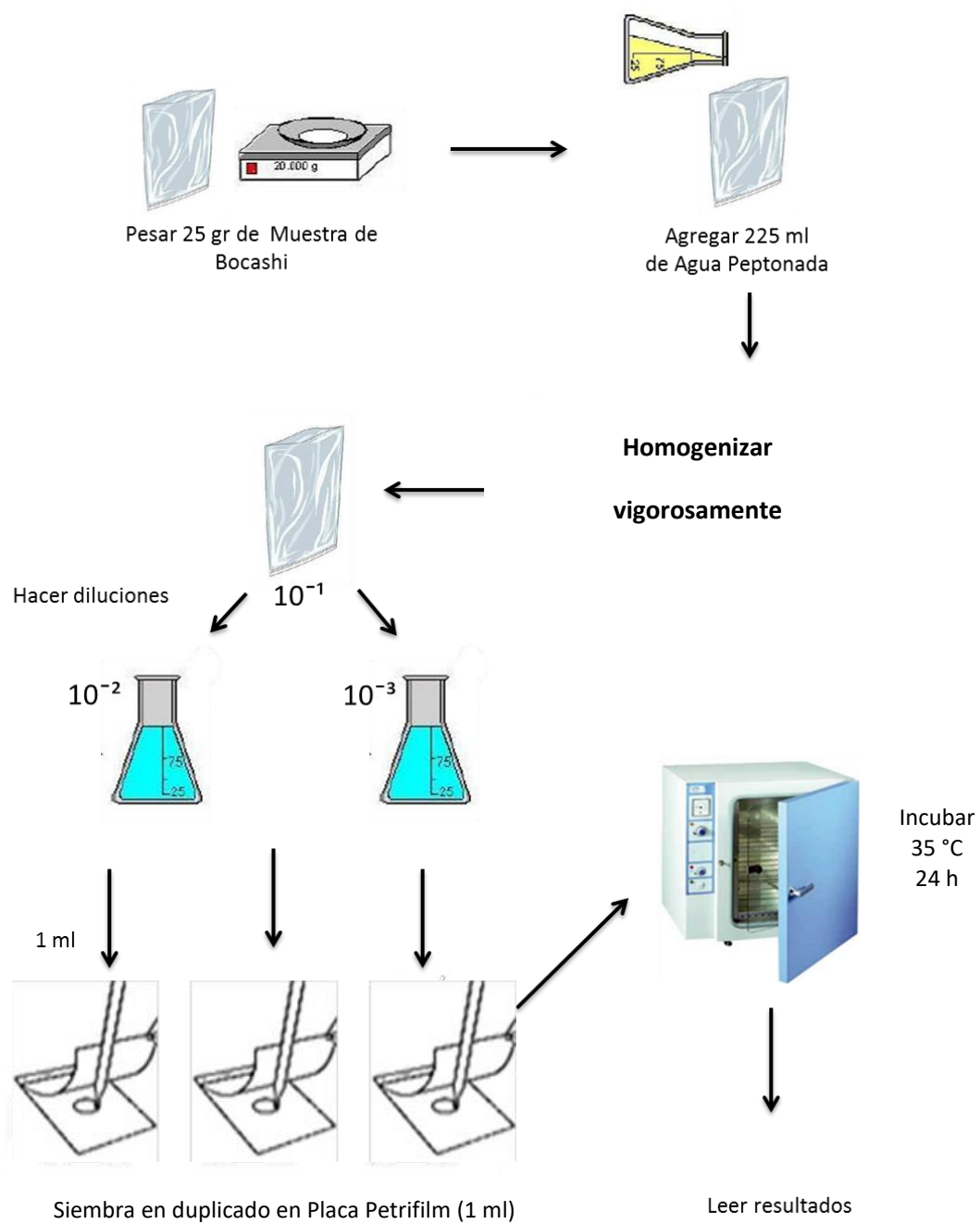


Figura 35. Marcha analítica para determinación de *Escherichia coli* en muestra de Bocashi.

