



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS VEGETALES

**Alumno: María José García López**

**Junio, 2019**



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS VEGETALES

Alumno: **María José García López**

**Junio, 2019**

# Índice

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumen.....                                                                       | 3  |
| 2. Introducción.....                                                                  | 4  |
| 2.1 Contaminación de los alimentos vegetales.....                                     | 6  |
| 2.2 Microorganismos patógenos emergentes de los alimentos.....                        | 8  |
| 2.3 Prevención y control de microorganismos patógenos presentes en los alimentos..... | 10 |
| 3. Objetivos.....                                                                     | 14 |
| 4. Material y métodos.....                                                            | 14 |
| 5. Resultados.....                                                                    | 22 |
| 5.1 Resultados obtenidos en el recuento microbiano.....                               | 22 |
| 5.2 Identificación de las colonias.....                                               | 27 |
| 5.3 Representación gráfica.....                                                       | 33 |
| 6. Discusión.....                                                                     | 35 |
| 7. Conclusiones.....                                                                  | 36 |
| 8. Bibliografía.....                                                                  | 37 |

## 1. RESUMEN.

En los últimos años se ha detectado un mayor número de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas, la información disponible muestra que es un problema que crece en importancia. Comprender la complejidad del problema de la contaminación microbiana de los vegetales y tener conciencia de su importancia es el primer paso para lograr una alta calidad en los productos hortícolas. El reciente desarrollo de técnicas bioquímicas, inmunológicas y genéticas más sensibles y eficaces para el aislamiento e identificación de microorganismos, ha jugado un papel importante en la identificación y cuantificación de microorganismos responsables de contaminación y toxiinfecciones alimentarias (TIA). En el presente estudio se realiza un análisis microbiológico de 10 alimentos vegetales, en concreto fresa, perejil, espinacas, col rizada, brotes tiernos procedentes de una bolsa de ensalada, pimiento verde, calabacín, puerro, berenjena y zanahoria, en el que se trata de determinar su carga microbiana y realizar un análisis morfológico a nivel macroscópico de las colonias.

**Palabras clave:** Alimentos vegetales, frutas, hortalizas, recuento microbiano, toxiinfecciones alimentarias.

### **Abstract:**

In recent years, a greater number of diseases transmitted by fruits and vegetables have been detected, the available information shows that it is a problem that grows in importance. Understanding the complexity of the problem of microbial contamination of vegetables and being aware of their importance is the first step to achieve high quality horticultural products. The recent development of more sensitive and effective biochemical, immunological and genetic techniques for the isolation and identification of microorganisms has played an important role in the identification and quantification of microorganisms responsible for contamination and food toxicity (TIA). In the present study, a microbiological analysis of 10 plant foods, namely strawberry, parsley, spinach, kale, tender shoots from a bag of salad, green pepper, zucchini, leek, eggplant and carrot, is carried out. to determine their microbial load and perform a morphological analysis at the macroscopic level of the colonies.

**Key words:** Vegetable foods, fruits, vegetables, microbial count, food toxin infections.

## 2. INTRODUCCIÓN.

El hombre consume productos alimenticios para obtener la energía y los nutrientes necesarios para subsistir. Los vegetales, las hortalizas y las frutas siempre han sido utilizadas y su selección depende, además de los nutrientes que aportan, de los atractivos colores y sabores que presentan. Las frutas y hortalizas constituyen, junto a otros grupos de alimentos, la esencia de lo que entendemos por dieta mediterránea (Cámara *et al.*, 2008)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) confirma, la existencia de numerosas evidencias que relacionan el consumo de frutas y verduras con un buen estado de salud y la prevención del desarrollo de ciertas enfermedades. De esta manera, la FAO/OMS recomienda un consumo diario de al menos 400 g de frutas y verduras para prevenir enfermedades crónicas, en especial las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo II, el cáncer y la obesidad. Así, se garantiza el aporte adecuado en micronutrientes, fibra y otras sustancias beneficiosas para nuestro organismo.

Según el Código Alimentario Español (1991), define las frutas, como “frutos infrutescencias o partes carnosas de órganos florales que han alcanzado un grado adecuado de madurez y son propias para el consumo humano”. Mientras que este mismo organismo define las hortalizas, como “cualquier planta herbácea hortícola en sazón que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinada”. Indica, además, que la denominación de verdura distingue a un grupo de hortalizas en las que la parte comestible está constituida por sus órganos verdes (hojas, tallos o inflorescencias) y que las legumbres frescas son los frutos y semillas no maduros de las hortalizas leguminosas. No obstante, a nivel popular, este término se utiliza indistintamente ampliando el nombre de verduras a todas las hortalizas.

