



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio comparativo de resistencia a agentes antimicrobianos en bacterias procedentes de alimentos vegetales.

Alumna: M^a Ascensión Rey Martín

Julio, 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Estudio comparativo de
resistencia a agentes
antimicrobianos en
bacterias procedentes de
alimentos vegetales.**

Alumno: M^a Ascensión Rey Martín

Julio, 2015

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. ABSTRACT.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....	6
3.1. Importancia de la seguridad alimentaria.....	6
<i>3.1.1. Seguridad alimentaria y agentes antimicrobianos.....</i>	<i>6</i>
3.2. Posibles vías o causas de contaminación del alimento.....	7
3.3. Microorganismos frecuentes en estos alimentos.....	8
<i>3.3.1. Microorganismos beneficiosos y perjudiciales.....</i>	<i>9</i>
3.4. Tipos de biocidas y aplicaciones en industria alimentaria.....	9
3.5. Bacterias resistentes a antimicrobianos (posibles resistencias cruzadas biocidas-antibióticos) y su importancia en clínica humana.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
5.1. Alimentos empleados para este estudio.....	15
5.2. Medios de cultivo para el aislamiento de cepas.....	15
5.3. Procesado de los alimentos.....	21
5.4. Recuentos bacterianos de los diferentes medios empleados.....	22

5.5. Identificación preliminar de las colonias seleccionadas.....	22
5.6. Empleo de la técnica de microtitulación para calcular la CMI frente a antimicrobianos.....	25
6. RESULTADOS.....	26
6.1. Carga microbiana e identificación preliminar de los microorganismos aislados.....	26
6.1.1. Alimentos vegetales ecológicos.....	26
6.1.2. Alimentos vegetales adquiridos mediante venta “a granel”.....	30
6.1.3. Alimentos vegetales envasados.....	34
6.1.4. Alimentos vegetales obtenidos de huerta particular.....	38
6.2. Estudio comparativo de carga microbiana en los lotes estudiados.....	40
6.3. Resistencia a biocidas en bacterias aisladas de los alimentos vegetales pertenecientes a los distintos lotes de productos.....	41
7. DISCUSIÓN.....	44
8. CONCLUSIONES.....	45
9. BIBLIOGRAFÍA.....	46
10. PÁGINAS WEB.....	51

1. RESUMEN

Los alimentos vegetales son una de las principales vías de transmisión de microorganismos a través de la cadena alimentaria. En este estudio se llevó a cabo la estimación de la carga microbiana de 4 lotes de alimentos vegetales, en función de distintos métodos de producción y venta al consumidor. Además, se evaluó la resistencia a biocidas de empleo habitual en la industria alimentaria de las cepas seleccionadas de cada uno de los lotes. De acuerdo con los resultados obtenidos, los alimentos con mayor carga microbiana son los procedentes de venta "a granel", seguidos de los de huerta. Las cepas bacterianas procedentes de alimentos de huerta y las de venta "a granel" presentan la mayor tolerancia a altas concentraciones de los biocidas analizados, las aisladas de alimentos envasados presentan una resistencia intermedia, mientras que las cepas procedentes de alimentos ecológicos presentan resistencias muy variables frente a los biocidas empleados.

Palabras clave: alimentos vegetales, biocidas, carga microbiana, métodos de producción.

2. ABSTRACT

Vegetables are responsible for most of food-borne infections. This study was conducted to estimate the microbial content of four batches of vegetables, according to different production and sale methods. We also evaluated the resistance of selected strains from the different batches against biocides usually employed in the food industry. According to our results, highest microbial counts were found in vegetables from the "bulk" sale, followed by vegetables from a particular grove. Bacteria from these same batches showed the highest tolerance to biocides. Intermediate resistance was found in packaged vegetables, while strains from organic foods showed variable resistance depending on the biocide tested.

Keywords: vegetables, biocides, microbial content, production methods.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Importancia de la seguridad alimentaria

En España, la seguridad alimentaria es actualmente objeto de una estricta vigilancia debido a que los alimentos son una de las vías principales de transmisión de microorganismos al ser humano o a otros seres vivos.

3.1.1. Seguridad alimentaria y agentes antimicrobianos

La fruta fresca y las verduras son alimentos que forman parte de manera esencial en la dieta humana, y su consumo es beneficioso para nuestra salud. Las instituciones de salud pública de países como E.E.U.U., Canadá, Nueva Zelanda y varios estados de la Unión Europea han promovido campañas que recomiendan el consumo de al menos cinco piezas diarias de frutas y verduras (Abadias *et al.*, 2008). Pero hay que tener en cuenta, que consumir dichos alimentos de forma cruda, puede provocar la transmisión de infecciones microbianas. Para prevenir estas infecciones, en la industria alimentaria se emplean sustancias antimicrobianas como los biocidas, las cuales, matan o inhiben el crecimiento de estos microorganismos tales como bacterias, parásitos, virus u hongos. Los alimentos crudos son consumidos sin haber sido antes sometidos a procesos de reducción de la carga microbiana como por ejemplo, métodos de cocción u otros, para eliminar los patógenos que pudieran presentar asociados tras haber sido manipulados y cultivados en tierras con agua de regadío (Shahnazi *et al.*, 2010). Por eso, cuando consumimos alimentos crudos, antes los lavamos siempre en agua o en agua con unas gotitas de lejía o usando vinagre como se hace por ejemplo, en verduras como la lechuga entre otras muchas. Por otro lado, los productos ecológicos son de origen natural obtenidos sin la utilización de productos químicos para conservar y proteger el medioambiente. Además, la elaboración de estos productos mediante métodos naturales elimina los riesgos que los productos químicos contenidos en los alimentos de producción tradicional tienen para la salud de la población. Diversos estudios ponen de manifiesto la mejora en la salud que generan los productos ecológicos u orgánicos en la cría de animales si los comparamos con otros animales que se

alimentan de productos convencionales y no ecológicos (Sobieralski *et al.*, 2013). Por otro lado, los alimentos envasados sí que están, con mayor frecuencia, tratados con productos químicos al igual que los envases en los que se comercializan.

3.2. Posibles vías o causas de contaminación

Hoy en día, los productos frescos tienen mucha importancia en la dieta como fuente de diversos nutrientes, especialmente vitaminas y fibras.

En primer lugar, como este tipo de alimentos, los vegetales, por lo general se suelen consumir crudos, no se utilizan prácticas de intervención que puedan controlar o eliminar eficazmente los patógenos antes de su consumo, por lo que es una fuente potencial de enfermedades alimentarias. Además, existen numerosos factores que influyen en la contaminación de productos vegetales frescos. Estos factores son los siguientes: el uso de estiércol como fertilizante, agua contaminada por productos agrícolas, equipos de cultivo contaminados, prácticas higiénicas de los trabajadores en el campo, en las envasadoras y en las plantas de procesado, y la presencia de animales salvajes en los campos y en las envasadoras. Es probable que de entre las fuentes de patógenos las más importantes en el campo sean la del agua de riego y la del empleo de estiércol como fertilizante (Matthews, 2006).

Los microorganismos patógenos pueden asociarse al alimento durante los 5 pasos de manipulación y procesado de los alimentos vegetales, los cuales son:

- El paso previo a la recolección: debido al agua utilizada para regar, a la aplicación de insecticidas y fungicidas, y al estiércol utilizado como fertilizante.
- El periodo de recolección: los cultivos podrían contaminarse con patógenos asociados tanto al equipo de recolección como a los trabajadores en dichas labores. Por lo tanto, deben de limpiarse y desinfectarse regularmente y adecuadamente todos los utensilios y equipos que se utilicen en contacto con los alimentos, así como también los trabajadores deben respetar unas correctas prácticas de higiene.
- El procesado de los alimentos (en donde se incluye el envasado y la distribución), en el que tiene lugar el uso de agua potable y también, de agua tratada con algún desinfectante para controlar la carga microbiana de la misma.

- La preparación del alimento, tanto en el hogar, como en cualquier restaurante u otro tipo de instalación de servicio de alimentos, hay que tenerlo cuenta, ya que pueden introducir patógenos en el producto si su preparación no es apropiada.
- Los productos importados. Hay que prestar especial atención a este tipo de productos, ya que hoy en día, el intercambio de alimentos entre unos países y otros es muy frecuente. La FDA (Food and Drug Administration: Agencia de Alimentos y Medicamentos) llevó a cabo un estudio de los productos frescos importados y aunque la incidencia de la contaminación fue relativamente baja (aproximadamente el 4%) considerando el volumen de frutas y verduras frescas importadas cada año, este nivel de contaminación podría suponer un peligro significativo para la salud humana.

También se ha visto como posibles fuentes de microorganismos patógenos, aunque en menor medida, las aves migratorias y los animales salvajes que habitan o realizan sus funciones vitales alrededor de las zonas de cultivo (Matthews, 2006).

Las bacterias, parásitos y patógenos virales son transmitidos a través de vehículos como son los productos frescos, causando enfermedades en los humanos. Una serie de informes reflejan que las verduras crudas son potencialmente las principales responsables de la transmisión de patógenos (Nguyen-the *et al.*, 1994; Beuchat, 1996).

Existen un número elevado de informes sobre contaminación microbiológica que implican a los alimentos frescos (García-Villanova *et al.*, 1987a,b; Johannessen *et al.*, 2002; McMahon *et al.*, 2001; Salleh *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2004, 2006; FDA, 2001, 2003), pero aún disponemos de poca información acerca de la contaminación microbiana de frutas y hortalizas recién cortadas (FEHD, 2002; Sagoo *et al.*, 2003; Tournas, 2005, Tournas *et al.*, 2006).

3.3. Microorganismos frecuentes en estos alimentos

En los alimentos vegetales se puede encontrar una amplia variedad de microorganismos. De entre los más frecuentes que se han descrito en los productos agrícolas hay bacterias como *Salmonella* y *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157:H7; *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*; virus como

los calicivirus, el virus de la hepatitis A y los norovirus; parásitos como *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*; helmintos como *Hymenolepis nana* o *Taenia solium*; hongos en ocasiones productores de micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos; y también, levaduras.

3.3.1. Tipos de microorganismos

Existen microorganismos asociados a este tipo de alimentos tanto beneficiosos como perjudiciales para la salud, y otros que pueden desempeñar ambos papeles, como los enterococos.

Los enterococos están implicados en funciones esenciales para la industria alimentaria en la fabricación de productos cárnicos y lácteos (Giraffa, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006) tales como en el desarrollo de aroma y maduración de diferentes quesos. Pero en contraposición, también están involucrados en el deterioro de los alimentos (Franz *et al.*, 1999), en intoxicaciones alimentarias (Gardini *et al.*, 2001) y en la propagación de resistencia a los antibióticos a través de la cadena alimentaria (Murray, 1990; Giraffa, 2002). Este grupo bacteriano ha pasado a ser una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Kayser, 2003).