Anexo N° 12

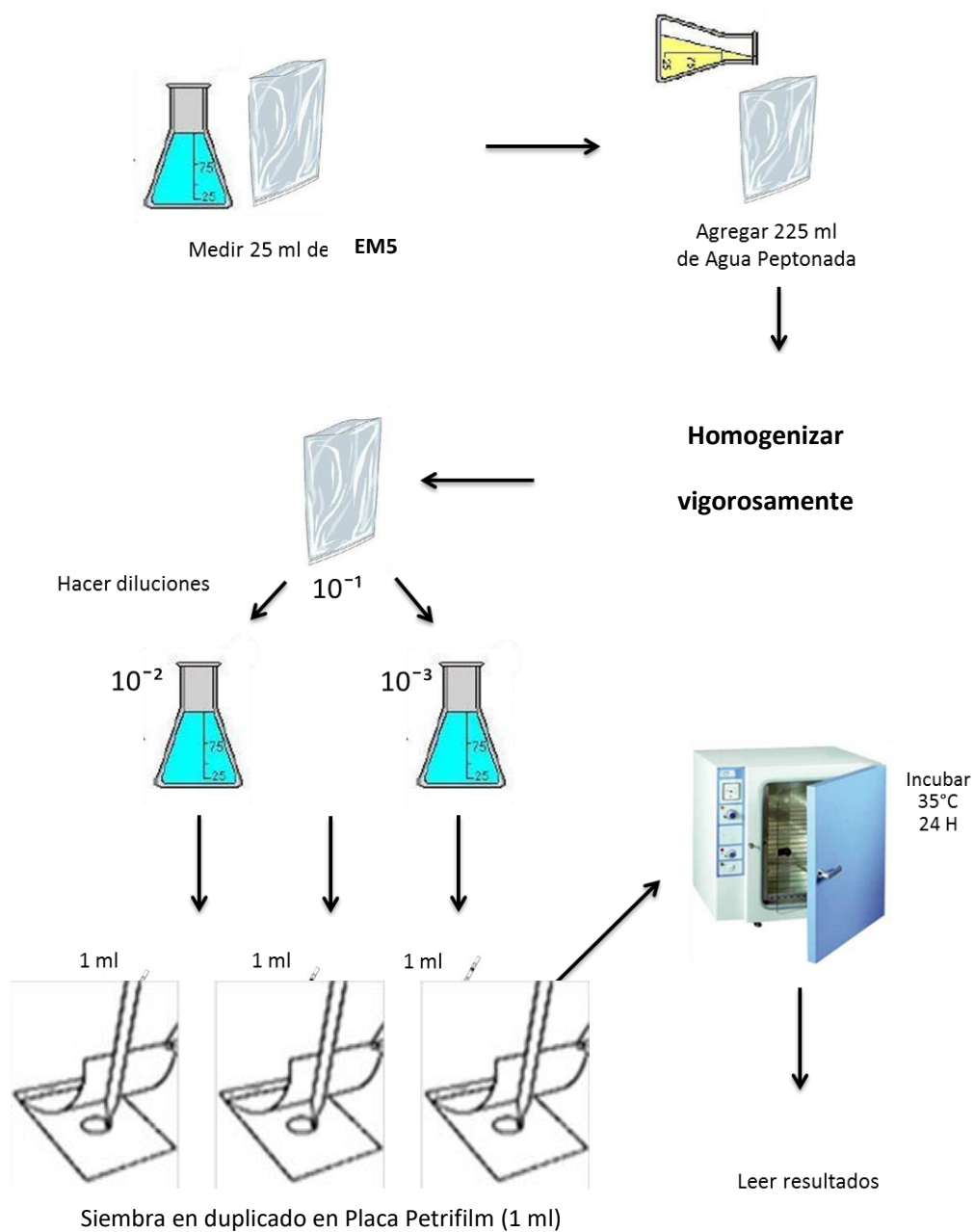


Figura 36. Marcha analítica para determinación de *Escherichia coli* en muestra de EM-5.

