



Identificación de microorganismos patógenos como indicadores higiénico – sanitario en el proceso de obtención de pulpa de jícara (*Crescentia alata*)

Identification of pathogenic microorganisms as hygienic-sanitary indicators in the process of obtaining gourd pulp (*Crescentia alata*)

Recibido: 22-1-2020

Aceptado: 25-2-2020

*Redinyer Alfonso RUIZ ARAUZ , Lesbia Lucia¹ SOMARRIBA HERNANDEZ

Contacto: hlesbia@cq.unanleon.edu.ni

*Ingeniería de alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.

Contacto: redinyer.ruiz@cq.unanleon.edu.ni / 505 88397360.

¹Tecnología de alimentos, Ingeniería de alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.

Resumen: La planta de jícara (*Crescentia alata*) es un árbol pequeño que puede alcanzar una altura entre los 6 y 13 metros. Produce frutos globosos que nacen directamente del tronco y de las ramas, los cuales tienen una corteza dura y en su interior contienen una pulpa de olor característico y sabor dulce, en medio de la cual se encuentran las semillas. (Ramírez et al., 2008). Los reportes científicos que avalen la calidad e inocuidad de este alimento son escasos.

En esta investigación se identificó la presencia de microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, mohos y levaduras), utilizando la técnica USP 36 – NF 31, la cual consiste en pre – enriquecimiento, enriquecimiento y medio selectivo para cada uno de los microorganismos, y así de esta manera valorar la inocuidad de la pulpa de jícara (*Crescentia alata*). El estudio se llevó a cabo en la Comunidad de Cayanlipe, Municipio de Somotillo, Departamento de Chinandega, Nicaragua; se realizaron muestreos (N=5) no probabilístico por conveniencia. Se tomó muestras (n=28) in situ (hisopado) del producto, de los sacos de almacenado, y todo lo que este en contacto con el alimento, se realizó por duplicado.

Los resultados obtenidos confirman que *Escherichia coli* (71.43%, n=28), *Pseudomonas aeruginosa* (50%, n=28), *Staphylococcus aureus* (57.14%, n=28), *Salmonella* spp (42.86%, n=28), mohos (60.71%, n=28) y levaduras (57.14%, n=28), se encuentran presente en la pulpa de jícara (*Crescentia alata*) procesada, producto del contacto directo o indirecto a material fecal, no realización de lavados previos al procesamiento (100%, n=28) o bien por que los sacos de almacenamiento o recipientes plásticos (50% - 17.86%, n=28) se encuentran en contacto directo con el suelo. Estos resultados confirman la falta de inocuidad que existe en el procesamiento para la obtención de pulpa de jícara (*Crescentia Alata*).

Palabras clave: *Crescentia Alata*, microorganismos patógenos, inocuidad.

Abstract: The jícara plant (*Crescentia alata*) is a small tree that can reach a height between 6 and 13 meters. It produces globular fruits that are born directly from the trunk and branches, which have a hard bark and inside contain a pulp with a characteristic odor and sweet taste, in the middle of which are the seeds. (Ramírez et al., 2008). Scientific reports that support the quality and safety of this food are scarce.

In this investigation, the presence of pathogenic microorganisms (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, molds and yeasts) was identified, using the USP 36 - NF 31 technique, which consists of pre-enrichment, enrichment and selective medium for each of the microorganisms, and thus in this way assess the safety of jícara pulp (*Crescentia alata*). The study was carried out in the Community of Cayanlipe, Municipality of Somotillo, Department of Chinandega, Nicaragua; Non-probabilistic sampling (N=5) was performed for convenience. Samples (n=28) were taken in situ (swab) of the product, from the storage bags, and everything that is in contact with the food, was carried out in duplicate.

The results obtained confirm that *Escherichia coli* (71.43%, n=28), *Pseudomonas aeruginosa* (50%, n=28), *Staphylococcus aureus* (57.14%, n=28), *Salmonella* spp (42.86%, n=28), molds (60.71%, n=28) and yeasts (57.14%, n=28), are present in processed jícara (*Crescentia alata*) pulp, product of direct or indirect contact with fecal material, not washing prior to processing (100%, n=28) or because the storage bags or plastic containers (50% - 17.86%, n=28) are in direct contact with the ground. These results confirm the lack of innocuousness that exists in the processing to obtain jícara pulp (*Crescentia Alata*).