Los alimentos fermentados (como por ejemplo el yogur) son beneficiosos para nuestra salud y son importantes en la nutrición (Franz, *et al.*, 2014), debido a los microorganismos que llevan a cabo esas fermentaciones en los productos.

El principal problema relacionado con los microorganismos presentes en los alimentos, es que muchos de ellos pueden causar intoxicaciones alimentarias como es el caso de la *Salmonella* (Fàbrega, *et al.*, 2013).

3.4. Tipos de biocidas y aplicaciones en industria alimentaria

Los biocidas son sustancias activas o preparados que contienen una o más sustancias activas cuyo objetivo es destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos.

Inicialmente, los biocidas estaban divididos en 23 tipos de productos basados en su uso, que se clasifican en cuatro grandes grupos, los cuales son: grupo 1 formado por los desinfectantes y los biocidas generales; grupo 2, por los conservantes; el grupo 3, por los plaguicidas; y el grupo 4, lo forman el resto de biocidas como productos anti-incrustantes, para embalsamamiento y taxidermia, y productos contra vertebrados.

La Comisión Europea publicó en el Diario Oficial del 1 de febrero de 2014, el Reglamento de Ejecución (UE) nº 88/2014 de la Comisión, de 31 de enero de 2014, por el que se especifica un procedimiento para la modificación del anexo I del Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al uso y comercialización de los biocidas.

Con este Reglamento, se ha pasado a considerar 22 tipos de productos. Entre ellos se incluyen los desinfectantes utilizados en los ámbitos de la vida privada y de la salud pública, los insecticidas, acaricidas, rodenticidas, repelentes, conservantes, etc.

A continuación, se muestran los 4 grupos en los que se incluyen los 22 tipos en los que se dividen actualmente los biocidas (tabla 1).

Grupo 1: DESINFECTANTES	
TP1	Biocidas para la higiene humana.
TP2	Desinfectantes y alguicidas no destinados a la aplicación directa a personas o animales.
TP3	Biocidas para la higiene veterinaria.
TP4	Desinfectantes para los equipos, recipientes, utensilios y superficies que están en contacto con los alimentos y piensos.
TP5	Desinfectantes empleados en la desinfección del agua potable.
Grupo 2 : CONSERVANTES	
TP6	Conservantes para los productos durante su almacenamiento.
TP7	Conservantes para películas.
TP8	Protectores para maderas.
TP9	Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados.
TP10	Conservantes de materiales de construcción.
TP11	Protectores de líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales.
TP12	Productos antimoho.
TP13	Protectores de líquidos empleados para trabajar o cortar materiales.

Grupo 3 : PLAGUICIDAS	
TP14	Rodenticidas.
TP15	Avicidas.
TP16	Molusquicidas, vermícidias y productos para controlar otros invertebrados.
TP17	Piscicidas.
TP18	Insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos.
TP19	Repelentes y atrayentes.
TP20	Control de otros animales vertebrados.
Grupo 4: OTROS BIOCIDAS	
TP21	Productos antiincrustantes.
TP22	Líquidos para embalsamamiento o taxidermia.

Tabla 1. Clasificación de los tipos de biocidas (TP) y breve descripción de cada uno de ellos.

Los desinfectantes pueden servir para la higiene humana, para la salud pública, para la higiene veterinaria, para desinfección de agua potable y para la industria alimentaria y de piensos. Los conservantes pueden ser de productos envasados, de películas, de la madera, de fibra, cuero, caucho y materiales polimerizados, de obras de albañilería, para aguas que no sean potables para los sistemas de procesamiento y refrigeración, bactericidas para antimoho, y conservantes para fluidos de corte. Dentro de los plaguicidas encontramos los raticidas, avicidas, molusquicidas, piscicidas, insecticidas, acaricidas y los repelentes y atrayentes.

El uso de los biocidas es importante y delicado por lo que está sometido a un estricto control por parte de las autoridades sanitarias. Debido a esto, una de las medidas que se lleva a cabo en Andalucía cuando se realizan tratamientos con biocidas en los ámbitos de uso ambiental o en la industria alimentaria, es que las personas responsables de los tratamientos deberán estar en posesión del carné de nivel cualificado, y todo el personal auxiliar que participe en los tratamientos, del carné de nivel básico.

El hecho de que muchos mecanismos de tolerancia a los biocidas también puedan acomodar a los antimicrobianos de uso clínico, y la posible relación física de los determinantes genéticos implicados en la resistencia a los biocidas y a los

antibióticos, han provocado un gran interés en el ámbito científico acerca del impacto de la utilización de biocidas en la industria alimentaria sobre la prevalencia y la propagación de resistencia a los antimicrobianos en la cadena alimentaria (Ortega *et al.*, 2013).

Los tratamientos que se utilizan en la industria alimentaria que son destinados a la desinfección, desinsectación y a la desratización de los espacios, locales, instalaciones o equipos relacionados con la producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos, son los biocidas de tipo 4, 14, 18 y 19.

En la industria alimentaria moderna es imprescindible mantener un equilibrio entre la demanda de los consumidores de alimentos sanos, nutritivos y poco procesados carentes de aditivos (como conservantes químicos u otros agentes antimicrobianos) con la escala de producción de alimentos. Esto llevó a un importante impacto en el volumen de biocidas usados en el medio ambiente. Con el fin de mejorar las medidas de higiene y garantizar la seguridad alimentaria, la industria alimentaria ha aumentado su utilización de biocidas y desinfectantes basados en productos químicos para controlar la ecología microbiana del entorno de producción. Por lo tanto, la tolerancia a biocidas ha sido documentada para la mayoría de clases de los agentes antimicrobianos (Langsrud *et al.*, 2003).

De las cuatro clases principales de biocidas cuyo uso está autorizado en la industria alimentaria los compuestos triclosán, clorhexidina, cloruro de benzalconio y peróxido de hidrógeno presentan una elevada frecuencia de uso (Condell *et al.*, 2012).

- El triclosán es un compuesto fenólico cuyo mecanismo de acción consiste en alterar la membrana e inhibir la función de una proteína FabI que se encuentra implicada en la biosíntesis de ácidos grasos.
- La clorhexidina pertenece al grupo de las biguanidinas. Es una sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida. Su mecanismo de acción consiste en dañar la membrana microbiana, inhibir algunas enzimas asociadas a membrana y provocar la pérdida de constituyentes celulares.
- El cloruro de benzalconio es un compuesto de amonio cuaternario implicado en el daño de membrana y en la pérdida y coagulación de las proteínas celulares.
- El peróxido de hidrógeno es un agente implicado en el daño oxidativo. Debido a sus efectos oxidantes puede alterar una amplia variedad de compuestos

orgánicos como lípidos y proteínas que componen las membranas celulares de los microorganismos.

3.5. Bacterias resistentes a antimicrobianos (posibles resistencias cruzadas biocidas-antibióticos) y su importancia en clínica humana

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), los antimicrobianos son medicamentos utilizados para tratar las infecciones causadas por bacterias, hongos, parásitos y virus, y su descubrimiento fue, desde el punto de vista de la salud, uno de los avances más importantes en la historia de la humanidad. La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos, se define como la capacidad de éstas para resistir la acción de estos fármacos, y el aumento incontrolado de los patógenos resistentes pone en peligro el éxito terapéutico en infecciones humanas.

Además, la 67ª Asamblea Mundial de la Salud aprobó una resolución en la que se pedía a la OMS que liderase la elaboración de un plan de acción mundial para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos (RAM), y que presentara un proyecto de plan a la Asamblea Mundial de la Salud en 2015.

Pero no sólo es importante la detección y prevención de la resistencia de ciertas bacterias a algunos biocidas sino que también se han descrito numerosos casos de resistencias cruzadas entre biocidas y antibióticos (Abdel Malek *et al.*, 2010; Braoudaki *et al.*, 2004), con el consecuente problema asociado en terapéutica humana.

Muchas bacterias presentan resistencia a desinfectantes como los compuestos de amonio cuaternario (QAC), los cuales, tienen muchas aplicaciones en medicina veterinaria y juegan un importante papel en el control de enfermedades de los animales. Este es el caso, por ejemplo, de *Staphylococcus aureus*.

En las cepas de *S. aureus* de muestras tanto clínicas como no clínicas, por ejemplo, cepas aisladas de equinos (Bjorland *et al.*, 2003), los aislados de la especie bovina (Bjorland *et al.*, 2001) y los aislados de alimentos (Heir *et al.*, 1995, 1999a, 1999b; Sidhu *et al.*, 2001), se ha detectado tolerancia a los biocidas. Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) son un problema frecuente en las infecciones humanas (Gould *et al.*, 2012) y también se encuentran cada vez más en

los alimentos, mostrando de forma progresiva perfiles de multi-resistencia a diversos antimicrobianos.

Otros estudios han revelado que *Listeria monocytogenes* y bacterias lácticas aisladas de alimentos son poco susceptibles a los QAC, es decir, presentan tolerancia a ellos (Aase *et al.*, 2000; Heir *et al.*, 2004; Aarestrup *et al.*, 2007). Se puede observar también baja susceptibilidad al cloruro de benzalconio, al diisetonato de hexamidina y al bromuro de etidio por parte de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos como el queso o la carne de aves de corral (Lemaitre *et al.*, 1998). La tolerancia múltiple que presenta esta bacteria se asocia con el ADN extracromosómico que era transferible no sólo entre listerias sino también entre *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Se comprobó que si se sometía a *L. monocytogenes* a altas concentraciones progresivas de cloruro de benzalconio se producía también una susceptibilidad reducida por su parte hacia la gentamicina y a la kanamicina (To *et al.*, 2002; Romanova *et al.*, 2006). Hay estudios que han demostrado la implicación de concentraciones subletales de triclosán en la inducción de la resistencia a aminoglucósidos (grupo de antibióticos bactericidas) en *L. monocytogenes* (Christensen *et al.*, 2011). Aún así, se necesitan más estudios para aclarar la relación causal entre la exposición a triclosán y la tolerancia incrementada a gentamicina.

4. OBJETIVOS

Los objetivos fundamentales de este trabajo son los siguientes:

1. Evaluar la carga bacteriana en cuatro lotes de alimentos vegetales procedentes de distintos métodos de producción y venta al consumidor.
2. Realizar una identificación preliminar de los microorganismos aislados mediante determinación de su morfología, tipo de pared celular y actividad catalasa.
3. Determinar la resistencia frente a biocidas de empleo habitual en la industria alimentaria de microorganismos pertenecientes a cada uno de los lotes analizados.