Anexo N° 13

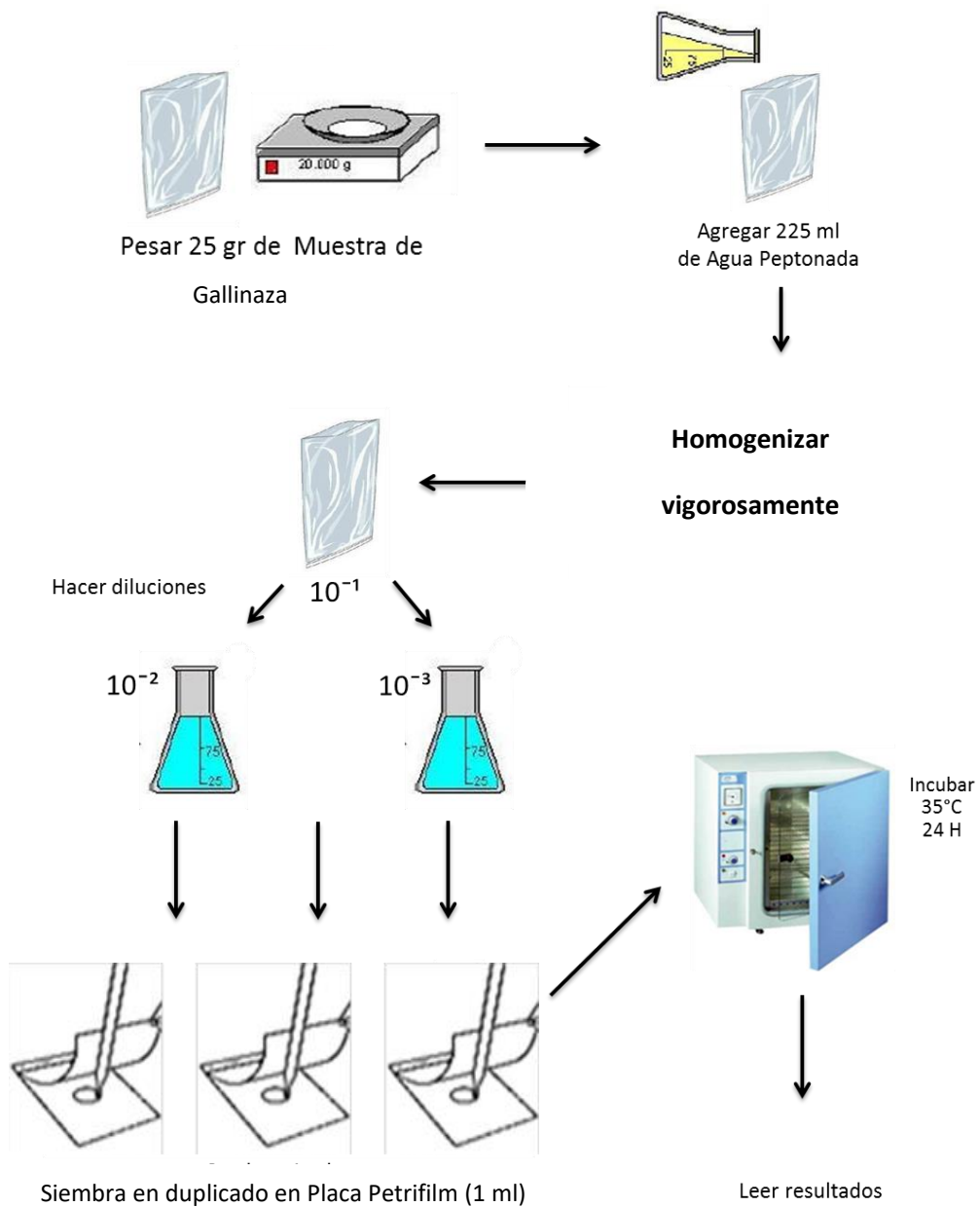


Figura 37. Marcha analítica para determinación de *Escherichia coli* en muestra de Gallinaza.