Keywords: *Crescentia Alata*, pathogenic microorganisms, safety.





Introducción:

En Nicaragua el jícara crece de forma silvestre en la región del pacífico y central; de su fruto se pueden obtener una variedad de productos para el consumo de la población, tales como: bebidas nutricionales, bebidas alcohólicas, galletas, aceite de mesa, entre otros. (Ramírez et al., 2008)

La inocuidad de los alimentos es la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores; tiene un papel fundamental para garantizar alimentos seguros en cada etapa de la cadena alimentaria, desde la producción hasta la cosecha, el procesamiento, el almacenamiento, la distribución, hasta la preparación y el consumo (FAO, 2019). La importancia de la inocuidad en los procesos tecnológicos en la industria de alimentos, es de tal grado que envuelve a la salud pública, en donde se involucran diferentes entidades que analizan las enfermedades provocadas por alimentos, mejor conocidas como ETAs.

En 2013 el boletín latinoamericano y del caribe, de plantas medicinales y aromáticas comprobó a través de un estudio, las propiedades antimicrobianas de la semilla de jícara (*Crescentia alata*), en donde afirman que esta inhibe enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella spp* (León et al., 2013). El instituto superior de ciencias agropecuarias demostró por medio de una investigación que la comunidad de Cayanlipe, Somotillo, Chinandega es una de las localidades con más altos rendimientos en cuanto a la producción de pulpa de jícara (*Crescentia alata*) en Nicaragua (Pérez, 1986).

Los productores de semilla de jícara (*Crescentia alata*) en Nicaragua deben garantizar la inocuidad del alimento y que este no sea un peligro para la salud del consumidor. Como todo alimento, puede contaminarse por diferentes vías, y estar expuesto a un sin número de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos, etc.,) los cuales pueden o no ser patógenos.

En el presente trabajo se identificaron microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, mohos y levaduras) en pulpa de jícara (*Crescentia alata*) producida en la comunidad de Cayanlipe, municipio de Somotillo, departamento de Chinandega, Nicaragua, proporcionando información científica para valorar la inocuidad de dicho alimento.

Material y método:

La pulpa de jícara (*Crescentia alata*) utilizada para esta investigación, se obtuvo realizando (N) 5 muestreos no probabilísticos por conveniencia en la comunidad de Cayanlipe, municipio de Somotillo, departamento de Chinandega, Nicaragua (120 53' 250 N 860 54' 520 W). El enfoque de esta investigación es cualitativo en donde se determinó la presencia o ausencia de microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, mohos y levaduras) obteniendo un total de (n) 28 muestras (N1= 5, N2= 4, N3= 3, N4= 8, N5= 8).

El estudio realizado es de tipo descriptivo de cohorte longitudinal, en donde se han descrito los parámetros higiénico – sanitario del proceso de obtención de pulpa de jícara (*Crescentia alata*), para lo cual se identificaron los principales microorganismos patógenos presentes en dicho procesamiento. Se estableció un periodo que va de febrero a septiembre 2019 para la toma de muestra, tal periodo es la temporada alta de cosecha del fruto, siendo entre agosto y septiembre la mayor cosecha.

Una vez en la entrada a la comunidad de Cayanlipe, se recorrió la carretera principal en la búsqueda de fincas en las cuales se estaba extrayendo pulpa de jícara (*Crescentia alata*), cuando estas eran localizadas se procedía a informar al dueño sobre los objetivos de la investigación y se solicitaba su consentimiento para la toma de muestra.

Posteriormente se llenaba una ficha con los datos del dueño, de la finca y de la muestra, se realizaba la recolección de las muestras y estas eran trasladadas en un termo hermético hacia el laboratorio de Microbiología de alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas UNAN León en donde se identificaron los microorganismos en estudio.