4. Evaluar la posible correlación entre los métodos de producción y venta al consumidor de los alimentos vegetales, su carga bacteriana y la resistencia a biocidas en los microorganismos aislados.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Alimentos empleados para este estudio

Para llevar a cabo el presente estudio, se han empleado 4 lotes de alimentos vegetales (uno de alimentos vegetales envasados, otro de ecológicos (y envasados), uno alimentos “a granel” y otro procedentes de huerta). Para conformar cada uno de los lotes se escogieron 5 alimentos vegetales, excepto del de procedencia de huerta familiar, de la cual sólo se pudieron obtener tres productos, por la época del año en que se desarrollaron los experimentos.

Dichos alimentos fueron los siguientes: tomate cherry, puerro, ajo, patata y pimiento verde; y de huerta se emplearon ajo, patata y puerro. Se van a comparar los 4 lotes anteriormente enumerados porque se pretende realizar un estudio comparativo de los patógenos microorganismos que se pueden encontrar entre ellos.

5.2. Medios de cultivo para el aislamiento de cepas

Todos los medios de cultivo fueron obtenidos de la empresa Scharlau de Barcelona. Se utilizaron 4 medios selectivos sólidos y 2 medios generales que se autoclavaron a 121 °C durante 21 minutos. Esta es la composición de cada uno de ellos.

- **Mac Conkey Agar (Scharlau)**

Peptone.....	20,000 g/l
Lactose.....	10,000 g/l
Bile salts #3.....	1,500 g/l
Sodium chloride.....	5,000 g/l
Neutral red.....	0,030 g/l
Crystal violet.....	0,001 g/l
Agar.....	15,000 g/l

Es un medio selectivo y diferencial usado para la detección y aislamiento de coliformes (enterobacterias). Está compuesto por sales biliares purificadas que inhiben el crecimiento de bacterias Gram +, por lo que sólo crecen las Gram -.

Las colonias que crecen pueden ser de color blanco (con halos de color amarillo alrededor), transparentes o rosas, incluso pueden ser rosas muy oscuras casi negras (Figura 1). Las bacterias lactosa positivo son colonias medianas y rojas debido a la producción de ácido resultante de la fermentación de lactosa y, por lo tanto, la forma de *Escherichia coli* puede distinguirse de forma fácil porque forman una pequeña zona de precipitación de las sales biliares alrededor de ellas.



Figura 1. Crecimiento bacteriano en medio Mac Conkey obtenido en muestra de puerro del lote de productos envasados.

- **Vogel-Johnson Agar (VJ Agar) (Scharlau)**

Casein peptone.....	10,000 g/l
Yeast extract.....	5,000 g/l
Mannitol.....	10,000 g/l
Dipotassium phosphate.....	5,000 g/l
Litium chloride.....	5,000 g/l
Glycine.....	10,000 g/l
Phenol red.....	0,025 g/l
Agar.....	15,000 g/l

Es un medio selectivo para el aislamiento e identificación de bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus*. La acción selectiva de este medio es debida a la presencia de cloruro de litio, de glicina y de telurito potásico.

Los estafilococos crecen en este medio apareciendo como colonias negras sobre medio de color rojo (si es que no fermenta el manitol) y con halos amarillos alrededor de éstas (Figura 2). Además, los estafilococos pueden fermentar el manitol, reflejándose por el viraje del indicador del medio de cultivo a amarillo debido al ácido liberado.

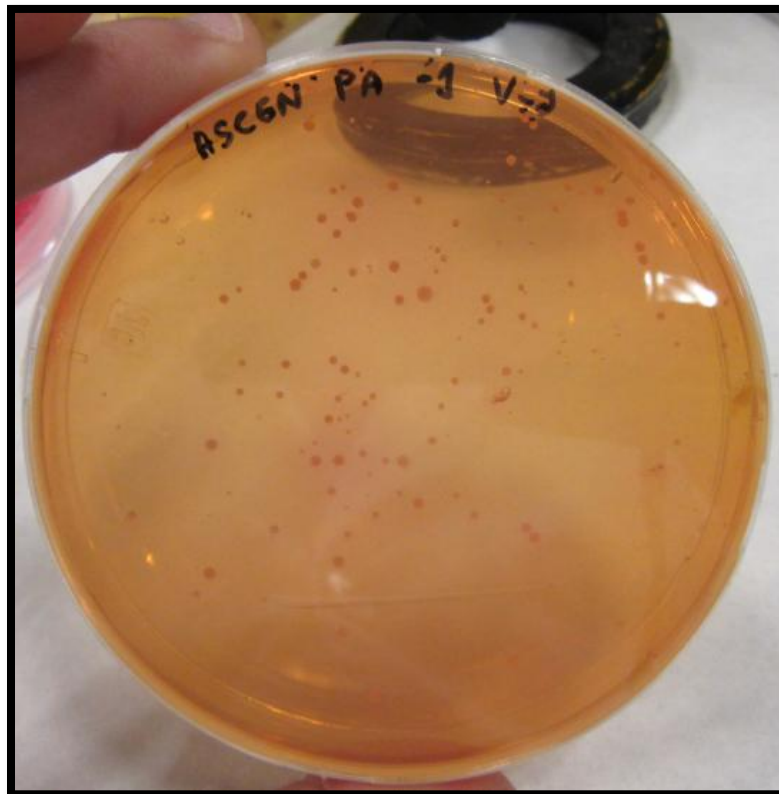


Figura 2. Crecimiento bacteriano obtenido en medio selectivo V-J en muestra de patata ecológica.

- **Kanamycin Esculin Azide Agar (KAA Agar) (Scharlau)**

Tryptone.....	20,00 g/l
Yeast extract.....	5,00 g/l
Sodium chloride.....	5,00 g/l
Disodium citrate.....	1,00 g/l
Esculin.....	1,00 g/l
Ferric-Ammonium citrate.....	0,50 g/l
Sodium azide.....	0,15 g/l
Kanamycin sulfate.....	0,02 g/l
Agar.....	15,00g/l

Este medio sólido es selectivo y sirve para la detección y el aislamiento de *Enterococcus* sp. y también de estreptococos del grupo D de Lancefield en muestras de alimentos, de acuerdo con Mossel *et al.* Dicho medio es selectivo porque presenta esculina (glucósido tóxico), Kanamicina (antibiótico del grupo de los aminoglucósidos) y azida de sodio, compuestos inhibidores selectivos de las bacterias Gram –, por lo que sólo crecen las Gram + (excepto el género *Staphylococcus*).

Las colonias de enterococos crecen de color gris, son pequeñas y con un halo alrededor de color negro (Figura 3).

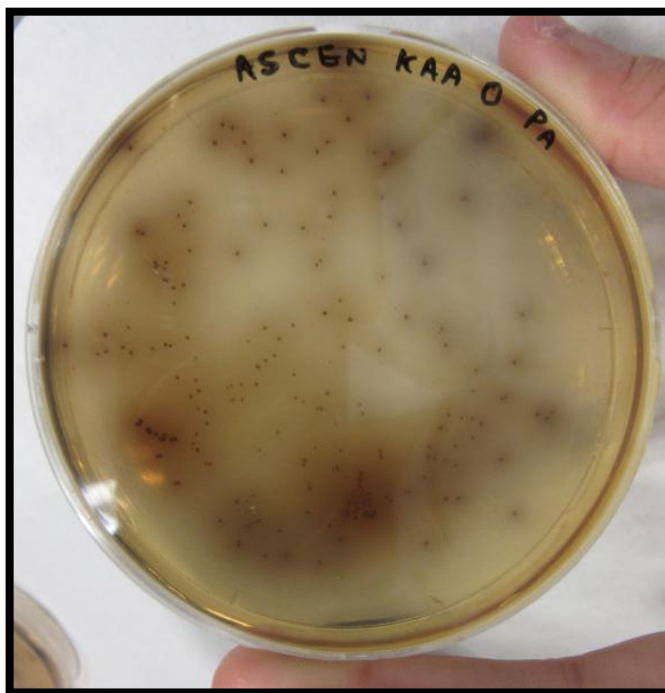


Figura 3. Morfología característica de las colonias que crecen en KAA. Muestra de patata obtenida de la venta “a granel”.

- **Man, Rogosa y Sharpe Agar (MRS Agar) (Scharlau)**

Peptone proteose.....	10,00 g/l
Meat extract.....	8,00 g/l
Yeast extract.....	4,00 g/l
D (+)- glucose.....	20,00 g/l
Sodium acetate.....	5,00 g/l
Triammonium citrate.....	2,00 g/l
Magnesium sulfate.....	0,20 g/l
Manganese sulfate	0,05 g/l
Dipotassium phosphate.....	2,00 g/l
Polisorbate 80.....	1,00 g/l
Agar.....	14,00 g/l

Este medio sólido es selectivo y sirve para la detección y el aislamiento de lactobacilos (bacilos Gram positivos). Este medio inhibe el crecimiento de las bacterias Gram negativas. La adición de magnesio, manganeso y de acetato, junto con polisorbato, le proporciona al medio una mayor capacidad para el crecimiento de lactobacilos, incluyendo especies muy exigentes tales como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*. La calidad de las peptonas que también presenta el medio, además de extractos de carne y de levaduras, y de otros compuestos ya nombrados, se combinan para hacer que el medio MRS sea uno de los mejores para el cultivo de lactobacilos. Por lo general las bacterias lácticas producen crecimiento visible en este medio tras 48 horas de incubación a 30°C.

Las bacterias lácticas que crecen son colonias blancas y de pequeño tamaño (Figura 4), pero también, puede crecer un coco-bacilo, *E. coli*, aunque sea Gram negativo (colonia blanca, de aspecto grande).



Figura 4. Morfología característica de las colonias que crecen en MRSA. Muestra de patata obtenida de una huerta particular.

- Trypticase soy agar (TSA) (Scharlau)

Casein peptone.....	15,0 g/l
Soy peptone.....	5,0 g/l
Sodium chloride.....	5,0 g/l
Agar.....	15,0 g/l

Es un medio general y sólido compuesto de peptonas de procedencia animal y vegetal, gracias a las cuales, permite el crecimiento de todo tipo de microorganismos como hongos, levaduras, bacterias tanto Gram + como Gram – incluidos géneros muy exigentes como *Neisseria*, *Listeria*, *Brucella*, etc.

- **Trypticase soy broth (TSB) (Scharlau)**

Casein peptone.....	17,0 g/l
Soya peptone.....	3,0 g/l
Sodium chloride.....	5,0 g/l
Dipotassium phosphate.....	2,5 g/l
Dextrose.....	2,5 g/l

Es un medio líquido general no selectivo adecuado para el mantenimiento en líquido de los cultivos bacterianos, por lo que se utiliza como un caldo de enriquecimiento en el primer paso de detección microbiana. En este medio crecerá cualquier tipo de bacteria, hongo o levadura.