Anexo N° 14

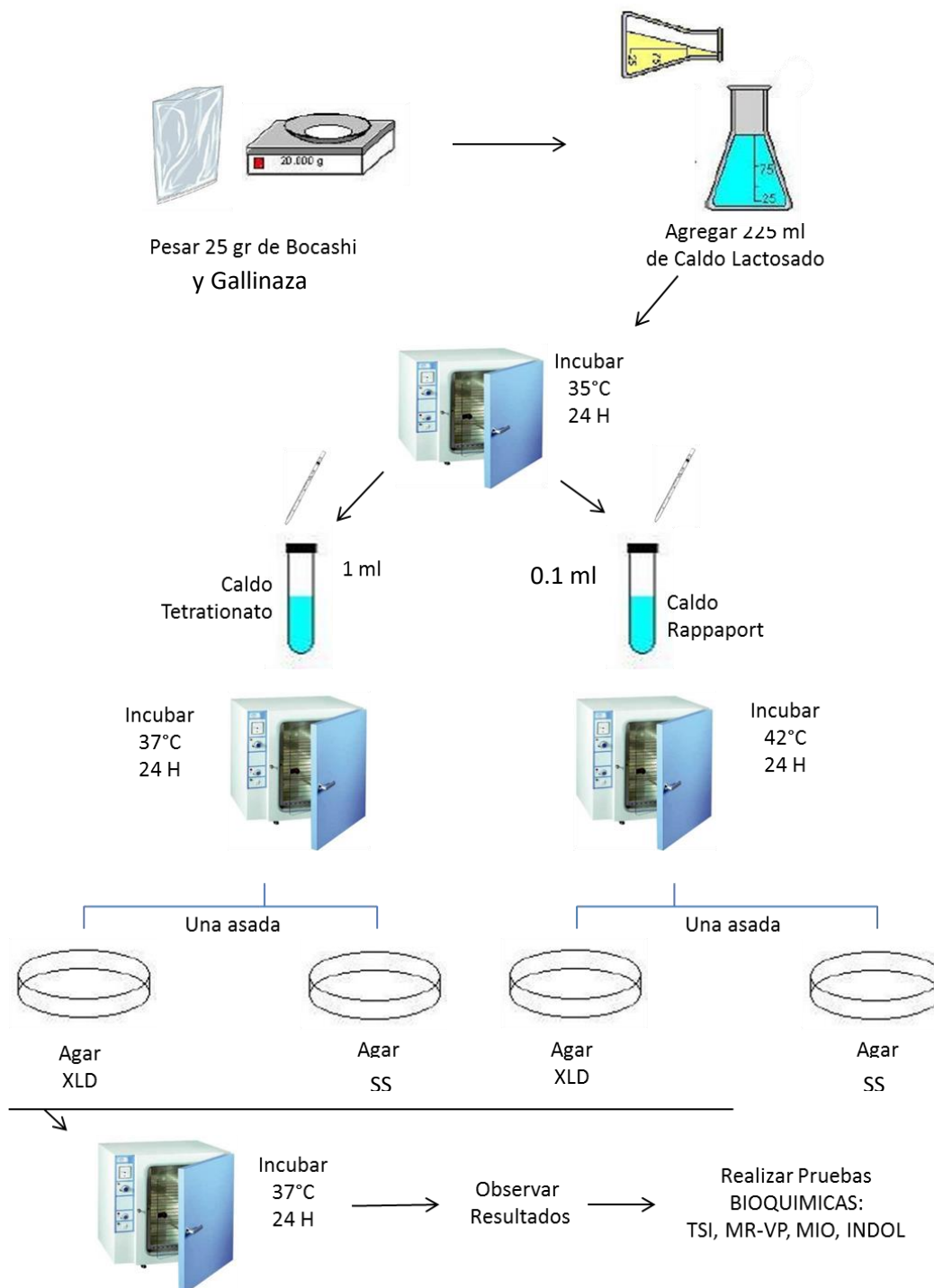


Figura 38. Marcha analítica para determinación de *Salmonella spp.* en muestra de Bocashi y Gallinaza