Criterios de inclusión: Fincas en las que había proceso de extracción de pulpa de jícara o que tuvieran almacenada pulpa con uno o más días de fermentación, condiciones de almacenamiento, recipientes de contacto con el alimento.

Criterios de exclusión: Fincas en las que no había proceso de extracción de pulpa de jícara, o jícara sin procesar y zonas aledañas realizando la misma actividad.

Medios de cultivo: En la identificación de microorganismos patógenos en el proceso de obtención de pulpa de jícara, fueron necesarios los siguientes medios de cultivo para test de arrastre, presuntivos y confirmativos: Agua peptonada, Caldo triptica soya, Agar MacConkey, Agar Cetrimida, Agar Baird Parker, Caldo Selenito Cistina, Agar XLD y Agar Dextrosa Sabouraud.





Método para aislamiento de microorganismos patógenos:

The United State Pharmacopeia – National Formulary (USP 36 – NF31) Pre - enriquecimiento para identificación de microorganismos patógenos: Se humedeció un hisopo de inoculación previamente esterilizado en un tubo de ensayo con agua peptonada, posteriormente se tomó muestra, por hisopado, del punto crítico de análisis. Se disolvió en un Erlenmeyer con 50 ml de Caldo Triptica Soya y se incubó a 36 -37 oC durante 18 – 24 horas.

Procedimiento para identificación

Con un asa de inoculación se tomó muestra del Erlenmeyer con 50 ml de Caldo Triptica Soya más muestra y se hizo un rayado en cada placa petri con: Agar MacConkey (para identificación de *Escherichia coli*), Agar Cetrimida (para identificación de *Pseudomonas aeruginosa*), Agar Baird Parker (para identificación de *Staphylococcus aureus*) y se incubó nuevamente a 36 - 37 oC durante 18 – 24 horas. Las placas petri con Agar Dextrosa Sabourad (para identificación de Mohos y levaduras) se incubaron a 36 - 37 oC durante 6 días.

Por otro lado con una pipeta se tomó muestra del Erlenmeyer con 50 ml de Caldo Triptica Soya más muestra y se transfirieron 10 ml en un Erlenmeyer con 90 ml de Caldo Selenito Cistina (enriquecimiento), se incubó a 36 -37 oC durante 18 – 24 horas. Posteriormente con un asa de inoculación se tomó muestra y se hizo un rayado en placa petri con Agar XLD (test confirmativo), se incubó nuevamente a 36 -37 oC durante 18 – 24 horas, y posteriormente se cualificó.

Control positivo - negativo: Para validación de los muestreos se llevaron a cabo controles positivos y negativos en cada fase de la aplicación del método, esto con el fin de descartar cualquier error durante la obtención de resultados.

Análisis estadístico: La información obtenida fue procesada a través del programa estadístico SPSS versión 22.0.

Resultados y discusión:

El estudio microbiológico en pulpa de jícara (*Crescentia Alata*) realizado en la comunidad de Cayanlipe, Somotillo, Chinandega – Nicaragua, se desarrolló entre los meses de febrero y septiembre del 2019, tiempo durante el cual se realizaron 5 muestreos no probabilísticos por conveniencia como se describe en la tabla No 1.

Tabla No 1

Número de muestreo y número de muestras

Muestreo (N)	Nº de muestras
1	5
2	4
3	3
4	8
5	8
Total de muestras	28

Como se muestra en la Tabla No 1, se obtuvieron 28 muestras producto de 28 fincas de la comunidad de Cayanlipe. Estas fueron obtenidas por medio de hisopados, y trasladadas en un termo hermético a laboratorio de Microbiología de alimentos, UNAN – León. En todos los muestreos se identificó *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, mohos y levaduras.