Para comenzar, se llevó a cabo la preparación de todos los medios de cultivo necesarios para este trabajo. Por un lado, preparé medios generales de TSA sólido en tubos largos y medio de TSB líquido en tubos más cortos. Los tubos de TSA fueron solidificados en forma de agar inclinado. Por otro lado, preparé las placas para los 4 medios selectivos y también placas de TSA. Para la realización de cada placa, tras el pesado del medio deshidratado proporcionado por la casa comercial y disolución en agua destilada, los medios fueron esterilizados en el autoclave a 121 °C durante 21 minutos. Después se atemperaron a 50°C y se vertieron en placas de Petri a razón de 15 ml por placa y se dejaron solidificar durante unas horas y después se guardaron en la cámara fría hasta su uso para evitar su contaminación y deshidratación. Con respecto a los tubos de agar inclinado, cada uno contenía 7 ml de medio TSA. Para los tubos de TSB, se llevaron a cabo los mismos pasos anteriores excepto que como no llevaban agar, no es necesario dejarlos solidificar sino que tras atemperarlos tras la esterilización en autoclave pasaron directamente a la cámara fría para mantenerlos hasta su empleo posterior.

5.3. Procesado de los alimentos

Cada semana trabajamos con uno de los lotes de alimentos, siempre llevando a cabo el mismo procedimiento que se describe a continuación.

Comenzamos con el procesado de los 5 alimentos del lote correspondiente. Para ello se pesan porciones de 5 g de cada producto y se mezcla cada uno independientemente con 45 ml de solución salina al 0,9%, para finalmente, ser homogeneizados mediante un homogeneizador, el Stomacher® 80 Biomaster, Seward Ltd.

A continuación, se prepararon diluciones seriadas para cada alimento usando eppendorfs, echando 100 µl de la solución preparada anteriormente, la solución madre, sobre 0,9 ml de solución salina estéril. De la solución que se obtiene, se cogen otros 100 µl y se le añade 0,9 ml de solución salina estéril a un eppendorf nuevo para hacer la siguiente dilución y así sucesivamente, hasta obtener las diluciones necesarias para cada uno de los recuentos a realizar.

5.4. Recuentos bacterianos de los diferentes medios empleados

En segundo lugar, para hacer el recuento de bacterias, se siembran 100 µl de cada dilución, de la 0 hasta la -4, en placas de los medios generales y 100 µl de las 2 primeras diluciones (0 y -1) en las placas de los medios selectivos descritos. Los recuentos bacterianos de las placas se realizaron tras 48 horas de incubación a 37°C, excepto para las bacterias lácticas, que fueron incubadas a 30°C.

Por otro lado, también se determinó el número de unidades formadoras de colonias de cada alimento. Para ello, de entre las 5 placas (de la 0 hasta la -4) de TSA que tenemos para cada alimento, se seleccionó la que tuviera entre 30 y 300 colonias de bacterias, y se realizó la fórmula siguiente:

$$\text{UFC} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución}}{0,1}$$

5.5. Identificación preliminar de las colonias seleccionadas

A continuación, se seleccionaron las colonias que presentaban morfologías diferentes obtenidas de cada medio de cultivo empleado y se realizó a cada una de

ellas una tinción de Gram y prueba de la catalasa para obtener una identificación preliminar de dichas bacterias.

Christian Gram (1884) describió la técnica de la tinción de Gram y a él se debe el nombre de dicha tinción. Este es el protocolo a seguir para realizarla:

- 1.- Poner gota de agua destilada en un portaobjetos.
- 2.- Coger la bacteria a del tubo de TSA en semilla y extender sobre la gota del portaobjetos.
- 3.- Secar y fijar la bacteria al portaobjetos agitando éste de un lado a otro sobre el mechero Bunsen.
- 4.- Dejar enfriar el portaobjetos a temperatura ambiente.
- 5.- Echar varias gotas del colorante cristal violeta sobre la bacteria fijada al portaobjetos durante 2 minutos.
- 6.- Transcurridos esos 2 minutos, escurrir el colorante para eliminar lo que sobre (sin lavar el portaobjetos).
- 7.- A continuación, añadir unas gotas del mordiente lugol sobre la bacteria fijada durante 2 minutos.
- 8.- Pasados esos 2 minutos, decolorar con alcohol de 96°.
- 9.- Después de la decoloración, lavar el portaobjetos con la muestra fijada con abundante agua destilada.
- 10.- Echar unas gotas del colorante safranina sobre la muestra fijada durante 3 minutos.
- 11.- Lavar de nuevo con agua destilada.
- 12.- Dejar secar a temperatura ambiente.
- 13.- Observar al microscopio con el objetivo de 100x y aceite de inmersión.

Las colonias de bacterias serán Gram +, si tras la tinción aparecen de color violeta (Figura 5), mientras que si aparecen de color rojo, serán Gram – (Figura 6). Las bacterias que se encuentran entre las Gram + son *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. y *Enterococcus* sp. Y el grupo de bacterias Gram – lo conforma la familia *Enterobacteriaceae*.

Por otro lado, la prueba de la catalasa será útil para ayudar a discernir entre géneros de bacterias Gram +. Esta prueba se realiza poniendo una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% (10 volúmenes) y sobre esa gota, se extiende con el asa

de siembra una de las colonias obtenidas de los tubos de TSA en semilla. Si se produce burbujeo será porque se ha descompuesto el peróxido de hidrógeno, liberándose agua y oxígeno, que se desprende en forma de burbujas y la prueba de la catalasa se dice que ha salido positiva. Cuando la prueba de la catalasa da positiva en bacterias Gram +, la bacteria pertenecerá al género *Staphylococcus*, mientras que si la catalasa da negativa, es decir, ausencia de burbujeo, será del género *Streptococcus* (Figura 7). En dicha prueba, las enterobacterias, que aparecen con frecuencia en este tipo de alimentos a partir de las aguas de riego y los abonos naturales, darán negativo.

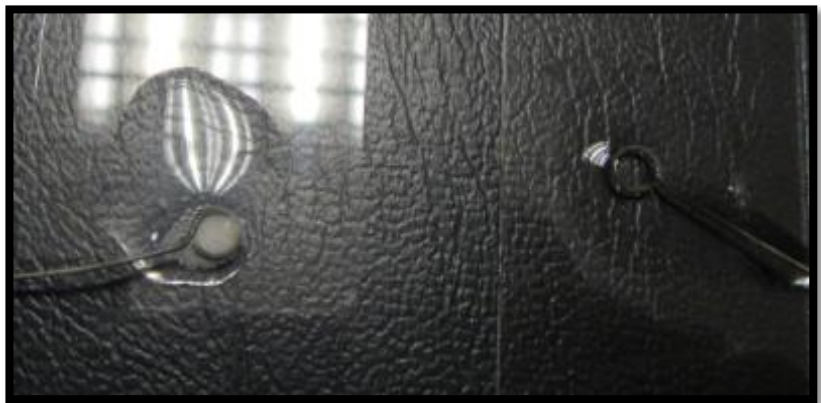


Figura 7. A la izquierda de la imagen, se observa burbujeo, indicativo de catalasa positiva para esa cepa. En cambio, a la derecha de la imagen, esa cepa tendrá actividad catalasa negativa.

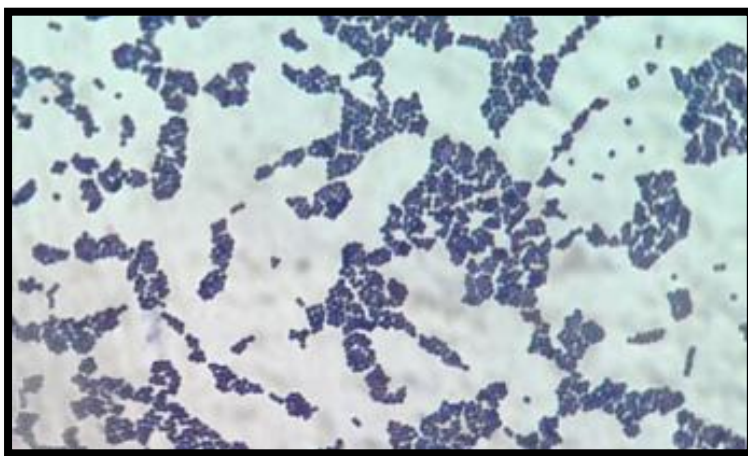


Figura 5. Imagen obtenida con el microscopio a 100x de una muestra de patata obtenida de la venta “a granel”. Son cocos Gram + en disposición de racimos.



Figura 6. Imagen obtenida con el microscopio a 100x de una muestra de patata obtenida de una huerta particular. Son bacilos Gram -.

5.6. Empleo de la técnica de microtitulación para calcular la CMI frente a antimicrobianos.

Para finalizar con el estudio, se realizó una evaluación de la resistencia frente a biocidas. Para ello, se determinó la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de diferentes biocidas empleados habitualmente en la industria alimentaria como antimicrobianos frente a las cepas seleccionadas de cada grupo de alimentos vegetales. El criterio fue el de seleccionar las cepas de los medios selectivos siempre que fuera posible, ya que se tiene una mayor orientación del tipo microbiano con el que se está trabajando, y en el caso de no obtener colonias en estos medios, se recurriría a seleccionarlas del medio no selectivo empleado (TSA). La técnica que se llevó a cabo para realizarlo fue la de microtitulación. Los tres biocidas que se utilizaron fueron los siguientes: cloruro de benzalconio (BC), cetrimida (CE) y cloruro de hexadecil piridinio (HDP), a tres concentraciones diferentes cada biocida, las cuales fueron al 0,1 %, al 0,01 % y al 0,001 %.

Para realizar la técnica de la microtitulación, son necesarios tubos con 2 ml de TSB líquido para preparar los cultivos bacterianos, mediante incubación durante 24 horas de los tubos sembrados a partir de las semillas de cada cepa conservadas en agar inclinado a 4°C.

Cada placa de microtitulación tiene 96 pocillos, y cada uno de ellos, tiene un volumen de 200 μ l. Cada pocillo se rellenó con 180 μ l de cada una de las diluciones del compuesto (biocida) a ensayar más 20 μ l de una dilución 1:10 del cultivo de la cepa a ensayar. Esta dilución se prepara añadiendo 100 μ l de cultivo sobre 900 μ l de medio TSB en eppendorf previamente rellenos y esterilizados. En total, en cada placa de microtitulación se han ensayado tres concentraciones de cada biocida para 21 cepas bacterianas diferentes y de entre los diferentes alimentos que estamos comparando. Una vez tenemos todos los pocillos rellenos, incubamos las placas durante 24-48 horas a 37° C. Transcurrido ese tiempo se homogeneiza su contenido con un agitador de placas de microtitulación. Por último, se determina el crecimiento microbiano en cada pocillo mediante lectura de la densidad óptica (D.O.) en un lector de microplacas a una longitud de onda (λ) de 595 nm.