A pesar de tener una composición diferente, en este grupo de alimentos se incluye también los tubérculos, que son definidos como brotes subterráneos engrosados que contienen las sustancias de reserva necesarias para que germine una nueva planta. (Vollmer *et al.*, 1999)

Las verduras y hortalizas en su composición son ricas en fibra, vitaminas y minerales a la vez que son pobres en lípidos y proteínas. En este grupo de alimentos destaca por su aporte de vitamina C y carotenos que les conceden una alta capacidad antioxidante (Aranceta y Pérez- Rodrigo., 2006)

Las interacciones mutuas entre los microorganismos con las plantas y los animales son naturales y constantes. En la naturaleza, está perfectamente comprobado el papel ecológico de los microorganismos, así como su importancia en los distintos ciclos geoquímicos. Como casi todos los alimentos que consume el hombre proceden básicamente de las plantas, de los animales o de productos derivados de los mismos, resulta comprensible que dichos alimentos puedan contener microorganismos que interaccionen con ellos. Los microorganismos en la mayoría de los casos, utilizan nuestros alimentos como fuente de nutrientes para su propio crecimiento, por lo que naturalmente, puede ocasionar su alteración. Los microorganismos pueden deteriorar un alimento porque se multiplican en él, utilizan sus nutrientes, producen modificaciones enzimáticas, y le comunican sabores desagradables mediante el desdoblamiento de determinadas sustancias o mediante la síntesis de nuevos compuestos. La alteración de los alimentos es consecuencia lógica de la actividad de los microorganismos, (Frazier y Westhoff, 1993), por lo que los alimentos pueden jugar un papel importante en la transmisión de enfermedades de origen alimentario y constituyen un problema de salud pública importante (Vanderzant and Splittstoesser, 1992). Se consideran como la mayor causa de morbilidad, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, además son causa frecuente de mortalidad en estos últimos. La magnitud del impacto socio-económico que generan estas enfermedades es difícil de medir, más aún cuando muchos casos ni siquiera son informados (Todd, 1989).

En los últimos años se ha detectado un mayor número de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas, la información disponible muestra que es un problema que crece en importancia. Los riesgos biológicos asociados a los productos hortícolas están relacionados con las malas prácticas de producción, como el empleo de agua de riego contaminada, el uso de desechos biológicos sólidos como fertilizante sin tratamiento o con tratamiento inapropiado, la presencia de animales en las áreas de cultivo, la proximidad a zonas de

acumulación de aguas albañales o sólidos orgánicos, una inadecuada higiene de las instalaciones, entre otros.

Comprender la complejidad del problema de la contaminación microbiana de los vegetales y tener conciencia de su importancia, es el primer paso para lograr una alta calidad en los productos hortícolas. A nivel actual de la tecnología no es posible eliminar el riesgo de forma total, por lo que hay que establecer medidas para reducirlo. Es preferible, más efectivo y económico prevenir la contaminación microbiana en las frutas y hortalizas que eliminarla una vez que tiene lugar.

Teniendo en cuenta, que los vegetales que se consumen crudos o mínimamente procesados, se pueden contaminar durante la producción y constituir una vía de transmisión de parásitos y bacterias patógenas para el hombre (Puig *et al.*, 2014) dado que las frutas y verduras son productos frescos, los tratamientos para reducir la población bacteriana en los productos no deben ser térmicos. Sin embargo, no hay muchos tratamientos que puedan aplicarse a los productos frescos. Por lo tanto, se ha sugerido un sistema de buenas prácticas agrícolas (BPA) para disminuir la posible contaminación de bacterias patógenas en productos frescos, a este sistema se le define como prácticas generales para mejorar la seguridad microbiana alimentaria de las frutas y hortalizas frescas en la cosecha, clasificación, cultivo, empaque y almacenamiento (De Roever, 1998).

## **2.1 Contaminación de los alimentos vegetales:**

Según Frazier y Westhoff en 1993, en la superficie de las plantas en crecimiento existe una flora microbiana típica, que se puede contaminar por el aporte de microorganismos de distinta procedencia, como puede ser la animal que desde las formas más sencillas a las más evolucionadas, aportan al suelo y al agua, sus excretas y finalmente, su propio organismo.

Otra vía de contaminación son las aguas residuales, ya que los cultivos pueden ser regados por aguas residuales domésticas sin tratar, existe la posibilidad de que los alimentos vegetales recién cosechados estén contaminados por microorganismos patógenos para el hombre, sobre todo por aquéllos que producen trastornos gastrointestinales. Las aguas residuales tratadas que van a parar al suelo o al agua también aportan microorganismos, aunque, en comparación con las aguas residuales no tratadas, generalmente tienen una menor cantidad total de microorganismos y un menor número de patógenos.

Además, las aguas naturales no sólo contienen su propia flora microbiana, sino que también contienen microorganismos procedentes del suelo (edáficos), posiblemente microorganismos procedentes de los animales y de las aguas residuales. El agua que se utiliza por tanto en los distintos tratamientos a que se someten los alimentos, debe ajustarse a los patrones bacteriológicos del agua de bebida y debe ser aceptable, tanto desde el punto de vista higiénico como desde el punto de vista económico.

También se puede producir contaminación a través del suelo, que contiene una gran variedad de microorganismos, de manera que cuando el polvo del suelo es levantado por las corrientes de aire, las partículas de tierra son arrastradas por las corrientes de agua para alcanzar el interior o la superficie de los alimentos. El suelo es una importante fuente de bacterias esporógenas termorresistentes. Aunque los actuales sistemas de tratamiento de los alimentos, suelen incluir el lavado de la superficie de estos, eliminando así gran parte de la tierra y el polvo del suelo.

