

Efecto antimicrobiano del vinagre blanco y del limón criollo sobre *Staphylococcus aureus* en ensaladas de restaurantes del programa de alimentación escolar (PAE) de San Jose de Cúcuta

Antimicrobial effect of white vinegar and lemon over staphylococcus aureus creole salad restaurants in the school feeding program (EAP) San Jose Cúcuta

Martínez M. Karen P.*, Lamk O. Lizeth S., Alvarez G. Andrea C.

*Universidad de Santander, UDES, Sede Cúcuta, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.
Avenida 4 Esquina Calle 10N Urbanización El Bosque*

Recibido 20 de Mayo 2014; aceptado 28 de Junio de 2014

RESUMEN

*Se evaluó el efecto antimicrobiano del vinagre blanco y del limón criollo para el control de *Staphylococcus aureus* en ensaladas frescas preparadas en los restaurantes del Programa de Alimentación Escolar (PAE) de San José de Cúcuta. Se realizó la identificación de una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de ensaladas frescas preparadas en los restaurantes del programa de alimentación escolar (PAE), aplicando la NTC 4779 (Método horizontal para el recuento de *Staphylococcus coagulasa positiva*), luego de esto se realizó la valoración del vinagre blanco y el limón criollo frente al microorganismo en estudio a diferentes concentraciones (25ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm, 200ppm y 500ppm) mediante la técnica ecométrica y la concentración mínima inhibitoria. Por otro lado, se determinó cual aditivo mostraba mayor efecto aplicando la técnica de antibiograma por difusión. Los resultados obtenidos en la prueba de concentración mínima inhibitoria muestran que tanto el vinagre blanco como el limón criollo, redujeron la concentración de *S. aureus* sin dilución, y que el aditivo que presentó mayor inhibición sobre este microorganismo fue el limón criollo, el cual en el antibiograma de difusión, mostró un halo de 30 mm. Como resultado se encontró que el limón disminuye la carga microbiana en especial de *Staphylococcus aureus* y además permite mantener las propiedades organolépticas de las verduras.*

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: karitomartinez.1@gmail.com

Palabras clave: *aditivo antimicrobiano, inocuidad alimentaria, limón criollo, *Staphylococcus aureus*, vinagre blanco.*

ABSTRACT

The antimicrobial effect of white vinegar and criole lemon to control Staphylococcus aureus in fresh salads prepared in San José de Cúcuta School Food Program (PAE) restaurants was evaluated. The identification of Staphylococcus aureus isolated strain of fresh prepared salads in the school feeding program (PAE) restaurants, applying NTC 4779 (Horizontal method for the enumeration of positive coagulase Staphylococcus) was done, after this, the white vinegar and criole lemon assessment conducted to the organism being studied at different concentrations (25ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm, 200ppm and 500ppm) by Ecometrica technique and the minimum inhibitory concentration was done too. Furthermore, it was determined the additive with greater effect by applying the diffusion antibiogram technique. The results obtained in the minimum inhibitory concentration test show that both white vinegar as the criole lemon, reduced the concentration of S. aureus without dilution, and that the additive with greater inhibition of this microorganism was the criole lemon, which in diffusion susceptibility testing showed a halo of 30 mm. As a result, it was found that the lemon decreases the microbial charge especially in Staphylococcus aureus and also it allows maintaining the organoleptic properties of the vegetables.

Keywords: *Antimicrobial additive, Food Safet, lemon Creole, Staphylococcus aureus, white vinegar*

INTRODUCCIÓN

La industria de alimentos ha experimentado cambios notables en las últimas décadas, esto debido a las crecientes exigencias de los consumidores en cuanto a calidad en los productos ofertados, así como la necesidad de ser cada vez más competitivos en un mercado globalizado por lo que se requiere la implementación de sistemas de gestión que garanticen la inocuidad y calidad de los productos mediante certificaciones internacionales. (López *et al.*, 2012). La inocuidad de un alimento es la garantía de que no causará daño al consumidor, cuando sea preparado o ingerido y de acuerdo con el uso a que se destine. La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que junto con las nutricionales, organolépticas y comerciales componen la calidad de los alimentos. Los alimentos son la fuente principal de exposición a agentes patógenos, tanto químicos como biológicos (virus, parásitos y bacterias), a los cuales nadie es inmune, ni en países en desarrollo ni desarrollados. Cuando los alimentos se contaminan en niveles