Los reportes científicos que avalen la inocuidad de la pulpa de jícara (*Crescentia alata*) son escasos, sin embargo se ha estudiado la microbiota patogénica del cacao (*Theobroma cacao*), en donde se tipificaron diferentes hongos patógenos (Maridueña et al., 2010), los hongos presentes en la semilla de jícara (mohos 60.71 % - levaduras 57.14%) únicamente fueron aislados, por lo cual es imposible nombrar con exactitud a que microorganismo se enfrentó la investigación. Sin embargo, como se observa en la tabla No 2, se puede afirmar que en el proceso de obtención de pulpa de jícara (*Crescentia alata*) hay presencia de hongos.

Escherichia coli en el proceso de obtención de pulpa de jícara en el análisis microbiológico realizado entre los meses de febrero – septiembre 2019, estuvo presente en el 71.43% de las muestras, como se muestra en la Tabla No 2. Esto es un indicador de la falta de higiene por parte de los manipuladores, ya que *E. coli* es un indicio de que el alimento entro en contacto directo o indirecto con heces fecales de diferente origen al igual que *Salmonella spp* (Torrez & Castillo, 1999), la cual estuvo presente en el 42.86 % de las muestras.

Tabla No 2

Presencia de microorganismos patógenos en muestras de pulpa de jícara (*Crescentia alata*)

Microorganismos	n	Porcentaje valido (Presencia)
Escherichia coli	28	71.43 %
Pseudomonas aeruginosa	28	50 %
Staphylococcus aureus	28	57.14 %
Salmonella spp	28	42.86 %
Mohos	28	60.71 %
Levaduras	28	57.14 %

El estudio de *Pseudomona aeruginosa* en pulpa de jícara (*Crescentia alata*) es nulo, por lo general este análisis microbiológico se realiza en agua (Montero, 2012), sin embargo esta bacteria estuvo presente en el 50% de las muestras de pulpa de jícara (*Crescentia alata*).

Este microorganismo es producto del contacto directo o indirecto entre el alimento y aguas contaminadas o bien zonas dérmicas, rectales o vaginales; es completamente un indicador de inocuidad alimentaria y su patogenicidad es bastante alta (Bush, 2015).

En el caso de *Staphylococcus aureus* se obtuvo que el 57.14% de las muestras tienen presencia de este microorganismo.

Tales datos indican que un poco más de la mitad de las muestras analizadas entraron en contacto directo o indirecto con mucosa nasal para lo cual el ser humano y los animales son los principales reservorios (Frank et al., 2010).

Tabla No 3

Fuentes de contaminación de la pulpa de jícara (*Crescentia alata*)

	n	Porcentaje valido
Almacenamiento de la pulpa de jícara	28	*50 %
Ubicación de los recipientes de almacenamiento	28	**100%
Lavado y desinfección previo al procesamiento	28	***100%

*Valores: 50% sacos de almacenamiento

**Valores: 100 % Ubica los recipientes de almacenamiento en el suelo

***Valores: 100 % no realiza lavado previo

En la tabla No 3 se observan los factores que se tomaron en cuenta como posible causa de contaminación fueron: el almacenamiento de la pulpa, en donde se observó que el 50% de los productores almacenaba la pulpa en sacos, otro factor importante es la ubicación de los recipientes de almacenamiento para lo cual el 100% ubica los recipientes (incluyendo sacos) en el suelo y en cuanto a la limpieza y desinfección previo al procesamiento el 100 % no realiza ningún lavado previo a los equipos que entran en contacto directo con la pulpa, como por ejemplo la machacadora, cajas de fermentación etc.

Para la identificación de la presencia de microorganismos patógenos se analizó la morfología colonial y la morfología microscópica de dichos microorganismos según los parámetros reflejados en la tabla No 4.

Cada uno comprende características coloniales diferentes, sin embargo las características microscópicas se agrupan, en el caso las bacterias, en Gram positivas (bacilos) y Gram negativas (cocos), (USP 36 – NF 31). En el caso de los hongos (mohos y levaduras), se evaluaron las características morfológicas en lupa, no se realizó observación microscópica ya que no era significativo, sin embargo en la tabla No 4 se describen dichas características microscópicas.