Anexo N° 15

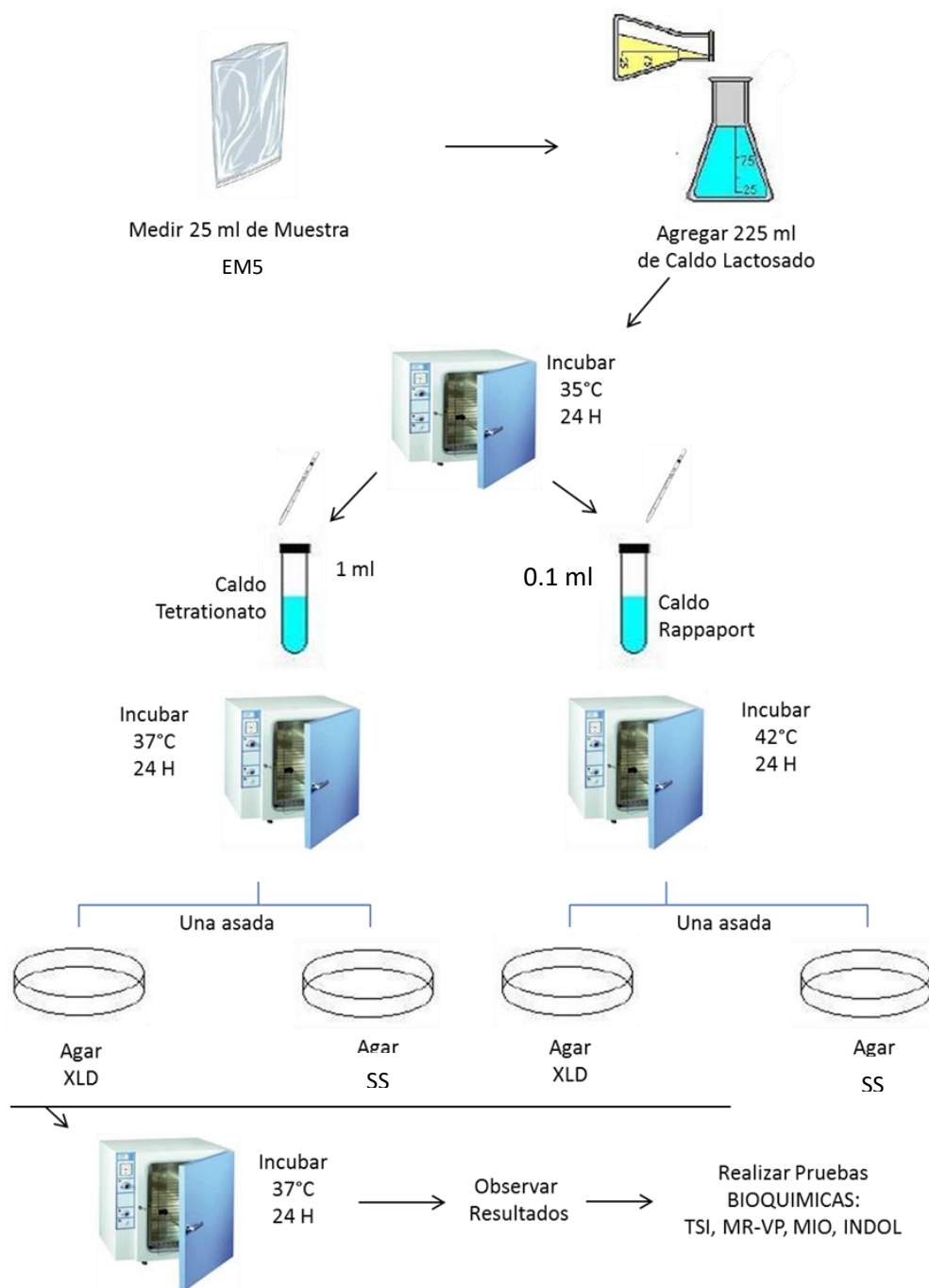


Figura 39. Marcha analítica para determinación de *Salmonella* spp. en muestra de EM-5.

Anexo N° 16



Figura 40. a) Pesaje de bocashi y b) vaciado de Caldo Lactosado para la identificación de *Salmonella spp.*

Anexo N° 17

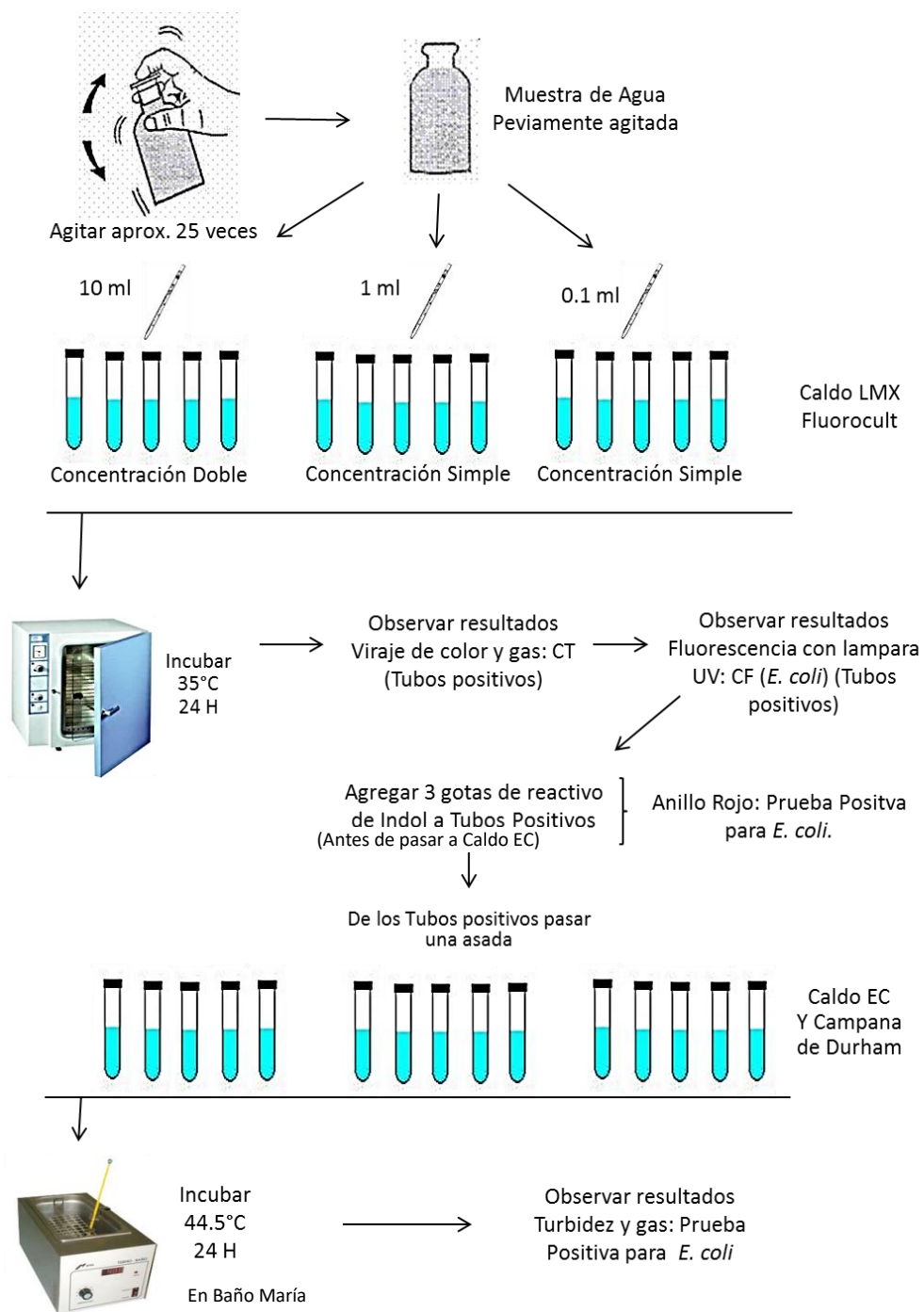


Figura 41. Marcha analítica para determinación de coliformes fecales en muestra de agua de riego.