inadmisibles de agentes patógenos y contaminantes químicos, o con otras características peligrosas, conllevan riesgos sustanciales para la salud de los consumidores, y representan grandes cargas económicas para las diversas comunidades y naciones (Instituto de Salud Pública de Chile). Suministrar comidas seguras desde el punto de vista higiénico-sanitario es una responsabilidad del elaborador. No obstante, las autoridades sanitarias requieren verificar y validar regularmente su preparación y conservación, a través de inspecciones y análisis, con el fin de medir la efectividad de los controles implementados, tanto en el lugar donde se preparan, como en los puntos de venta y/o distribución. Todo esto se hace con el fin de evitar enfermedades que se transmiten por alimentos (ETA), pues representan uno de los problemas más extendidos en la actualidad. Estas enfermedades es posible evitarlas, si los operarios encargados de manipular los alimentos aplican las buenas prácticas de manipulación y si en los

locales donde se preparan se ejerce una supervisión organizada (Iriarte M. 2011). Por Intoxicaciones alimentarias, se entiende que son las ETA producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas, animales o producidas por microorganismos o sustancias químicas o radioactivas que se incorporan a ellos de manera accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo (Instituto Nacional de Salud, 2014). Dentro de los agentes causantes de intoxicación alimentaria, se encuentra la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Algunos alimentos como las ensaladas frescas preparadas, son más propensos a la contaminación, debido a que no son sometidas a un proceso de conservación o mantenimiento específico; por lo tanto se ve la necesidad de implementar técnicas distintas a las buenas prácticas de manufactura, tales como el uso de aditivos alimentarios antimicrobianos que aseguren no solo la inocuidad, sino impidan el crecimiento de microorganismos contaminantes. *Staphylococcus aureus*, es una bacteria que presenta morfología de coco gram positivo, que por lo regular se presenta en grupos semejantes a racimos y no son móviles, capsulares ni esporuladores (Velandia 2010). Se considera que el envenenamiento estafilocócico alimentario, también llamado gastroenteritis estafilocócica, causado por toxinas de *Staphylococcus aureus*, es una de las enfermedades de origen alimentario más frecuentes en todo el mundo. Informes del CDC, indican que han disminuido los brotes por esta bacteria, resultado del mejor uso de temperaturas de refrigeración, y mejores prácticas sanitarias; aun así, el número de brotes y casos por gastroenteritis

estafilocócica es mucho más alto que los brotes de muchas otras enfermedades microbianas transmitidas por alimentos. Entre los alimentos implicados se encuentran ensaladas de papas y huevos, pastelería, jamón, pollo, cremas heladas.

La contaminación de los alimentos por *S. aureus* puede ocurrir directamente desde los animales de consumo, los cuales pueden estar infectados, o puede resultar de la manipulación o manejo inadecuado de alimentos durante su procesado, almacenamiento o comercialización, ya que los seres humanos pueden ser portadores de este microorganismo. La mayoría de las personas que se ven afectadas por este tipo de intoxicación resuelven el cuadro satisfactoriamente y las muertes por el mismo son sumamente esporádicas, sin embargo la intoxicación estafilocócica, sí produce una considerable carga económica y social (Normando *et al*; 2007). Las infecciones ocasionadas por cepas de *S. aureus* son un problema de salud importante en todo el mundo. Las cepas de *S. aureus* producen una gran variedad de infecciones incluyendo osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica y septicemia (Jensen y cols, 1999).

Teniendo en cuenta que esta bacteria fácilmente se puede hallar en alimentos como ensaladas frescas, en el presente estudio se propuso evaluar el efecto antimicrobiano del vinagre blanco y del limón criollo, para el control de *Staphylococcus aureus* en ensaladas frescas preparadas en los restaurantes del programa de alimentación escolar (PAE) de San José de Cúcuta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras:

Se obtuvieron las muestras de alimentos preparados; específicamente las ensaladas frescas de los 10 restaurantes que hacen parte del plan de alimentación escolar. Las muestras se recolectaron con ayuda de los manipuladores de alimentos que laboran en los distintos restaurantes, aplicando las

normas de bioseguridad adecuadas. De la misma manera, estas se recolectaron en bolsas plásticas marca ziploc; debidamente codificadas las cuales se transportaron en condiciones de refrigeración al Laboratorio de la Universidad de Santander para realizar los análisis microbiológicos.

Recuento de *Staphylococcus aureus*

Se realizó una siembra en superficie en un medio de cultivo sólido, como el agar Baird Parker preparando una cantidad determinada de la muestra problema. Luego se incubó a 37° C durante 24 horas. Al día siguiente se calculó el número de *Staphylococcus aureus* a partir del número de colonias características obtenidas en las placas escogidas a los niveles de dilución que dan un resultado significativo.