Tabla No 4

Morfología colonial y morfología microscópica de los microorganismos patógenos en estudio

Microorganismos patógenos	Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica	Fuente
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey	Colonias pequeñas azul – negro, con brillo metálico de color verde	Bacilo Gram negativos	USP 36 – NF 31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Cetrimida	Colonias verdes azulosas, con luz ultravioleta se observan de color verdoso	Bacilos Gram negativos	USP 36 – NF 31
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Baird Parker	Colonias negras lustrosas rodeadas de zonas claras	Cocos Gram positivos agrupados en racimos	USP 36 – NF 31
<i>Salmonella spp</i>	Agar XLD	Colonias que no modifican el medio, rojas con o sin centro negro	Bacilos Gram negativos	USP 36 – NF 31
Mohos	Agar Dextrosa Sabouraud	Colonias circulares, irregulares o filamentosa, plana y extendida, elevada y limitada, umbilicada, plegadas, con surcos radiados, granulosa, pulverulenta, vellosa, aterciopelada, algodonosa.	Forma, tamaño, agrupamiento y color. Hifas.	Micología, 2017
Levaduras	Agar Dextrosa Sabouraud	Colonias de color blanco crema lisa o de aspecto seco	Observación de elementos en gemación	Micología, 2017

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación son un aporte a la ciencia, en especial a la seguridad alimentaria, la inocuidad de la semilla de jícara (*Crescentia alata*) es deficiente, puesto que se identificaron microorganismos de alta patogenicidad presentes en el alimento.

Por otro lado las condiciones de los productores no contribuyen a la higiene que debe tener todo proceso que involucre un alimento, y siendo parte de la sostenibilidad económica de ese sector de Nicaragua se debe prestar más atención a lo que realmente se está produciendo y no poner en riesgo la salud de los consumidores.



Referencias

Bush Larry. Manual MSD. Florida Atlantic University. 2015. Infecciones por Pseudomonas. USA

Daniel N. Frank, Leah M. Feazel, Mary T. Bessesen, Connie S. Price, Edward N. Janoff, Norman R. Pace. PLOS ONE. Mayo, 2010. The Human Nasal Microbiota and Staphylococcus aureus Carriage. USA

FAO, 2019. Inocuidad alimentaria. Recuperado de: <http://www.fao.org/food-safety/es/>

León Juan Fernando; Camacho Sylvia Páz; Lopez Miguel A.; Uribelbeltran Magdalena de Jesús; Willms Kaethe; Angulo Gabriela; Montes Julio; Delgado Francisco. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 12, núm. 4, julio, 2013, pp. 356-364. Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth)

Maridueña Zavala María Gabriela, Jiménez Feijoo María Isabel, Peralta García Esther Lilia. Centro de investigaciones biotecnológicas de Ecuador. 2010. Actualización de la Micobiota Patogénica del Cacao "arriba" (*Theobroma cacao*) presente en la Costa Ecuatoriana. Ecuador. Micología. Micología ambiental 2017. Recuperado de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2016/08/TP-8-Micolog%C3%ADa.pdf>

Montero Maria Milagro. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de medicina. 2012. Pseudomonas aeruginosa multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapeutos. Barcelona, España

P. Medel, E. Taboada, B. Beade, L. Delgado, G. Fernández-Martínez, M. Mermida. Imasde agroalimentaria. Evolución de la contaminación por micotoxinas y Salmonella spp. en materias primas para piensos controlados por el programa gmp. Galis desde 2007 a 2010. Galicia, España.

Peréz Castellon Emilio Enrique. Instituto superior de Ciencias Agropecuarias. 1986. Analisis de la producción de semilla y componentes del rendimiento de jicaro (*Crescentia alata*) en zonas de Nicaragua. Managua Nicaragua.

Ramírez Miguel, Bron Willen, Hernández Eveling, Heyden Damien. Servicio Holandés de Cooperación al desarrollo. Julio, 2008. Cultivos para la producción sostenible de biocombustible. Módulo III, Jícaro. Tegucigalpa, Honduras.

Torrez Vitela Maria Refugio, Castillo Alejandro. Universidad de Guadalajara, México. 1999. Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Guadalajara, México.