Anexo N° 18

Tabla 4. Tabla del Número Más Probable (NMP) para 15 tubos.

Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza		Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza	
				Inferior	Superior					Inferior	Superior
0	0	0	< 1.8	-	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	0	1	1.8	0.090	6.8	4	1	0	17	6.0	40
0	1	0	1.8	0.090	6.9	4	1	1	21	6.8	42
0	1	1	3.6	0.70	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	0	3.7	0.70	10	4	1	3	31	10	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	1	26	9.8	70
1	0	0	2.0	0.10	10	4	2	2	32	10	70
1	0	1	4.0	0.70	10	4	2	3	38	14	100
1	0	2	6.0	1.8	15	4	3	0	27	9.9	70
1	1	0	4.0	0.71	12	4	3	1	33	10	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	2	39	14	100
1	1	2	8.1	3.4	22	4	4	0	34	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	1	40	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	0	8.3	3.4	22	4	5	0	41	14	100
1	3	1	10	3.5	22	4	5	1	48	15	120
1	4	0	10	3.5	22	5	0	0	23	6.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	1	31	10	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	2	43	14	100
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	3	58	22	150
2	1	0	6.8	1.8	17	5	1	0	33	10	100
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	1	46	14	120
2	1	2	12	4.1	26	5	1	2	63	22	150
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	3	84	34	220
2	2	1	12	4.1	26	5	2	0	49	15	150
2	2	2	14	5.9	36	5	2	1	70	22	170
2	3	0	12	4.1	26	5	2	2	94	34	230
2	3	1	14	5.9	36	5	2	3	120	36	250
2	4	0	15	5.9	36	5	2	4	150	58	400
3	0	0	7.8	2.1	22	5	3	0	79	22	220
3	0	1	11	3.5	23	5	3	1	110	34	250
3	0	2	13	5.6	35	5	3	2	140	52	400
3	1	0	11	3.5	26	5	3	3	170	70	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	4	210	70	400
3	1	2	17	6.0	36	5	4	0	130	36	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	1	170	58	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	2	2	20	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	0	17	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	5	430	150	1100
3	3	2	24	9.8	70	5	5	0	240	70	710
3	4	0	21	6.8	40	5	5	1	350	100	1100
3	4	1	24	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
3	5	0	25	9.8	70	5	5	3	920	220	2600
4	0	0	13	4.1	35	5	5	4	1600	400	4600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	5	> 1600	700	-
4	0	2	21	6.8	40						

Anexo N° 19

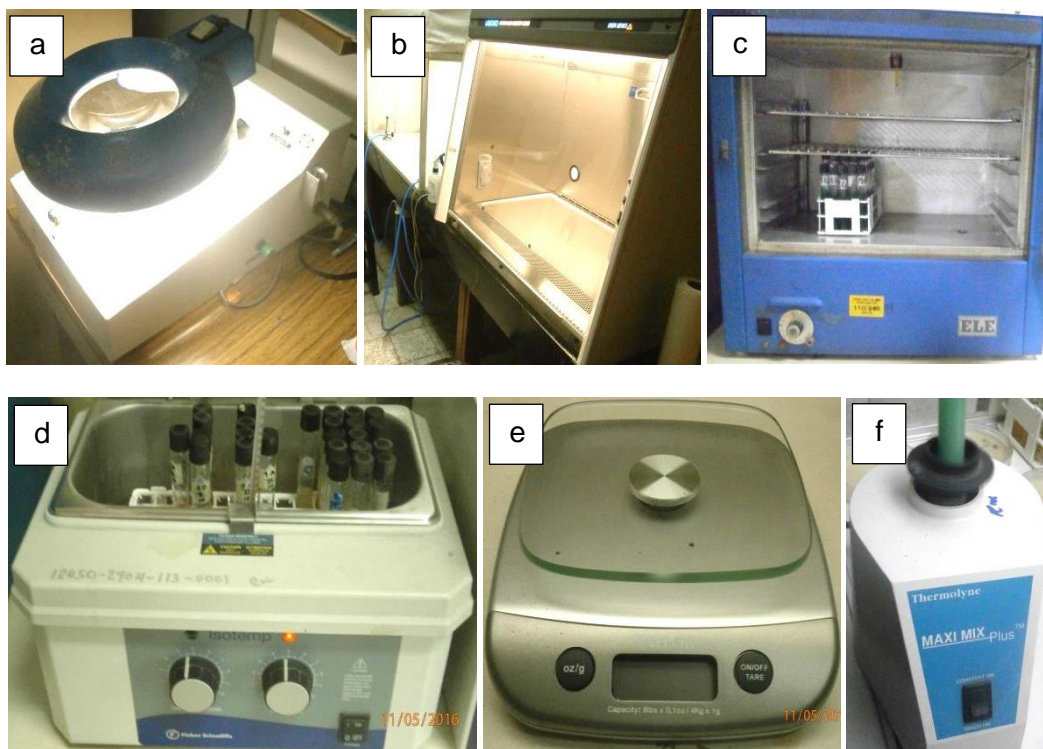


Figura 42. Equipo de laboratorio de apoyo: a) contador de colonias, b) cámara de flujo laminar, c) estufa, d) Baño María, e) balanza digital de mesa semianalítica y f) Bortex.