El aire, aunque carece de una flora microbiana propia, ya que todos los microorganismos que contiene, han llegado a él de forma accidental y normalmente están adheridos a la superficie de partículas sólidas en suspensión o en el interior de gotitas de agua, también puede considerarse una vía de contaminación. El número de microorganismos existentes en el aire en un momento dado, depende de factores tales como la velocidad con que se desplaza, la intensidad de la luz solar, su grado de humedad, la situación geográfica, y la cantidad de partículas sólidas o líquidas que contiene en suspensión.

La contaminación natural de los alimentos, puede tener lugar antes de ser cosechados y almacenados, o bien mientras se manipulan y se someten a algún tipo de tratamiento. Otras contaminaciones pueden tener origen en el equipo que entra en contacto con los alimentos, en los materiales utilizados para envolverlos, y en el personal (Frazier y Westhoff, 1993).

Si bien la precosecha de verduras y frutas, es probablemente la principal preocupación en términos de patógenos que son transmitidos por los alimentos, también en la postcosecha hay oportunidades durante el transporte (transporte abierto, vehículos de transporte), transformación (inmersión en agua y corte o pasos de rebanado), embalaje (embalaje inadecuado, equipo de embalaje),



distribución y comercialización. Todos estos puntos tienen el potencial para contaminar cualquier tipo de vegetal con bacterias patógenas, así como seguir potenciando el crecimiento de estos microorganismos (Brackett, 1994). Todo esto es debido, en parte a las diversas y complejas formas que tienen los diferentes países e incluso dentro de un mismo país de llevar a cabo el procesamiento de frutas y verduras. Posteriormente, se procede al embalaje en el campo, se envasa entero, después de retirar las hojas exteriores y la superficie de la suciedad mediante lavado con hielo, para a continuación precortar y embolsar. Además, una vez que el producto se corta y se lava varias veces, se puede mezclar con otro producto antes de ser embolsado (Food and agriculture Organization of the United Nations world health Organization, 2008). Otros factores a tener en cuenta son, el tiempo y la temperatura de almacenamiento durante su distribución.

## **2.2 Microorganismos patógenos emergentes de los alimentos:**

El reciente desarrollo de técnicas bioquímicas, inmunológicas y genéticas más sensibles y eficaces para el aislamiento e identificación de microorganismos en los animales, alimentos y personas, han jugado un papel importante en su identificación y cuantificación de microorganismos como responsables de contaminación exógena y por tanto, de toxiinfecciones alimentarias (TIA). Igualmente lo han sido los cambios demográficos y de comportamiento nutricional de la población con nuevos hábitos nutricionales, basados en el consumo de platos preparados, precocinados y de los servicios de restauración colectiva, con las consecuencias sanitarias desafortunadas derivadas de un error en su manejo y control. Además, la demanda social de alimentos más “naturales”, “sanos”, “saludables” o “convenientes”, también ha conducido a la producción de alimentos menos procesados y menos seguros microbiológicamente (Hernández, 2010.). Los cambios en los métodos de procesamiento y conservación de los alimentos, han tenido también su reflejo en el desarrollo de los microorganismos patógenos emergentes de los alimentos (MPEA) (Skovgaard, 2007). Hasta 1950 los microorganismos patógenos conocidos transmisibles por alimentos eran *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*, a los que un poco más tarde se sumó *Bacillus cereus*. El empleo masivo de la refrigeración en la cadena alimentaria y en los

hogares permitió, en la década de los 60, la identificación de *Yersinia enterocolitica* como MPEA por su desarrollo a temperaturas cercanas a los 0 °C. En la moderna industria alimentaria, la incorporación de metodologías de inactivación microbiana, basadas en la utilización de diversos tipos de estrés y de tratamientos subletales, como en los alimentos mínimamente procesados (MPF), han facilitado que la resistencia microbiana a un estrés confiera resistencia a otros. El reconocimiento de la existencia de formas viables pero no cultivables (VBNC) de algunos microorganismos responsables de TIA también ha permitido identificar su presencia en los alimentos. Microorganismos como *Campylobacter spp.*, *Helicobacter pylori*, *H. pullorum*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae* 01 y 0139, y *Arcobacter spp.* son MPEA.

Los MPEA derivan, fundamentalmente, de modificaciones genéticas resultantes de la adquisición de nuevos genes, de la pérdida de otros, de mecanismos de recombinación genética, de la transmisión horizontal de factores de virulencia y de resistencias a agentes antimicrobianos, de resistencias a los nuevos métodos de procesado, conservación de los alimentos y de un control inadecuado de la protección de la salud pública. Otras características de los MPEA son su rápida propagación y fácil difusión, al afectar a sectores poblacionales muy sensibles (niños, ancianos e inmunodeprimidos), y algunos, ser responsables de lesiones permanentes o secuelas. (Hernández, 2010)