Pruebas confirmatorias para *Staphylococcus aureus*

Al realizar el recuento de *Staphylococcus aureus* en cada una de las siembras realizadas de las muestras obtenidas, tanto de ensaladas como de manipuladores, se realizaron dos pruebas básicas para confirmar que las cepas resultantes corresponden a este microorganismo y no a otro que podría crecer también en este medio de cultivo. Estas pruebas corresponden a: coagulasa la cual debe dar como resultado positiva y la tinción de Gram.

Pruebas de concentraciones

Técnica ecométrica: En la realización de esta técnica se prepararon concentraciones de limón, vinagre y mezcla de ambos a 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm. Seguidamente se agregaron 10 ml de cada solución en tubos de ensayo. A continuación se le agregó a 1 ml de la cepa de *Staphylococcus aureus* y al minuto, a los 5 minutos

y a los 10 minutos se tomaba una asada y se hacía la siembra en el campo receptivo del agar, incubando por 24 horas a 37°C.

Método de dilución: Para llevar a cabo este proceso se realizaron pruebas que incluían concentraciones desde 25 a 500 ppm de vinagre, limón y la respectiva mezcla de estos aditivos; posterior a esto se agregó la cantidad de 9 ml de estas concentraciones preparadas a los tubos de ensayo; luego se agrega 1ml de la cepa de *Staphylococcus aureus*. Se dejó incubando por 24 horas, luego se realizó la siembra por superficie en agar Baird Parker tomando de cada tubo 0.1 ml. Nuevamente las cajas fueron a incubación por 24 horas y la lectura se llevó a cabo.

Método de difusión: En primer lugar se preparó un suspensión de la cepa de *Staphylococcus aureus* tomando asadas y diluyéndolas en tubos de caldo nutritivo hasta crear una turbidez semejante a la del T°1 del patrón de MacFarland de la cepa de *Staphylococcus aureus*. Después se impregnó un hisopo estéril y se sembró en agar nutritivo en toda la superficie. Seguidamente se prepararon diluciones con una concentración de 200ppm, 500 ppm de vinagre y limón y se dejó una adicional sin diluir. Se impregnaron discos de 4mm de papel filtro con las diluciones y soluciones depositándose respectivamente en el agar. Posteriormente se incubó por 24 horas y al final la medición del diámetro de los discos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se halló la presencia de *S. aureus*, como se observa en la tabla 1, donde el 70% de las muestras analizadas resultaron como positivas para este microorganismo, evidenciándose así las inadecuadas prácticas higiénicas, además de la falta de capacitación en el manejo adecuado de los alimentos y de las frutas como materias primas de las ensaladas, de los deficientes y ausentes procesos de limpieza y desinfección.

Tabla 1
Resultados del aislamiento de *Staphylococcus aureus*

Restaurantes Del PAE	Toma de muestra N°1 (ufc/g)	Toma de muestra N°2 (ufc/g)	Toma de muestra N°3 (ufc/g)
Restaurante 01	20	10	15
Restaurante 02	0	0	0
Restaurante 03	500	400	320
Restaurante 04	430	500	420
Restaurante 05	700	730	600
Restaurante 06	0	0	0
Restaurante 07	15	10	20
Restaurante 08	0	0	0
Restaurante 09	50	200	150
Restaurante 10	120	200	160

En la toma sucesiva realizada se confirmó no solo la presencia de este microorganismo sino que se evidenció que en lugares como el restaurante 4 y el restaurante 5 aumentan las cifras secuencialmente.

Tabla 2

Pruebas de concentración para el empleo de los aditivos antimicrobianos sobre el *Staphylococcus aureus*

Concentración	Vinagre blanco	Limón criollo	Mezcla
Sin dilución	-	-	-
25 ppm	+	+	+
50 ppm	+	+	+
75 ppm	+	+	+
100 ppm	+	+	+
200 ppm	+	+	+
500 ppm	+	+	+

(+) Hubo crecimiento microbiano. (-) No hubo un crecimiento microbiano).

Al realizar las pruebas con las concentraciones establecidas del limón, el vinagre y la mezcla de estos aditivos, como se observa en la tabla 2, se obtuvo como resultado: los dos aditivos alimentarios son efectivos al lograr inhibir completamente el crecimiento del *Staphylococcus aureus*. Es importante aclarar que este resultado se evidenció sin realizar ninguna dilución previa; es decir; en el momento de someter estos aditivos a diluciones, independientemente de la concentración empleada al ponerlos en contacto con el microorganismo estos no surtían el efecto deseado que era la finalidad de esta prueba, solo se lograba disminuir la presencia de ciertas colonias bacterianas más no inhibir el crecimiento completamente de este microorganismo.