6. RESULTADOS

6.1. Carga microbiana e identificación preliminar de los microorganismos aislados.

6.1.1. Alimentos vegetales ecológicos

Los primeros resultados obtenidos en este estudio fueron los recuentos de colonias crecidas en cada medio de cultivo empleado. Para ello, se llevó a cabo el cálculo de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por ml de solución de lavado de los alimentos. Por otro lado, llevamos a cabo la identificación de forma presuntiva de los tipos de microorganismos que crecieron en los medios de cultivo, mediante la realización de una tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Todos estos resultados se ven reflejados en las tablas siguientes (2 a 19).

Cuando el número de colonias crecidas en las placas de los diferentes medios era inferior a 30, ese valor no era considerado significativo y por lo tanto, no se pudo calcular la UFC como tampoco se procedió a identificar la colonia mediante la tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Estos resultados no significativos se representan en las tablas de la 2 a la 19 con una raya discontinua. Además de

bacterias, en algunos medios crecieron también levaduras, las cuales no se seleccionaron ni se aislaron porque no eran objeto de este estudio.

Como podemos observar, en el tomate cherry ecológico no se obtuvieron valores significativos de crecimiento en ninguno de los medios de cultivo. Después de los recuentos se procedió a seleccionar cepas de TSA para su presunta identificación (Tabla 2). También hubo crecimiento de levaduras tanto en el medio de V-J como en el de TSA.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
CAA	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	---	---	---
Mac Conkey	---	---	---
TSA	---	- Amarillas (blanquecinas) y muy pequeñas → Gram +, cocos en racimos.	+

Tabla 2. Recuento y descripción de las colonias aisladas del tomate cherry perteneciente al lote 1 (alimentos ecológicos) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

De la patata ecológica se seleccionaron para su posterior identificación presuntas bacterias lácticas (obtenidas por crecimiento en MRS), enterobacterias (crecimiento en Mac Conkey) y también, presuntos estafilococos (crecimiento en V-J). Fue detectado también el crecimiento de levaduras en el medio V-J, en MRS y también en TSA. Además, en el medio TSA se obtuvo un recuento del orden de 10^5 UFC/ml (Tabla 3).

A partir del puerro ecológico se obtuvo crecimiento en los medios MRS, V-J y Mac Conkey. Además, hubo recuento significativo de colonias en el medio de Mac

Conkey del orden de 10^2 UFC/ml, y también en el medio de TSA del orden de 10^3 UFC/ml (Tabla 4).

Del pimiento verde ecológico no se obtuvieron recuentos significativos. De este alimento se seleccionaron cepas de los medios MRS, V-J y también cepas del medio TSA (Tabla 5). Además de encontrarse crecimiento bacteriano en el medio de cultivo de TSA, se observó también crecimiento de levaduras.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAA	---	---	---
MRSA	---	- Blanca y pequeña → Gram +, bacilos de tamaño exagerado con “gránulos” dentro de ellos. - Muy blanca y pequeña → Gram +, bacilos. - Blanca/transparente y pequeña → Gram +, bacilos.	- - -
Vogel-Johnson	---	- Rosa y pequeña → Gram +, bacilos cortos - Blanca y pequeña → Gram +, coco-bacilos separados. - Amarilla y pequeña → Gram +, morfología típica de micrococos.	+ + +
Mac Conkey	---	- Rosa con halo amarillo alrededor y pequeña → Gram -, bacilos cortos.	+
TSA	1.23×10^5	- Medio amarillas-blancas y pequeñas. - Blancas y pequeñas. - Blanquecinas y pequeñas. - Amarillas y pequeñas. - Transparentes y pequeñas.	

Tabla 3. Recuento y descripción de las colonias aisladas de la patata perteneciente al lote 1 (alimentos ecológicos) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

Del ajo ecológico sólo pudimos hacer recuento significativo en el medio TSA obteniendo 4.9×10^2 UFC/ml. Las cepas que se seleccionaron para su posterior identificación fueron presuntos estafilococos y también bacterias crecidas en el medio de TSA (Tabla 6). Además, hubo crecimiento de una levadura de gran tamaño en TSA.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	-Blanca y pequeña → Gram +, cocos en cadenas.	+
Vogel-Johnson	---	-Blancas y pequeñas → Gram +, cocos separados. -Muy blanca y muy pequeña → Gram +, cocos separados. -Transparentes y pequeñas → Gram +, bacilos muy cortos.	+
Mac Conkey	3.5×10^2	-Rosa muy pequeñas (como puntos) y halo blanquecino alrededor, y alrededor de este, otro halo amarillo → Gram -, bacilos cortos. -Rosas muy pequeñas (como puntos) y viraje leve alrededor → Gram -, bacilos muy cortos.	+
TSA	3.2×10^3	-Blanquecinas y pequeñas. -Amarillas y pequeñas. -Amarillas/blanquecinas y pequeñas. -Transparentes y pequeñas.	

Tabla 4. Recuento y descripción de las colonias aisladas del puerro perteneciente al lote 1 (alimentos ecológicos) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	-Blancas y pequeñas → Gram +, cocos en racimos.	+
Vogel-Johnson	---	-Blanca muy pequeñas → Gram +, cocos en racimos; presuntos Staphylococos.	+
Mac Conkey	---	---	---
TSA	---	-Amarillas y pequeñitas → Gram -, cocos separados. -Blancas y pequeñas → Gram +, cocos en racimos.	+

Tabla 5. Recuento y descripción de las colonias aisladas del pimiento verde perteneciente al lote 1 (alimentos ecológicos) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAA	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	---	-Muy blanca y muy pequeña → Gram +, cocos dispuestos en racimos. -Blanca y pequeña → Gram +, coco-bacilos dispuestos de forma separada.	+ +
Mac Conkey	---	---	---
TSA	4.9×10^2	-Amarillas y pequeñas → Gram -, coco-bacilos dispuestos de forma separada. -Blancas y pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada.	+ +

Tabla 6. Recuento y descripción de las colonias aisladas del ajo perteneciente al lote 1 (alimentos ecológicos) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

6.1.2. Alimentos vegetales adquiridos mediante venta “a granel”

Con respecto al tomate cherry perteneciente al lote de alimentos “a granel” se seleccionaron presuntas bacterias lácticas y se observó la morfología de las cepas crecidas en el medio TSA (Tabla 7). Además, se encontró crecimiento de levaduras tanto en el medio de cultivo de TSA como en el de V-J, si bien su número no fue significativo.

De la patata obtenida del lote de alimentos “a granel” se obtuvo una elevada carga bacteriana. Se obtuvieron recuentos significativos en KAA (2.25×10^3 UFC/ml), en MRS (9.6×10^2 UFC/ml), en Mac Conkey (2.11×10^4 UFC/ml) y en TSA (9.4×10^6 UFC/ml). Se seleccionaron presuntos enterococos, estafilococos, enterobacterias y bacterias lácticas (Tabla 8). También, se encontró crecimiento de levaduras en TSA, en V-J y en MRSA. Además, en V-J hubo un crecimiento invasivo bacteriano (>300 colonias).

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAA	---	---	---
MRSA	---	-Blanca y pequeñísima → Gram +, cocos dispuestos de forma separada.	+
Vogel-Johnson	---	---	---
Mac Conkey	---	---	---
TSA	---	-Blancas y pequeñas	---

Tabla 7. Recuento y descripción de las colonias aisladas del tomate cherry perteneciente al lote 2 (alimentos “a granel”) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

En el caso del puerro obtenido del lote “a granel” se observó igualmente una elevada carga bacteriana. Se seleccionaron colonias de todos los medios de cultivo empleados, por lo que realizamos la identificación de presuntos enterococos, estafilococos, enterobacterias y bacterias lácticas. Además, tanto en V-J como en Mac Conkey se obtuvo un recuento del orden de 10^4 UFC/ml y en TSA obtuvimos 1.14×10^6 UFC/ml (Tabla 9). También se encontró crecimiento de levaduras tanto en TSA como en V-J.

Las colonias seleccionadas procedentes del pimiento verde del lote de alimentos “a granel”, fueron presuntos estafilococos, y también bacterias crecidas en TSA. En el medio V-J se obtuvo un recuento del orden de 10^2 UFC/ml igual que para el medio TSA (Tabla 10). Además, en ambos medios se encontraron levaduras.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAA	2.25×10^3	-Blancas/transparentes con halo negro alrededor y muy pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada; presuntos enterococos. -Blancas/transparentes y pequeñas → Gram+, cocos dispuestos de forma separada; presuntos enterococos.	- -
MRSA	9.6×10^2	-Blanca y pequeña → Gram +, cocos separados. -Amarillenta y algo más grande que la anterior → Gram +, cocos con formación de racimos enlazados, como formando un biofilm, y también hay parejas de cocos libres.	+ +
Vogel-Johnson	---	-Blancas y muy pequeñas → Gram +, cocos formando como un entramado y otros en formación de racimos. -Amarillentas y muy pequeñas → Gram +, algunos cocos separados y otros formando cadenas cortas.	+ +
Mac Conkey	2.11×10^4	-Rosadas/transparentes y muy pequeñas → Gram -, coco-bacilos dispuesto de forma separada.	+
TSA	9.4×10^6	-Blancas y pequeñas. -Amarillentas y pequeñas. -Amarillas y pequeñas. -Transparentes y pequeñas. -Blancas y pequeñas. -Blancas y medianas.	