El reciente aumento del consumo de hortalizas, frutas y zumos también ha propiciado un incremento en el número de brotes de TIA. En el otoño de 2006 se produjeron en EE.UU. cuatro brotes epidémicos independientes ligados al consumo de espinacas, tomates y lechugas con cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágico (EHEC, O157:H7) (Doyle y Erickson, 2008). Otros estudios, reflejan el comportamiento de enterobacterias y virus de permanecer en las tierras de cultivo, de formar biofilms, o de su internalización en las verduras y frutas, los cuales favorecen los brotes de TIA mediados por el consumo de alimentos vegetales (Heaton y Jones, 2008). Desde hace tiempo se conoce la translocación de *E. coli* EHEC, estiércol y agua de regadío contaminadas, a las hojas de las lechugas y su internamiento en las células vegetales (Solomon *et al.*, 2002), así como *E. coli* EHEC utiliza los filamentos EspA para adherirse a las hojas de las lechugas (Shaw *et al.*, 2008). También se

ha descrito el internamiento de microorganismos responsables de TIA en protozoos, aislados de espinacas y lechugas (Gourabathini *et al.*, 2008), de tal manera que los sistemas agrarios actuales de producción de alimentos y de ganadería intensiva, también facilitan la prevalencia y auge de los MPEA. Un comercio y un turismo internacional globalizado también favorecen la distribución y dispersión de los MPEA ya que, la producción y comercialización de los alimentos en gran escala facilita su difusión y la posibilidad de contaminaciones cruzadas con otros alimentos. La capacidad de algunos MPEA de formar películas biológicas (*biofilms*) les permite sobrevivir a numerosos procesos de conservación y eludir tratamientos de limpieza y desinfección.

Otros factores que favorecen el auge de las TIA por MPEA son la edad siendo, generalmente, los niños y mayores los más sensibles, así como la gestación, la hospitalización, el consumo de antibióticos, el alcoholismo y el incremento de una población inmunodeprimida por enfermedades o por agentes inmunosupresores en terapias de cáncer, de trasplantes de órganos o por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Hutson *et al.*, 2004).

### **2.3 Prevención y control de microorganismos patógenos presentes en los alimentos:**

Reducir, eliminar o controlar la presencia de bacterias patógenas emergentes transmisibles por alimentos (BPEA) no es fácil si se consideran las posibles vías de contaminación de los alimentos. Sin embargo, es necesario adoptar estrategias que aseguren la calidad y seguridad de los alimentos desde su producción hasta su consumo. La prevención y control de BPEA durante la producción primaria de alimentos de origen animal y vegetal, así como la adopción por la industria alimentaria de sistemas de prevención y control de la calidad, un mejor manejo higiénico de los alimentos en los hogares y lugares de restauración, así como un mayor control de los alimentos destinados a los sectores poblacionales más sensibles y la aplicación de las tecnologías más eficaces de inactivación microbiana deberían ayudar, sin duda, a reducir la incidencia de TIA por BPEA (Hernández, 2010.).

La conservación de los alimentos tiene como objetivo principal mantener un producto en perfectas condiciones higiénicas y preservar sus cualidades reológicas y organolépticas (Casp y Abril, 2003). Para ello es necesario impedir,

minimizar el crecimiento y la actividad de los microorganismos, así como proporcionar niveles aceptables de seguridad higiénica, alargar y mejorar la vida útil de los alimentos. Existen diferentes métodos para cumplir estos objetivos. Desde hace siglos nuestros antepasados utilizaban técnicas de conservación basadas en el secado, la salazón y el ahumado de carnes y pescados. De forma tradicional, estas técnicas se han seguido manteniendo a lo largo de la historia junto a otros métodos como son el escabechado, el encurtido, el adobo, el marinado, el confitado y el manejo de las fermentaciones. Los avances en la conservación de alimentos, permiten agrupar estos métodos en físicos, químicos o biológicos y sus diversas combinaciones (Toledo de Árbol, 2016).

- **Métodos físicos de conservación:**

Existe una amplia diversidad de métodos físicos aplicables a la conservación de los alimentos, los cuales se basan en el empleo de distintas temperaturas y en la reducción de la actividad de agua de un alimento para inhibir, destruir o eliminar los microorganismos indeseables. La **conservación en frío** (refrigeración y congelación), el tratamiento por calor (pasteurización y esterilización) y la deshidratación (dsecación y liofilización) de los alimentos son los métodos más empleados para evitar o ralentizar el crecimiento de microorganismos. En la refrigeración, la temperatura de los alimentos, se mantiene entre -1 y 8°C, y se utiliza con relativa frecuencia junto con otros métodos de conservación (fermentación, irradiación, pasteurización) o con conservantes químicos (como la sal o los ácidos orgánicos) para reducir la velocidad de las transformaciones microbianas y bioquímicas que tienen lugar en el alimento , para prolongar la vida útil de alimentos sometidos a procesos de conservación poco drásticos (Fellows y Sala Trepas, 1993). Los **tratamientos térmicos** tienen como objetivo principal inactivar a los microorganismos de riesgo en el alimento, ya sea reduciendo la carga microbiana (como en el caso de la pasteurización) o consiguiendo su total inactivación, como por ejemplo los métodos de esterilización por calor. En las últimas décadas, se han desarrollado nuevas tecnologías y sistemas de envasado que han generado un gran interés en la industria alimentaria, ya que cumplen estos objetivos sin la necesidad de aplicar un tratamiento

térmico al alimento. Estos métodos no térmicos de conservación son beneficiosos, dado que los consumidores de hoy en día demandan un producto fresco que sea de calidad, por lo que se está evaluando su potencial como alternativa o como proceso complementario a los métodos clásicos de conservación (Casp y Abril, 2003) como por ejemplo, la **irradiación**, es un tratamiento que utiliza radiaciones ionizantes, generalmente electrones de alta energía u ondas electromagnéticas, para mejorar la seguridad microbiológica de ciertos alimentos, ya que provoca daños en el ADN impidiendo su replicación y paraliza la división celular. Otros tratamientos que han demostrado resultados interesantes para inactivar los microorganismos de los alimentos son, los tratamientos por altas presiones hidrostáticas, por campos eléctricos pulsantes, campos magnéticos oscilantes y la luz pulsada (Casp y Abril, 2003).