Anexo N° 20

Fundamentos de medios de cultivo

Para la determinación de los patógenos en las hortalizas, preparados bioorgánicos y agua utilizada para el riego, se utilizaron en los análisis microbiológicos diferentes medios de cultivo entre enriquecidos, selectivos y diferenciales para procurar el crecimiento de los mismos. Estos medios están diseñados químicamente para manifestar una respuesta cuando en ellos ha crecido el microorganismo de interés. La manera de operar (fundamento) de cada medio utilizado se presenta como sigue.

Placas Petrifilm

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes (Placa Petrifilm EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia). Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia ⁽²⁵⁾.

Caldo Lactosado

Es un medio rico en nutrientes y no contiene inhibidores del crecimiento bacteriano. Permite recuperar células injuriadas, diluye sustancias tóxicas o

inhibitorias y favorece el desarrollo de *Salmonella* con respecto a otras bacterias. El extracto de carne y la peptona son la fuente de carbono y nitrógeno mientras que la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. Por la fermentación de la lactosa se produce ácido y gas (el cual se evidencia al utilizar las campanas Durham) ⁽¹²⁾.

Caldo Rappaport

El bajo pH del medio de cultivo combinado con la presencia de verde malaquita y la alta concentración de cloruro de magnesio, que incrementa la presión osmótica, tiene carácter selectivo para las especies de *Salmonella* ⁽¹³⁾.

Caldo Tetrionato

El medio de cultivo peptona que provee los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, y carbonato de calcio que neutraliza y absorbe metabolitos tóxicos. La selectividad está dada por la presencia de sales biliares y tetrionato (compuesto generado en el medio de cultivo al reaccionar el tiosulfato de sodio con la solución iodo-iodurada) que inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos y algunas enterobacterias. *Salmonella spp.* contiene la enzima tetrionato reductasa y puede crecer satisfactoriamente en el medio de cultivo debido a que no la afecta la toxicidad tetrionato ⁽¹³⁾.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

XLD Agar es un medio selectivo y de diferenciación. Contiene extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas. Utiliza el desoxicolato de sodio como agente selectivo y, por consiguiente, inhibe los microorganismos Gram positivos. La xilosa se incorpora en el medio dado que la fermentan prácticamente todos los entéricos, excepto *Shigella*, y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella* de los organismos no patógenos, dado que, sin lisina, *Salmonella*

fermentaría rápidamente la xilosa y no se distinguiría de las especies no patógenas. Cuando la *Salmonella* agota el suministro de xilosa, la lisina es atacada por la enzima lisina descarboxilasa, lo que genera un cambio a un pH alcalino que imita la reacción de *Shigella*. Para evitar el cambio similar en los organismos coliformes positivos a la lisina, se añaden lactosa y sacarosa para producir ácido en exceso. Para aumentar la capacidad de diferenciación de la fórmula, se incluye un sistema indicador de H₂S, formado por tiosulfato sódico y citrato férrico amónico, para la visualización del ácido sulfhídrico producido, lo que origina la formación de colonias con centros de color negro. Los organismos no patógenos no productores de H₂S no descarboxilan la lisina; por tanto, la reacción ácida producida por dichos organismos evita el oscurecimiento de las colonias, lo que sucede sólo con pH alcalino o neutro (3).

Agar Salmonella-Shigella

El agar Salmonella-Shigella es una modificación del agar citrato desoxicolato. Se le considera un medio moderadamente selectivo según el nivel de inhibición de los microorganismos Gram positivos y *Enterobacteriaceae* diferentes de *Salmonella* y *Shigella*, que inhibe por contenido de sales biliares, verde brillante y citratos. La diferenciación de los organismos entéricos se logra mediante la incorporación de lactosa en el medio. Los organismos no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras. Este último grupo incluye la mayoría de los patógenos intestinales, incluidos *Salmonella*. El tiosulfato sódico y el citrato férrico permiten la detección de producción de ácido sulfhídrico, como lo demuestran las colonias con centros de color negro (4).

Prueba de Voges Proskauer (VP)

Determina la capacidad de algunos organismos de producir acetoína a partir de la fermentación metabólica de la glucosa que es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede

seguir muchas vías. La producción de acetoína es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias y es una vía alternativa. Las bacterias que utilizan esta vía producen solo pequeñas cantidades de ácidos mixtos que son insuficientes para disminuir el pH del medio de rojo de metilo, lo bastante como para producir un cambio de color. Por este motivo muchas de las especies de Enterobacterias son VP positivas, pocas con excepciones son negativas ⁽¹⁶⁾.