Tabla 8. Recuento y descripción de las colonias aisladas de la patata perteneciente al lote 2 (alimentos “a granel”) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	-Transparentes y muy pequeñas con halo negro alrededor → Gram +, cocos formando racimos.	-
MRSA	---	-Blanca y muy pequeña → Gram +, cocos formando racimos.	+
Vogel-Johnson	1.6×10^4	-Blanquecinas y pequeñas → Gram +, bacilos cortos dispuestos de forma separada.	+
Mac Conkey	1.2×10^4	-Blanquecinas y pequeñas → Gram -, bacilos cortos dispuestos de forma separada.	+
TSA	1.14×10^6	-Colonias de color amarillo intenso y pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada. -Amarillas y pequeñas → Gram -, bacilos cortos dispuestos de forma separada.	+ +

Tabla 9. Recuento y descripción de las colonias aisladas del puerro perteneciente al lote 2 (alimentos “a granel”) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	4.5×10^2	-Blanquitas y muy pequeñas → Gram +, bacilos con forma de palillo de tambor.	+
Mac Conkey	---	---	---
TSA	8.5×10^2	-Blancas y pequeñas → Gram -, coco-bacilos separados.	+

Tabla 10. Recuento y descripción de las colonias aisladas del pimiento verde perteneciente al lote 2 (alimentos “a granel”) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

Se seleccionaron colonias crecidas en los medios MRS, V-J y TSA para el caso del ajo procedente del lote de alimentos “a granel”. En medio TSA se obtuvo un recuento de 4.5×10^2 UFC/ml (Tabla 11). También se encontró crecimiento de levaduras tanto en TSA como en V-J.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	-Muy blancas y pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada.	+
Vogel-Johnson	---	-Transparentes/rositas y pequeñas → Gram +, cocos formando cadenas. -Amarillentas y pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada.	+
Mc-Conkey	---	---	---
TSA	4.5×10^2	-Amarillas y pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada.	+

Tabla 11. Recuento y descripción de las colonias aisladas del ajo perteneciente al lote 2 (alimentos “a granel”) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

6.1.3. Alimentos vegetales envasados

Para el caso del tomate cherry del lote de productos envasados, se seleccionaron colonias procedentes de los medios V-J y TSA. A la vista de los resultados de colonias obtenidos, ninguno de los recuentos fue significativo (Tabla 12). Como para el resto de lotes, también se encontró crecimiento de levaduras tanto en TSA como en V-J.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	---	-Color mate y muy pequeñas → Gram +, cocos la mayoría formando parejas.	+
Mac Conkey	---	---	---
TSA	--	-Color mate y pequeñas → Gram +, bacilos dispuestos de forma separada.	+

Tabla 12. Recuento y descripción de las colonias aisladas del tomate cherry perteneciente al lote 3 (alimentos envasados) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

De la patata perteneciente al lote de envasados, se obtuvieron recuentos significativos de los medios V-J (2.14×10^3 UFC/ml), Mac Conkey (7.2×10^2 UFC/ml) y TSA (2.59×10^4 UFC/ml) (Tabla 13). Se seleccionaron colonias de ambos medios selectivos para su estudio posterior. Una vez más, hubo crecimiento de levaduras en TSA y en V-J.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	2.14×10^3	-Blanca y pequeña → Gram +, cocos formando racimos. -Anaranjada y pequeñas → Gram +, coco-bacilos con formación separada.	+ +
Mac Conkey	7.2×10^2	-Rosas oscuras con halo blanquecino/transparente alrededor → Gram -, coco-bacilos con formación separada.	+
TSA	2.59×10^4	- Blancas y pequeñas. - Blancas y muy pequeñas. - Amarillas y pequeñas.	

Tabla 13. Recuento y descripción de las colonias aisladas de la patata perteneciente al lote 3 (alimentos envasados) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

Del puerro perteneciente al lote de productos envasados, se obtuvieron recuentos significativos de los medios V-J (del orden de 10^3 UFC/ml), Mac Conkey (del orden de 10^3 UFC/ml) y TSA (del orden de 10^3 UFC/ml). Se seleccionaron colonias de ambos medios selectivos (Tabla 14). De nuevo, hubo crecimiento de levaduras en TSA y en V-J.

Del pimiento verde perteneciente al lote de productos envasados, no se obtuvieron valores significativos en los recuentos realizados de los medios. Se seleccionaron colonias de los medios V-J y TSA, por lo tanto, encontrando en este alimento presuntos estafilococos entre otros (Tabla 15). En TSA también hubo crecimiento de levaduras.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
CAA	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	3.32×10^3	-Rosa claro y pequeña → Gram +, bacilos cortos dispuestos de forma separada	+
Mac Conkey	1.62×10^3	- Rosas oscuras con halo alrededor de color mate y alrededor de éste, otro halo más grande transparente → Gram -, cocos dispuestos de forma separada. - Rosas muy oscuras sin halo alrededor → Gram -, cocos dispuestos de forma separada.	+ +
TSA	7.7×10^3	- De color mate/blancas y pequeñas. - Amarillas y pequeñas. - De color mate y pequeñas. - Blancas y pequeñas.	

Tabla 14. Recuento y descripción de las colonias aisladas del puerro perteneciente al lote 3 (alimentos envasados) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

Para el ajo perteneciente al lote de envasados, sólo se obtuvo un recuento significativo en el medio TSA (5.2×10^2 UFC/ml). Se seleccionaron colonias de los medios MRSA y TSA (Tabla 16). En TSA también hubo crecimiento de levaduras.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	---	-De color mate y pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada.	+
Mac Conkey	---	---	---
TSA	---	-Blanca y pequeña → Gram +, cocos todos agrupados, no hay ninguno separado. -Amarillenta con aspecto mucosa y grande → Gram +, cocos agrupados (en parejas, tétradas,...)	+ +

Tabla 15. Recuento y descripción de las colonias aisladas del pimiento verde perteneciente al lote 3 (alimentos envasados) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	---	-Blanca y pequeña → Gram +, cocos formando agrupaciones (en parejas muchos de ellos, otros en tétradas,...); parece como si todas las agrupaciones de cocos estuvieran enlazadas a otras.	+
Vogel-Johnson	---	---	---
Mac Conkey	---	---	---
TSA	5.2x10 ²	- De color mate y pequeñas → Gram +, cocos formando racimos.	+

Tabla 16. Recuento y descripción de las colonias aisladas de ajo perteneciente al lote 3 (alimentos envasados) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

6.1.4. Alimentos vegetales obtenidos de huerta particular

En la patata obtenida de una huerta familiar, también se encontró una elevada carga bacteriana. Se seleccionaron cepas de los medios MRSA (presuntas bacterias lácticas), V-J (presuntos estafilococos) y TSA. En el medio MRSA se obtuvo un recuento de colonias de 3×10^2 UFC/ml, en el de V-J, de 7.3×10^4 UFC/ml y en el de TSA, de 6×10^3 UFC/ml (Tabla 17). También se encontró un elevado número de levaduras en el medio de TSA, de V-J y aunque en menor medida, en MRSA.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAA	---	-Transparentes y muy pequeñas con halo negro alrededor de ellas → Gram +, cocos la mayoría formando parejas.	-
MRSA	3×10^2	-Blanca y muy pequeña → Gram +, cocos agrupados en racimos.	+
Vogel-Johnson	7.3×10^4	-Blancas por el centro y los bordes de éstas de color rosado y pequeñas → Gram +, bacilos. -Blanca con aspecto viscoso y pequeña → Gram +, bacilos cortos.	+
Mac Conkey	---	-Rosa y pequeña → Gram -, coco-bacilos (bacilos muy cortos)	-
TSA	6×10^3	- Blancas y pequeñas - De color mate y pequeñas - Amarillas y pequeñas - Blancas con aspecto viscoso y pequeñas - Blancas y muy pequeñas	---

Tabla 17. Recuento y descripción de las colonias aisladas de patata perteneciente al lote 4 (alimentos de huerta) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

En el caso del puerro obtenido de una huerta familiar, se obtuvieron recuentos significativos sólo en los medios MRSA y TSA, obteniéndose respectivamente 1.35×10^4 y 5.8×10^6 UFC/ml. Se seleccionaron presuntas bacterias lácticas y presuntas enterobacterias (Tabla 18). Además, se encontró un elevado número de levaduras en TSA y en V-J. En el medio Mac Conkey y V-J, además de crecer

levaduras, también hubo un crecimiento invasivo que impedía distinguir las diferentes morfologías de las distintas colonias que crecieron.

Y para el caso del ajo obtenido de una huerta familiar, no se han encontrado recuentos significativos en ninguno de los medios empleados. Las colonias fueron seleccionadas de los medios V-J y TSA, obteniéndose por lo tanto, presuntos estafilococos entre otros (Tabla 19). Una vez más, se encontró crecimiento de levaduras en el medio de TSA.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
KAAs	---	---	---
MRSA	1.35x10 ⁴	-Muy blancas y muy pequeñas →Gram +, cocos formando racimos. -Blancas y muy pequeñas →Gram +, cocos formando agrupaciones muy separadas las unas de las otras y de distintas morfologías. -De color mate y muy pequeñas →Gram +, cocos agrupados en forma de racimos.	- - -
Vogel-Johnson	---	---	---
Mac Conkey	---	-Amarillas y pequeñas → Gram -, cocos agrupados en racimos. - El centro de las colonias es de color rosa muy oscuro y tienen el borde de color rosa más claro, y de tamaño son pequeñas →Gram -, coco-bacilos dispuestos de forma separada.	+ +
TSA	5.8x10 ⁶	-Amarillas y muy pequeñas. -Blancas y muy pequeñas. -De color mate y muy pequeñas. -Amarillas de tamaño mediano. -Blancas/de color mate y muy pequeñas. -Blancas/de color mate y pequeñas.	---

Tabla 18. Recuento y descripción de las colonias aisladas de puerro perteneciente al lote 4 (alimentos de huerta) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

MEDIO DE CULTIVO	UFC/ml	MORFOLOGÍA Y GRAM	CATALASA
CAA	---	---	---
MRSA	---	---	---
Vogel-Johnson	---	-Muy blanca o casi rosada y muy pequeña → Gram +, cocos con perfecta agrupación en racimos.	+
Mac Conkey	---	---	---
TSA	---	-Blancas y pequeñas → Gram +, cocos dispuestos de forma separada.	+

Tabla 19. Recuento y descripción de las colonias aisladas de ajo perteneciente al lote 4 (alimentos de huerta) en cada uno de los 5 medios, junto con su identificación presuntiva mediante la prueba de la catalasa y la tinción de Gram.

6.2. Estudio comparativo de carga microbiana en los lotes estudiados

Para el caso de la muestra de tomate cherry, no hubo recuentos significativos en ninguno de los medios de cultivo y para ninguno de los lotes de alimentos utilizados, por lo tanto, no se han podido detectar diferencias significativas entre ellos para este alimento.

En el caso de la patata, los resultados indican que donde se encuentra mayor carga bacteriana es en patatas procedentes de un lote de éstas “a granel”. Esto se observa principalmente en el medio TSA (9.4×10^7 UFC/ml). La patata de huerta es en segundo lugar la que presentó mayor carga bacteriana. Esto se refleja en los medios V-J con recuento del orden de 10^4 UFC/ml y TSA con recuento del orden de 10^4 UFC/ml.

Para las muestras de puerro, el lote que mayor carga bacteriana presenta también es el de alimentos “a granel”. En TSA es en el medio que mayor número de colonias crecieron (1.14×10^8 UFC/ml). Como en V-J y en Mac Conkey también hubo recuentos significativos, en este puerro del lote “a granel” podrían encontrarse presuntos estafilococos y enterobacterias. El segundo lote con mayor carga bacteriana procedente de puerro sería el de huerta, principalmente encontrándose

bacterias lácticas porque en MRSA hubo un recuento de colonias de 1.35×10^5 UFC/ml.

Observando el crecimiento de colonias procedentes del pimiento verde a partir de alimentos de los diferentes lotes, vemos una vez más, que donde hay una mayor carga bacteriana es en el lote “a granel”, tanto en el medio TSA (8.5×10^3 UFC/ml) como en el medio V-J (4.5×10^3 UFC/ml), pudiendo así decir, que se podrían encontrar presuntos estafilococos principalmente entre otros.