- **Métodos químicos de conservación.**

Se basan en el uso de aditivos químicos. Los aditivos químicos son sustancias químicas que no presentan toxicidad, las cuales son capaces de evitar el crecimiento de microorganismos y de añadir a los alimentos una mejora en su calidad de conservación, de manera que mantiene su valor nutritivo y adaptarlos al uso al que van destinados. Entre los diferentes tipos de aditivos que se pueden incorporar a los alimentos se encuentran los colorantes, conservantes, antioxidantes, espesantes, estabilizantes, aromatizantes, emulsionantes, edulcorantes, acidulantes, etc. En los países de la Unión Europea, los aditivos alimentarios autorizados (incluyendo los conservantes) se designan mediante un número de código que comienza con la letra E seguida de una cifra de 3 o 4 dígitos.

Los conservantes químicos, se clasifican en orgánicos o inorgánicos, y pueden ser obtenidos a partir de fuentes naturales o de síntesis química. Mientras que los conservantes procedentes de fuentes biológicas, se conocen en conjunto como **bioconservantes** (Toledo de Árbol, 2016).

La industria alimentaria también emplea otro tipo de sustancias conocidas como **desinfectantes** o **biocidas** (McDonnell y Russell, 1999) en las operaciones rutinarias de limpieza y desinfección de maquinarias y

equipos. Además, como puede ser el caso de frutas y verduras, a veces también se utilizan para disminuir la carga microbiana en la superficie de las materias primas. Se trata de compuestos químicos que atacan a moléculas esenciales para el metabolismo microbiano o la estructura celular mediante interacciones químicas específicas.

- **Métodos biológicos de conservación.**

La demanda del consumo de alimentos naturales y su vez más seguros ha llegado a proponer el uso intensivo de métodos de bioconservación (Stiles, 1999), basados en el empleo de la propia microbiota del alimento de forma natural o controlada, e incluso el uso de productos antibacterianos. Para favorecer la conservación de los alimentos se incluyen, por un lado, la fermentación, esencialmente láctica y alcohólica, la cual depende de los microorganismos implicados y las condiciones de almacenamiento para no provocar la descomposición del producto, por otro lado, el uso de **bacteriocinas**, que son péptidos o proteínas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes grupos de bacterias, generalmente del grupo de las bacterias del ácido láctico (Klaenhammer, 1993).

El uso de bacteriocinas en la industria alimentaria, puede suplir la adición de aditivos químicos e incluso facilitar y/o mejorar el uso de otros mecanismos de barrera, como por ejemplo, reducir la intensidad de los tratamientos térmicos, para conseguir de este modo que los alimentos sean frescos, mínimamente procesados y que conserven sus propiedades nutricionales (Toledo de Árbol, 2016).

Otra línea de actuación frente a las BPEA sería, la de protección de los consumidores frente a su actividad patógena mediante el uso de vacunas, probióticos y alimentos funcionales con péptidos bioactivos de actividad antimicrobiana (Hayes *et al.*, 2009 y Hunther *et al.*, 2009).

El desarrollo de normas legales de prevención y control de la calidad microbiológica de los alimentos también ayudará a la reducción de TIA por BPEA. El Reglamento CE 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, establece Criterios Microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (DOUE,22-XII-2005) con dos

tipos de criterios microbiológicos, unos relativos a la seguridad alimentaria, cuyo incumplimiento supone retirada de los productos del mercado o la no comercialización y, otros, sobre criterios microbiológicos de control del proceso, cuyo incumplimiento requeriría acciones correctoras en el plan Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos. El Reglamento CE 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre (DOUE, 7-XII-2007) lleva a cabo ligeras modificaciones, de los criterios de seguridad alimentaria y de higiene, de los procesos aplicables a los alimentos clasificados por categorías. No obstante, la legislación actual todavía no considera la aplicación de planes de muestreo, límites de presencia, métodos analíticos de referencia, ni métodos de acción en caso de resultados insatisfactorios, para la presencia en los alimentos de BPEA tan significativas como *Campylobacter spp.*

### 3. OBJETIVOS.

- Determinar la carga bacteriana presente en 10 alimentos vegetales.
- Determinar el tipo de Gram, morfología y actividad catalasa de las colonias aisladas.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para poder llevar a cabo los diferentes objetivos propuestos, vamos a realizar el análisis de 10 muestras de alimentos vegetales. En concreto, se han utilizado muestras de 5g de peso de fresa, perejil, espinacas, col rizada, brotes tiernos procedentes de una bolsa de ensalada, pimiento verde, calabacín, puerro, berenjena y zanahoria (Figura1-10), las cuales fueron estudiadas a lo largo de 3 semanas comprendidas entre el 18 de febrero de 2019 y el 8 de marzo de 2019.