Prueba antibiograma por difusión

En los resultados obtenidos en la prueba final de antibiograma por difusión (tabla 3); se evidencia el efecto antimicrobiano de inhibición del crecimiento del microorganismo que se esperaba al emplear los aditivos como un método de conservación provocando esta inhibición del *S. aureus* pero independientemente de la temperatura y el tiempo de exposición; ya que en el caso del trabajo alterno realizado en Perú con la mayonesa la temperatura

de refrigeración fue un factor determinante debido quizás al proceso de fabricación de este alimento casero, y los procedimientos que se debían tener en cuenta para garantizar la inocuidad del mismo, se logra observar el halo de inhibición.

Tabla 3

Prueba antibiograma por difusión

Concentración	Halo de inhibición		
	Vinagre blanco	Limón criollo	Mezcla
Sin dilución	10 mm	30 mm	18 mm
250 ppm	0 mm	0 mm	0 mm
500 ppm	0 mm	0 mm	0 mm

Cuando se suprime al ácido cítrico (Calderón, 2008), la presencia de colonias de *S. aureus* tiende a ser mayor; y su crecimiento se observa de manera exponencial a temperatura ambiente, resultado que de igual forma ocurre en el caso de añadir otro tipo de aditivos como el vinagre; pese a disminuir el crecimiento del *Staphylococcus aureus* no lo hace con la misma efectividad; por tanto se pensó implementar una posible combinación de aditivos pues sus excelentes características nutritivas primero no lograrían afectar las propiedades organolépticas de una ensalada; además influye en la inhibición del *S.aureus* ya que también hay disminución del crecimiento de colonias pero quizás la razón por la cual no se logra eliminar totalmente el crecimiento pueda ser que por la mezcla realizada se suprime el efecto del limón criollo puro. Independientemente de la implementación de variables como temperatura o tiempo de conservación se comprobó que el ácido cítrico en su caso (Calderón 2008) y de la presente investigación el limón criollo tiene mayor efecto que el vinagre (ácido acético) en la sobrevivencia de *S. aureus*; y que el desarrollo de esta bacteria aumenta un poco por el efecto combinado del limón con el vinagre (ácido acético).

CONCLUSIONES

Aditivos antimicrobianos como el vinagre blanco y el limón criollo que entre sus bondades está el ser económicos, de fácil acceso y utilidad, no presentan ningún efecto tóxico para la salud, mantienen las cualidades y características de los alimentos que exigen los consumidores, y hacer que los alimentos continúen siendo seguros, nutritivos y apetecibles libres de cualquier tipo de contaminación, específicamente por bacterias, se convierten en la mejor alternativa de conservación de las ensaladas frescas preparadas, frente a la falta de una técnica específica de conservación y almacenamiento de las mismas; ayudando con una concentración específica aplicada por parte de sus manipuladores en el momento de la preparación conservando la inocuidad de este alimento evitando así pérdidas

económicas por la proliferación de *Staphylococcus aureus*. La realización de pruebas de concentración en el laboratorio con ensaladas contaminadas con *Staphylococcus aureus* utilizando aditivos antimicrobianos como el vinagre blanco y el limón criollo permite reconocer con los resultados obtenidos que sin necesidad de someterlos a concentraciones; son agentes reductores del crecimiento de este tipo de microorganismo; inhibiendo su proliferación evitando así la contaminación en las ensaladas lo que corresponde en parte a la finalidad de este estudio de investigación; sin embargo de estos aditivos se demostró que el limón criollo tiene mayor efecto que el vinagre (ácido acético) en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adarme, Catalina .Evaluación de cuatro antimicrobianos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico, On-line. Año 2008 [Consultado: 8/09/12] Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis140.pdf>

Barrera, Francisco López. Pre elaboración y conservación de los alimentos. España.2007.Vol 1.184 p.

Cano, Sara. Métodos de análisis microbiológico [Online] Analiza calidad.2006. [Citado 2 Octubre 2012] Disponible en: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi148anmic.pdf>

Calderón. Ana M. Efecto del vinagre y ácido cítrico en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* en mayonesa casera. On-line, Año: 2008. [Consultado 22/04/2013]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/137807665/Efecto-del-vinagre-y-acido-citrico-en-la-sobrevivencia-de-Staphylococcus-aureus-en-mayonesa-casera>.