Para acabar con esta parte de resultados, en el caso de la muestra de ajo sólo se obtuvieron recuentos significativos para el medio de TSA de todos los lotes menos para el de huerta. Esta vez, será el ajo ecológico el que mayor carga bacteriana presente frente al resto de lotes.

6.3. Resistencia a biocidas en bacterias aisladas de los alimentos vegetales pertenecientes a los distintos lotes de productos

El tercer objetivo del presente trabajo fue determinar la resistencia frente a biocidas de empleo habitual en la industria alimentaria de microorganismos pertenecientes a cada uno de los lotes analizados.

Para cada biocida se comprobó el efecto que producía en el crecimiento de 11 cepas procedentes de alimentos vegetales ecológicos, 14 cepas del lote de alimentos “a granel”, 10 cepas de vegetales envasados y 7 cepas que provenían de alimentos vegetales de huerta. Para averiguar a qué concentración del biocida las colonias presentan mayor resistencia y cuál será la CMI para cada cepa se utilizaron, como ya anteriormente se indicó, 3 concentraciones de cada biocida, que fueron 0'1 %, 0'01 % y 0'001 %.

El primer biocida frente al que se evaluó la resistencia de las cepas bacterianas aisladas de los diferentes lotes, fue el cloruro de benzalconio. Alrededor de un 85% de cepas aisladas de alimentos de huerta, tienen una CMI de 0,01%, al igual que el 60% de cepas aisladas de alimentos envasados. En cuanto a las cepas aisladas de alimentos “a granel”, algo más de un 40% de ellas tienen una CMI > 0,1% y un porcentaje similar presentó una CMI de 0,01%. Y para aproximadamente

un 45% de cepas aisladas de los alimentos ecológicos, la CMI es 0,001%, seguidas por porcentajes cercanos al 30% que presentaron CMIs de 0,01 y 0,1% (Figura 8).

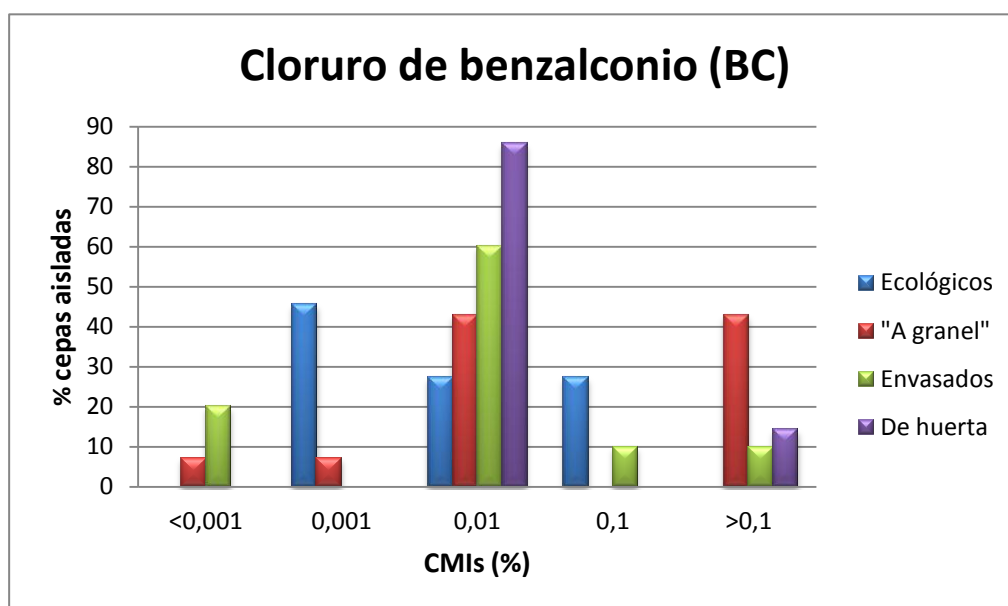


Figura 8. CMIs frente a cloruro de benzalconio (BC) de microorganismos aislados en los distintos tipos de alimentos de cada uno de los lotes empleados.

En el caso del segundo biocida, la cetrimida, frente al que se evaluó la resistencia de las cepas bacterianas aisladas de los diferentes lotes, los resultados obtenidos fueron los siguientes: alrededor de un 70% de las cepas procedentes de alimentos de huerta y casi un 60% de colonias obtenidas de alimentos “a granel” tienen una CMI > 0,1%. Mientras que un 60% de bacterias aisladas de cepas de alimentos envasados, la resistencia frente a este biocida fue intermedia, con CMI de 0,01%. Para las cepas aisladas de alimentos ecológicos, las CMI fueron más variables, con casi un 30% de las mismas repartidas en los grupos con CMI de 0,001%, de 0,01% y >0,1% (Figura 9).

Con respecto al último biocida empleado, el cloruro de hexadecil piridinio, se obtuvieron un 80% de cepas aisladas de alimentos envasados con una CMI de 0,01%. Por otro lado, para las cepas aisladas de los alimentos “a granel”, alrededor de un 65% de ellas presentaron una CMI > 0,1%. Para cerca del 60% de cepas procedentes de alimentos de huerta, la CMI encontrada fue también mayor a 0,1%. Finalmente, para las bacterias aisladas de alimentos ecológicos, de nuevo se

distribuyeron entre CMI elevadas, muy bajas e intermedias. Una vez más, la mayoría de las cepas procedentes de los alimentos de huerta y de venta “a granel” presentaban CMIs más altas que los otros dos grupos de alimentos. Un elevado número de cepas de alimentos envasados tenían principalmente CMIs intermedias. Y de nuevo, las CMIs que presentaban las cepas procedentes de alimentos ecológicos, eran muy variadas: altas, bajas e intermedias distribuidas de forma equitativa entre las cepas de este lote (Figura 10).

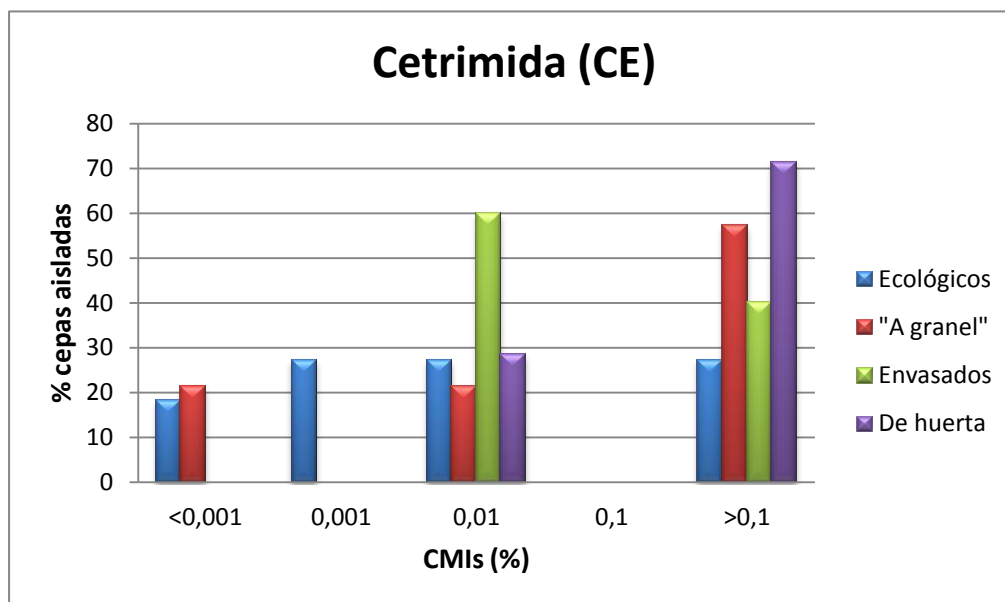


Figura 9. CMIs frente a cetrimida (CE) de microorganismos aislados en los distintos tipos de alimentos de cada uno de los lotes empleados.

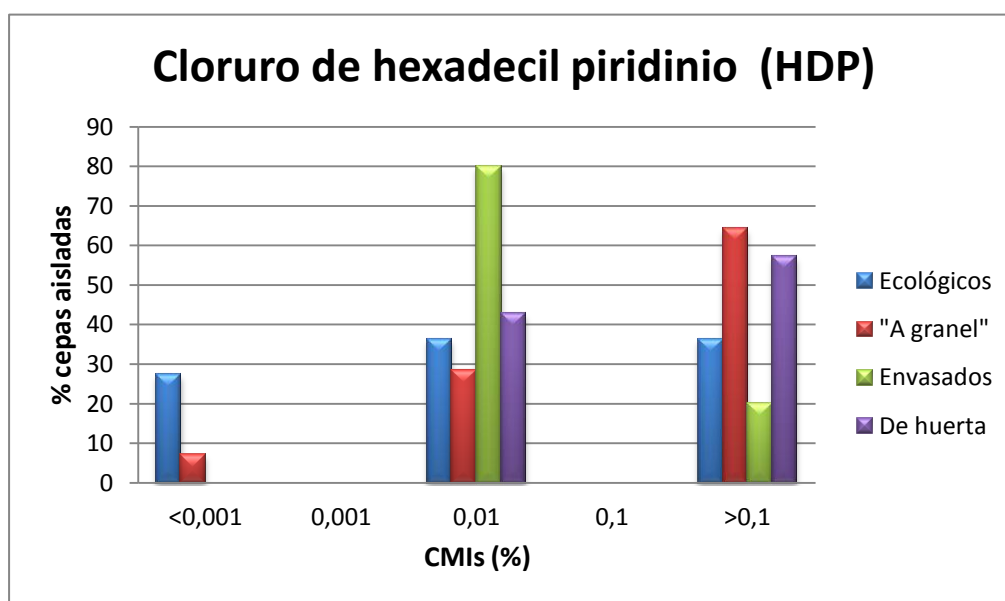


Figura 10. CMIs frente a cloruro de hexadecil piridinio (HDP) de microorganismos aislados en los distintos tipos de alimentos de cada uno de los lotes empleados.

7. DISCUSIÓN

En la revisión bibliográfica que hemos realizado, no se han encontrado estudios previos que realicen un estudio comparativo entre la carga microbiana de diferentes alimentos vegetales obtenidos de distintos métodos de producción y venta al consumidor, por lo que nuestro estudio, parece ser el primero en abordar dicha comparativa.

Nuestros resultados indican que donde existe mayor carga bacteriana es en los alimentos procedentes de la venta “a granel” y en segundo lugar, de los productos procedentes de huerta. Estudios previos indican que los productos obtenidos de un ambiente natural, y sin el uso de tratamientos químicos, no cabe esperar que estén exentos de agentes microbianos (Sagoo *et al.*, 2003). Por ejemplo, es común que las verduras crudas presenten un elevado nivel de enterobacterias, ya que suelen formar parte de su microbiota normal (Little *et al.*, 1999), lo que se corrobora con nuestros resultados. También es de destacar en nuestro estudio que la menor carga bacteriana se obtuvo en los alimentos de procedencia ecológica, exceptuando el ajo.