**Figura 1:** Muestra de fresa.



**Figura 2:** Muestra de perejil.



**Figura 3:** Muestra de espinacas.



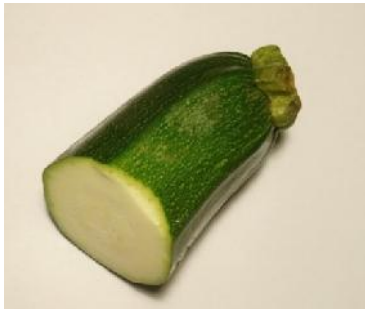
**Figura 4:** Muestra de col rizada.



**Figura 5:** Muestra de brotes tiernos.



**Figura 6:** Muestra de pimiento.



**Figura 7:** Muestra de calabacín.



**Figura 8:** Muestra de puerro.



**Figura 9:** Muestra de berenjena.



**Figura 10:** Muestra de zanahoria.

Inicialmente antes de comenzar con el mencionado análisis, se prepararon los medios de cultivo. Los medios elegidos fueron un medio general denominado TSA y cuatro medios selectivos, todos ellos del laboratorio Scharlab, Barcelona (Figura 11):

- **TSA:** Este medio de cultivo, universalmente utilizado, contiene peptona de soja y peptona de caseína en proporciones comprobadas para soportar el



crecimiento de una gran variedad de microorganismos, incluso algunos de los más exigentes, como *Neisseria*, *Listeria*, *Brucella*, etc. (Tryptone Soy Agar, 2017)

Composición (g/l):

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Peptona de caseína..... | 15,00 |
| Peptona de soja.....    | 5,00  |
| Cloruro sódico.....     | 5,00  |
| Agar.....               | 15,00 |

- **MRS Agar:** Medio de cultivo sólido de Man, Rogosa y Sharpe para la detección, aislamiento y crecimiento de lactobacilos y otras bacterias del ácido láctico a partir de muestras de alimentos y bebidas. La adición de magnesio, manganeso y acetato, junto con el polisorbato facilitan en gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*. (MRS Agar, 2017)

Fórmula en g/L:

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| Proteosa peptona.....     | 10,00 |
| Extracto de carne.....    | 8,00  |
| Extracto de levadura..... | 4,00  |
| D (+)-Glucosa.....        | 20,00 |
| Acetato sódico.....       | 5,00  |
| Citrato triamónico.....   | 2,00  |
| Sulfato magnésico.....    | 0,20  |
| Sulfato manganeso.....    | 0,05  |
| Fosfato dipotásico.....   | 2,00  |
| Polisorbato 80.....       | 1,00  |
| Agar.....                 | 14,00 |

pH final a 25°C, 6,2 ±0,2

- **EMB, agar Levine o Agar Eosina-Azul de Metileno:** Es un medio muy versátil originalmente desarrollado para la diferenciación de *E. coli* y *Enterobacter aerogenes*. También ha demostrado ser muy efectivo en la rápida identificación de *Candida albicans* y demuestra una alta correlación

con la prueba de coagulasa para estafilococos. Se ha recomendado repetidamente para la detección, enumeración y diferenciación de miembros del grupo de bacterias coliformes. *Escherichia coli* forman colonias planas de 2-3 mm de diámetro y son de color violeta oscuro con un centro negro que produce un brillo metálico verde distintivo cuando la luz se refleja en él. *Enterobacter* forman colonias convexas que son el doble de grandes que las de *E. coli*, no tienen brillo metálico y son de color rosa, con un centro azul oscuro. Los organismos que no fermentan la lactosa producen colonias incoloras. Las colonias de *Candida albicans*, tras ser incubadas en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, tienen un aspecto algodonero muy peculiar que las distingue de otras especies de *Candida*. (Agar Eosina-Azul de Metileno, 2017).

Composición (g/l):

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Peptona.....                     | 10,000 |
| Lactosa.....                     | 10,000 |
| Dipotasio hidrógeno fosfato..... | 2,000  |
| Yellowish Eosin .....            | 0,400  |
| Methylene Blue.....              | 0,065  |
| Agar.....                        | 15,000 |

- **KAA o El Caldo Presuntivo KAA**, es un medio que se utiliza para la detección, y enumeración de estreptococos del grupo D de Lancefield en muestras diversas de alimentos y bebidas como son: el agua de bebida envasada; las carnes frescas, refrigeradas, congeladas o picadas; productos de la pesca y moluscos bivalvos; bebidas refrescantes; productos de confitería, pastelería, bollería, repostería, turrone y mazapanes; especias y semiconservas. (Caldo KAA Presuntivo, 2012)

Fórmula en g/L:

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| Tryptona.....                | 20,00 |
| Extracto de levadura.....    | 5,00  |
| Cloruro sódico.....          | 5,00  |
| Citrato disódico.....        | 1,00  |
| Esculina.....                | 1,00  |
| Citrato férrico amónico..... | 0,50  |

Azida sódica.....0,15

Kanamicina sulfato.....0,02

pH final a 25°C, 7,0 ±0,2

- **Vogel-Johnson:** es un medio sólido de alta selectividad para el aislamiento e identificación de estafilococos. La fuerte acción selectiva del medio se basa en la presencia del cloruro de litio, de la glicocola y del telurito potásico que inhiben casi totalmente a la microbiota acompañante, mientras que los estafilococos apenas se ven afectados, ya que si bien pueden reducir el telurito a telurio, el litio puede ejercer alguna acción que queda perfectamente compensada por el efecto regenerador de la glicocola.