Interpretación.

- ✓ Positivo: Rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína).
- ✓ Negativo: Amarillo. Puede formarse un color cobrizo pero aun así la reacción es negativa ⁽¹⁶⁾.

Prueba de Rojo de metilo (RM)

Es una prueba cualitativa de la determinación de pH. Se basa en el empleo de un indicador de pH para determinar la concentración de iones hidrógeno presentes cuando un organismo fermenta glucosa. Las bacterias RM positivas producen ácidos estables manteniendo una alta concentración de iones hidrógeno hasta alcanzar cierta concentración y entonces cesa toda actividad. Los organismos RM negativo también producen ácidos pero tienen una menor concentración de iones hidrógeno porque hay una reversión hacia la neutralidad debida a la nueva degradación de los ácidos orgánicos en carbonatos ⁽¹⁶⁾.

Interpretación

- ✓ Positiva: Rojo en la superficie del medio (pH = 4.4)
- ✓ Negativo: Amarillo (pH = 6) ó naranja ⁽¹⁶⁾.

Prueba de Indol

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar: indol, escatol e indolacético. Diversas enzimas intracelulares que intervienen en éste proceso reciben el nombre de triptofanasas. Esta prueba se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído (sustancia activa del reactivo de Kovacs que se agrega al cultivo). La formación de indol se produce solamente en aquellos organismos capaces de fermentar los hidratos de carbono ⁽¹⁶⁾.

Interpretación

- ✓ Positivo: Anillo rojo en la superficie del medio.
- ✓ Negativa: No se produce color ⁽¹⁶⁾.

Prueba de Movilidad

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos, pueden contener uno solo o muchos; además su localización varía con su especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con movilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles ⁽¹⁶⁾.

Interpretación

- ✓ Positiva: Los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad.
- ✓ Negativa: Crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra ⁽¹⁶⁾.

Prueba de TSI

Determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible ácido sulfhídrico. Las bacterias pueden utilizar cualquiera de los sustratos incorporados en el medio y ser metabolizados, características que son utilizadas para la diferenciación de éstas, principalmente para las Enterobacterias. El medio TSI contiene lactosa y glucosa, lo que permite la observación de la fermentación expresada en un color amarillo (acidez) de uno o de ambos carbohidratos por parte de las bacterias. Si no hay fermentación (alcalino) permanecerá el color rojo (indicando que no hay variación del pH) demostrando que la bacteria no es miembro de la familia Enterobacteriaceae (16).

Interpretación

- ✓ Pico de flauta alcalino / profundidad alcalina (K/K): No fermentación de hidratos de carbono. Característico de bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (K/A): Glucosa fermentada, lactosa no fermentada. Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa.
- ✓ Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (negra) (K/A/H₂S): Glucosa fermentada, lactosa no fermentada; producción de H₂S. Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa y productoras de H₂S.
- ✓ Pico de flauta ácido / profundidad ácida (A/A): Glucosa y lactosa fermentadas. Característico de coliformes que fermentan lactosa como: *E. coli* y grupo *Klebsiella- Enterobacter* (16).

Caldo LMX Fluorocult

El Caldo LMX Fluorocult contiene tampón fosfato para garantizar una alta tasa de crecimiento de coliformes totales. Contiene lauril sulfato que en gran medida inhibe la flora Gram-positivas acompañante. La detección simultánea de coliformes totales y *E. coli* es posible debido al sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, que separa a los coliformes y el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido, que es altamente específico para *E. coli*. Un cambio de color del caldo de amarillo a azul-verde indica la presencia de coliformes. Bajo luz UV permite la detección rápida de *E. coli* mediante una fluorescencia azul de onda larga. El triptófano contenido en el caldo permite fácilmente la reacción del indol mediante la adición de reactivo de Kovacs, en la cual se observa una formación de un anillo rojo que confirma adicionalmente la presencia de *E. coli*. La síntesis de la enzima es amplificada por 1-isopropil- β -D-1-tio-galactopiranosido y aumenta la actividad β -D-galactosidasa ⁽¹⁶⁾.

Caldo EC

En el medio de cultivo la tripteína es la fuente de péptidos, aminoácidos y nitrógeno. La Lactosa es el hidrato de carbono fermentable y favorece el desarrollo de bacterias coliformes, las sales biliares inhiben el crecimiento de la flora acompañante gram positivas, las sales fosfato constituyen un sistema buffer que impide que los productos ácidos originados por la fermentación de la lactosa afecten el crecimiento microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico ⁽¹¹⁾.

Anexo 21

Manual:

Buenas Prácticas Agrícolas. Fertilizantes y Productos Bioorgánicos