Más detalladamente, nuestros resultados indican que, exceptuando el tomate para el cual no se obtuvieron recuentos significativos en ningún lote de alimentos y, por lo tanto no se pueden evidenciar diferencias significativas, para la patata, el puerro y el pimiento verde, se obtuvieron recuentos bacterianos muy superiores en alimentos vendidos “a granel”, comparados con los que se comercializan ya envasados. Este resultado es coherente si tenemos en cuenta el uso frecuente de biocidas en muchos de los envases que se emplean en la industria alimentaria para prolongar la vida útil del alimento, lo que provoca una disminución de la viabilidad bacteriana en su superficie. En cuanto a los alimentos de huerta, en nuestro caso sólo fueron tratados con agua de regadío y estiércol para fertilizar, lo que también explica la elevada carga microbiana observada en estos productos.

En cuanto al ajo, desde antiguo son conocidas sus propiedades antimicrobianas y estudios recientes describen su empleo como terapia natural, frente al impétigo, provocado por el género *Staphylococcus*, con buenos resultados, al igual que el aceite de árbol de té, aceites de coco, oliva y miel de abeja, que han sido anecdóticamente exitosos, si bien carecen de un fundamento científico sólido que permita su empleo en terapéutica (Hartman-Adams *et al.*, 2014). En nuestro

estudio se obtuvieron recuentos bajos de bacterias en el ajo, probablemente asociadas a su superficie por contaminación de la tierra de cultivo.

Según un estudio reciente realizado por Fernández-Fuentes *et al.* (2012) se demuestra que la mayoría de los aislados de cepas bacterianas procedentes de productos ecológicos fueron, por lo general, sensibles a bajas concentraciones de biocidas como el triclosán, el cloruro de hexadecil piridinio, la clorhexidina y la cetrimida. En nuestro estudio, hemos encontrado cepas distribuidas de forma equitativa entre los grupos de elevada resistencia, elevada sensibilidad o sensibilidad intermedia y para los tres biocidas analizados.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la mayoría de las cepas aisladas de alimentos de huerta presentan una resistencia muy elevada (CMI > 0,1%). frente a la cetrimida y al cloruro de hexadecil piridinio. Por el contrario, dichas cepas presentan una resistencia intermedia frente al cloruro de benzalconio, (CMI=0,01%). En el caso de la mayoría de cepas procedentes de productos envasados, se obtuvo una resistencia intermedia frente a los tres biocidas. Con respecto a la cepas aisladas de alimentos de venta “a granel”, se distribuyen más o menos de forma equitativa presentando resistencia intermedia y muy elevada frente a los tres biocidas.

8. CONCLUSIONES

1. Los mayores recuentos bacterianos se obtuvieron en los lotes de los alimentos vegetales procedentes de la venta “a granel” y en los de huerta, seguidos de los alimentos envasados. El lote de productos ecológicos presentó la menor carga bacteriana detectada.
2. La mayoría de las cepas bacterianas aisladas de los medios selectivos, presentaron una morfología, tipo de pared celular y una actividad catalasa, coherentes con el crecimiento bacteriano que cabe esperar en cada uno de dichos medios.
3. Las cepas aisladas de alimentos procedentes de venta “a granel” y de huerta presentan una elevada resistencia a cetrimida y cloruro de hexadecil

piridinio, mientras que su resistencia a cloruro de benzalconio es algo más moderada, si bien se mantiene por encima de los otros lotes de productos vegetales.

4. Las bacterias procedentes de productos envasados presentan sensibilidad intermedia a cetrimida y cloruro de hexadecil piridinio, si bien frente a cetrimida se detecta un 40% de las cepas con elevada tolerancia frente a este biocida.
5. Las cepas procedentes de productos ecológicos presentaron una distribución homogénea entre los distintos perfiles de resistencia frente a los tres biocidas ensayados

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M., Knochel, S., Hasman, H., 2007. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* from food products. *Foodborne Pathogens and Disease* 4: 216–221.
- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., Rorvik, L.M., 2000. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 62: 57–63.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I., 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123: 121-129.
- Abdel Malek, S.M., Badran, Y. R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adapted to 2-phenoxyethanol shows cross-resistance to dissimilar biocides and increased susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiologica* 55(6): 588-592.
- Beuchat, L.R., 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59: 204–216.
- Bjorland, J., Sunde, M., Waage, S., 2001. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3999–4004.

- Bjorland, J., Steinum, T., Sunde, M., Waage, S., Heir, E., 2003. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3046–3052.
- Braoudaki, M., Hilton, A. C., 2004. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology* 42(1): 73-78.
- Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K. A., Walsh, C., Burgess, C., Fanning, S., 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 78(9): 3087-3097.
- Christensen, E.G., Gram, L., Kastbjerg, V.G., 2011. Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 4064–4071.
- Fàbrega, A., Vila, J., 2013. *Salmonella* enteric serovar *Typhimurium* skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Review* 26(2): 308-341.
- FDA (Food and Drug Administration, USA), 2001. FDA Survey of imported fresh produce. URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodsur6.html>.
- FDA (Food and Drug Administration, USA), 2003. FDA Survey of domestic fresh produce. URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodsu10.html>.
- FEHD (Food and Environmental Hygiene Department, HKSAR), 2002. Microbiological risk assessment on salads in Hong Kong. Risk Assessment Studies, Report n°9. URL: <http://fehd.gov.hk/safefood/report/salad/report.pdf>.
- Fernández-Fuentes, M. A., Ortega, E., Abriouel, H., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., 2012. Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics. *Food Control* 26: 73-78.
- Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106: 1–24.
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47: 1–24.

- Franz, C.M., Huch, M., Mathara, J. M., Abriouel, H., Benomar, N., Reid, G., Galvez, A., Holzapfel, W.H., 2014. African fermented foods and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 190: 84-96.
- Garcia-Villanova, B., Cueto-Espinas, A., Bolonos, M.J., 1987a. A comparative study of *Salmonella* isolated from irrigation waters, vegetables and human infections. *Epidemiology and Infection* 98: 271-276.
- Garcia-Villanova, B., Galvez-Vargas, R., Garcia-Villanova, R., 1987b. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. *International Journal of Food Microbiology* 4: 285-291.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E., Suzzi, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* 64: 105–117.
- Giraffa, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 744: 1–9.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215–222.
- Gould, I.M., David, M.Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T., Peters, G., 2012. New insights into meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39: 96–104.
- Hartman-Adams, H., Banvard, C., Juckett, G., 2014. Impetigo: diagnosis and treatment. *American Family Physician* 90(4): 229-235.
- Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L., 1995. Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 149–156.
- Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L., 1999a. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. *International Journal of Food Microbiology* 48: 211–219.
- Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L., 1999b. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal of Applied Microbiology* 86: 378–388.

- Heir, H., Lindstedt, B.A., Røtterud, O.J., Vardund, T., Kapperud, G., Nesbakken, T., 2004. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology* 96: 85–96.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 223–233.
- Johannessen, G.S., Loncarevic, S., Kruse, H., 2002. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology* 77: 199-204.
- Johnston, L.M., Jaykus, L., Moll, D., Martinez, M., Anciso, J., Mora, B., Moe, C., 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection* 68: 1840-1847.
- Kayser, F.H., 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology* 88: 255–262.
- Langsrud, S., Sidhu, M., Heir E., Holck, A., 2003. Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51: 283–290.
- Lemaitre, J.P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Divies, C., Rousset, A., 1998. Plasmidmediated resistance to antimicrobial agents among *Listeriae*. *Journal of Food Protection* 61: 1459–1464.
- Little, C.L., Roberts, D., Youngs, E., de Louvouis, J., 1999. Microbiological quality of retail imported unprepared whole lettuce. A PHLS food working group study. *Journal of Food Protection* 62: 325–328.
- Matthews, K. R., 2006. Los microorganismos asociados a las frutas y las verduras. En: *Microbiología de las frutas y las verduras frescas*. Matthews, K. R. (ed.). Acribia S. A., Zaragoza, España. pp. 2-9.
- McMahon, M.A.S., Wilson, I.G., 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70: 155–162.
- Mossel, D.A.A., Buker, P.G.M., Eldering, J., 1978. Streptokokken der Lancefield Gruppe D in Lebensmitteln und Trinkwasser. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene* 29: 121-127.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., Diez-Gonzalez, F., 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in organic

- and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection* 67: 894–900.
- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A.T., Buesing, K.M., Diez-Gonzalez, F., 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. *Journal of Food Protection* 69: 1928–1936.
 - Murray, B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 3: 46–65.
 - Nguyen-the, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 371–401.
 - Ortega, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande, M.J., Abriouel, H., Pérez, R., Gálvez, A., 2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 162: 13-25.
 - Reglamento de Ejecución (UE) nº 88/2014 de la Comisión, de 31 de enero de 2014, por el que se especifica un procedimiento para la modificación del anexo I del Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al uso y comercialización de los biocidas.
 - Romanova, N.A., Wolffs, P.F., Brovko, L.Y., Griffiths, M.W., 2006. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3498–3503.
 - Sagoo, S.K., Little, C.L., Ward, L., Gillespie, I.A., Mitchell, R.T., 2003. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection* 66: 403–409.
 - Salleh, N.A., Rusul, G., Hassan, Z., Reezal, A., Isa, S.H., Nishibuchi, M., Radu, S., 2003. Incidence of *Salmonella* spp. in raw vegetables in Selangor, Malaysia. *Food Control* 14: 475-479.
 - Shahnazi, M., Jafari-Sabet, M., 2010. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in villages of Qazvin Province, Iran. *Foodborne Pathogens and Disease* 7(9): 1025-1030.
 - Sidhu, M.S., Heir, E., Sorum, H., Holck, A., 2001. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β -lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *Microbial Drug Resistance* 7: 363–371.

- Sobieralski, K., Siwulski, M., Sas-Golak, I., 2013. Nutritive and health-promoting value of organic vegetables. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 12(1): 113-123.
- To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W., 2002. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5258–5264.
- Tournas, V.H., 2005. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology* 99: 71–77.
- Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L., 2006. Moulds and yeast in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology* 23: 684–688.

10. PÁGINAS WEB

<http://es.slideshare.net/Cynthia0609/principales-microorganismos-patogenos>

<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1109/1126>

<http://www.juntadeandalucia.es/boja/2007/122/1>

<http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/biocidas/>

<http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/282978-BIOCIDAS.pdf>

<http://www.productos-ecologicos.com/>

<http://www.who.int/drugresistance/es/>