Los estafilococos aparecen por lo general como colonias negras por el telurito reducido sobre un medio de color rojo. (Vogel Johnson Agar, 2012)

Fórmula en g/L:

Peptona de caseína..... 10,000

Extracto de levadura..... 5,000

Manitol..... 10,000

Fosfato dipotásico.....5,000

Cloruro de litio.....5,000

Glicina..... 10,000

Rojo de fenol.....0,025

Agar..... 15,000

pH final a 25°C, 7,2 ±0,2



**Figura 11:** Medios de cultivo EMB, V-J, MRS y KAA, respectivamente.

Estos medios fueron preparados según las instrucciones del fabricante (TSA 40g/l; EMB 36g/l; KAA 48 g/l; V-J 60 g/l; MRS 62g/l), de manera que para el trabajo realizado en la primera semana en la que se analizan 3 muestras de las anteriores mencionadas, más concretamente fresa, perejil y espinacas, el primer día del estudio se dedica a preparar medios de cultivo para lo que se necesita 5 matraces Erlenmeyer de 1L de capacidad, pero para que no se salga el medio del recipiente, se prepara 800ml, de tal forma que se ajustan los cálculos (TSA 32g/800ml; EMB 28.8g/800ml; KAA 38.8g/800ml; V-J 48g/800ml; MRS 49.6g/800ml). Además se preparó solución salina al 0.9%. Tras pesar los medios y la solución salina, se disuelven en agua destilada, se esterilizan mediante el autoclave. Los medios se atemperan a 50°C y se le añaden los suplementos específicos según las necesidades del medio, en el caso de Palcam se le añade un suplemento específico, ó telurito potásico al VJ, después se vierten a razón de 15ml en cada placa de Petri. Finalmente, se extienden los medios en placas de Petri, las cuales se dejan secar y se guardan para su posterior utilización.

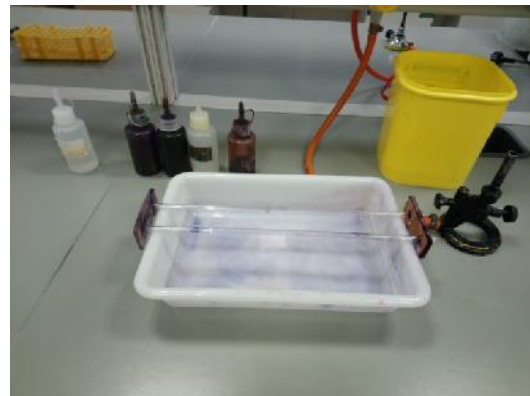
El segundo día, se procede a efectuar el procesado de los alimentos, de cada alimento se toman 5 g iniciales a los que se le añaden 45 ml de solución salina estéril, para seguidamente ser procesados en un homogeneizador (Stomacher® 80 Biomaster, Seward Ltd.). A partir de esta disolución se prepararon disoluciones

seriadas añadiendo 100 µl de esta suspensión en eppendorf a los cuales, anteriormente se les había añadido 0.9 ml de disolución salina estéril.

Una vez terminadas las diluciones seriadas las cuales llegaban hasta -4, es decir la primera solución ha sido diluida 4 veces, se siembran 100 µl de cada disolución por tanto desde la 0 a la -4, en las placas en los que se había vertido TSA por duplicado, mientras que en las placas de medios selectivos solo se siembran por duplicado las disoluciones 0 y -1.

Los recuentos se realizaron tras 48h de incubación a 37°C todas las placas de Petri excepto, el medio selectivo de MRS se incubó a 30°C debido a que esto favorece el crecimiento de microorganismos lácticos. Finalmente, tras ese periodo, se sacaron de la estufa y se procedió al recuento de colonias de cada una de las placas de Petri.

Al día siguiente se seleccionaron las colonias que presentaban morfología diferente, obtenidas de cada medio de cultivo empleado, para ello primero se deposita en la mesa de trabajo una cubeta para colocar los portaobjetos tal y como se muestra en la imagen adjunta (Figura 12). Donde además se puede observar los botes de los colorantes utilizados para la tinción de Gram, la cual se realiza a cada una de las colonias seleccionadas.