Castilla Pinedo, Yolanda. Herrera J. Eliana. Martínez Mercado, Iván. Seguridad alimentaria del programa Apadrinamiento y Nutrición, de la Fundación Mamonal en Cartagena-Colombia. On-line, Año: 2012. [Consultado 21/04/2013]Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/rdi/article/viewFile/73/38>.

Curtiellas, V; Gomez, M; Ledea, O .Actividad antimicrobiana del OLEOZON sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, On-line. Año 2005. [Consultado 8/09/2012] Disponible en: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?>

Estellis. Alex. Técnicas de cocina. On-line. Año: 2009. [Consultado: 23/09/2013] Disponible en: <http://tecnicas-de-cocina.blogspot.com/2009/05/ensaladas.html>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y Agricultura). Mesa redonda Regional sobre Forrajes. Ed. 7. Vol 1. Costa Rica-1956-68 p.

FAO. Definiciones para los fines del Códex alimentarius. On-line. Año: 1997. [Consultado: 15/ 09/2013] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w5975s/w5975s08.htm>

FOOD TODAY. Modulo 3: Aditivos alimentarios. On-line. [Consultado 8/09/12] Disponible en: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r46829.PDF>

G. Normanno, G La Salandra, A. Dambrosio, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products.

- International Journal of Food Microbiology 2007; p 115: 290–296.
- Giraldo, Giselly y Ossa, Yeny Juliana. Elaboración del manual de Buenas Prácticas de Manufactura y manual de Control de Calidad para la empresa C.I. Frude del Municipio de Dos Quebradas Risaralda. Trabajo de Grado Química Industrial. Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Programa de Química Industrial, 2010. 20 p.
- Herrera Arias, F. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. On-line, Año: 2006. [Consultado 8/09/2012] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=90340202>
- Hurtado, M. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. [Online]. Microbiología 22.Venezuela."Publicador desconocido" 22 de enero de 2012. [Citado 2 Octubre 2012] Disponible en: http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Staphylococcus_aureus&action=history.
- INVIMA. Informe De La Vigilancia De Las Enfermedades Transmitidas Por Alimentos, 2008. Disponible en: http://www.invima.gov.co/Invima/general/docs_general/INFORMEETA_%20TRIMESTRE2008.pdf
- Instituto de salud pública de Chile. Disponible en: <http://www.ispch.cl/inocuidad-alimentaria>. Consultado en mayo de 2014.
- Instituto Nacional de Salud, 2014. Protocolo de vigilancia en Salud Pública, ETAS. Disponible en <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf>. Consultado: Junio de 2014.
- Inocuidad Alimentaria [Online].Chile. Instituto Departamental de Salud Pública Ministerio de Salud.1982. [Citado 2 Octubre 2012]. Disponible en: <http://www.ispch.cl/inocuidad-alimentaria>
- Iriarte, María. 2011. Calidad bacteriológica de comidas listas para su consumo, preparadas y distribuidas en la isla de Margarita (Venezuela), período 1991-2009. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Vol 42.
- Itescam. Inocuidad de los alimentos [Online] México. 2012[Citado 15 Octubre 2012]. Disponible en: www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r19496.DOC
- López, Sara. Osorio, Nilda.2012. DISEÑO DE UN SISTEMA DE GESTION E INOCUIDAD ALIMENTARIA PARA UNA PLANTA PROCESADORA DE ARROZ PRECOCIDO. Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/1702/1/Dise%C3%B1o_de_un_Sistema_de_Gestion_e_Inocuidad_Alimentaria_para_una_Planta_Procesadora_de_Arroz_Prec.pdf. Consultado: Mayo de 2014.
- Maldonado, Ronald. Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en queso de mano. On-line, Año 2007.[Consultado 8/09/12] Disponible en: http://www.revistaagronomiaucv.org.ve/revista/articulos/2007_33_3_1.pdf
- Rodríguez Elvira Uso De Agentes Antimicrobianos Naturales En La Conservación De Frutas Y Hortalizas. Año 2011 [Consultado 8/09/12] Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/26675>
- Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. [Online].2011.Mexico.Vol 1. [Citado 2 Octubre 2012]. Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/26675>. ISSN 1665-0441.
- Velandia. Moreno. Alejandro Capítulo 3: ETAS (Enfermedades transmitidas por alimentos).25 de Mayo del 2010. [Consultado:6/05/2012] Disponible en: <http://www.mailxmail.com/curso-higiene-proteccion-manipulacion-alimentos/etas-enfermedades-transmitidas-alimentos>.
- Verdu, José Mataix. Nutrición para educadores. Ed. 2. Argentina. Díaz de Santos. 2005.752 p.