**Figura 12:** Mesa de trabajo con los colorantes y los materiales utilizados para la tinción de Gram.

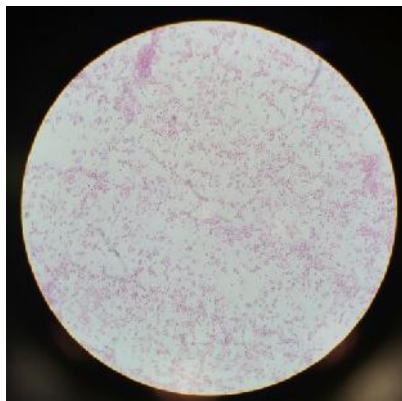
El procedimiento seguido para la tinción de Gram ha sido el siguiente:

- Con un asa de siembra previamente esterilizada a la llama de un mechero, se toma una gota de agua destilada y se deposita en un portaobjetos limpio.
- A continuación se toma con el asa de siembra la colonia que se va a teñir, se deposita en la gota de agua del portaobjetos y se fija a la llama del mechero.
- Una vez fijada, se deja enfriar y seguidamente se añade el primer colorante que es cristal violeta (teñirá todas las bacterias) que se deja actuar durante 2 minutos, posteriormente se añade el segundo colorante que es el lugol (ayudará al cristal violeta a fijarse mejor) dejándolo actuar nuevamente 2

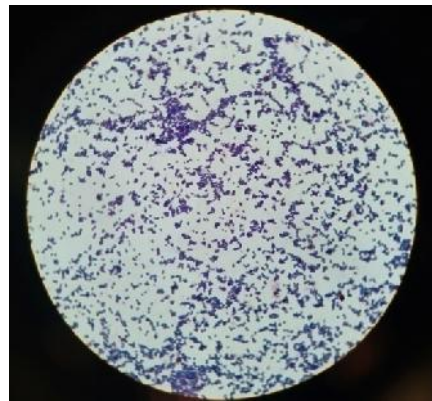
minutos. Trascurrido ese tiempo, se retiran los colorantes, se añade alcohol (para decolorar) y después agua destilada.

- Finalmente, se añade el último colorante que es la safranina (que teñirá solamente a las bacterias Gram -), se deja actuar 3 minutos, seguidamente se lava con agua destilada de nuevo y se seca a la llama del mechero. Una vez esté seco, se le añade una gota de aceite de inmersión y nos dirigimos al microscopio óptico para observar nuestra colonia con el objetivo de 100x.

Este procedimiento, anteriormente descrito, nos permite poder diferenciar entre bacterias Gram +, las cuales cuando se observan al microscopio se tornan a un color violeta y cuya imagen se adjunta en la figura 14, de bacterias Gram - , las cuales cuando se observan al microscopio se tornan a un color más rosado y cuya imagen se adjunta en la figura 13.



**Figura 13:** Bacteria Gram – observada al microscopio.



**Figura 14:** Bacteria Gram + observada al microscopio.

Además de esta tinción, se realizó a cada una de las colonias elegidas, la prueba de la catalasa, la cual pone de manifiesto la presencia del enzima catalasa en una bacteria. Esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en agua y oxígeno, con la consiguiente aparición de burbujas.



Para llevar a cabo esta prueba, se toma de nuevo aquellas colonias que presenta morfologías diferentes, con un asa de siembra previamente esterilizado a la llama, y depositándolo en un portaobjetos limpio. A continuación se añade agua oxigenada

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de tal manera que, si se produce reacción (aparecen pequeñas burbujas) se considera que es catalasa +, mientras que si no ocurre ninguna reacción se considera, por tanto que esa colonia es catalasa (Figura 15).

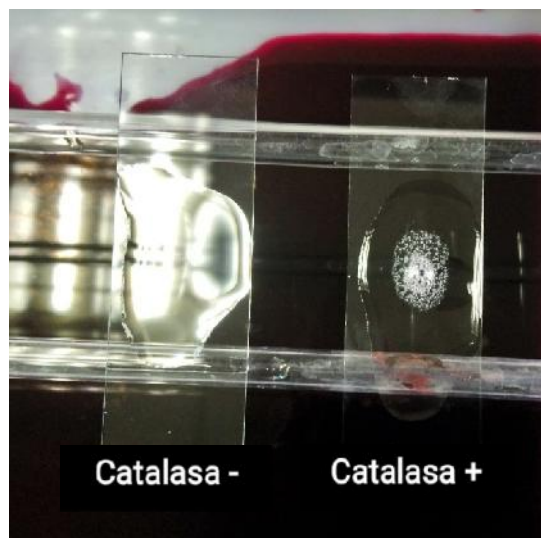


Figura 15: Prueba de la catalasa.

Este proceso se repitió con cada una de las muestras restantes, es decir, col rizada, brotes tiernos procedentes de una bolsa de ensalada, pimiento verde, calabacín, puerro, berenjena y zanahoria, en las sucesivas semanas del estudio.

Finalmente, una vez obtenidos todos los resultados, se hacen una representación gráfica de los mismos, para una mayor comprensión, mediante el programa informático Excel.

## 5. RESULTADOS.

Tras seguir la metodología anterior y dejar incubar las placas sembradas durante 48h, se procede al recuento de las colonias. Para realizar el recuento solo se tendrán en cuenta aquellas placas que se encuentran en un intervalo comprendido entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC) y como el ensayo fue repetido dos veces, se hace la media de ambas. Con los datos obtenidos en el recuento se calcula UFC/ml con la siguiente fórmula, de esta manera podremos saber el número de microorganismos presentes en un mililitro de solución.

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{número de colonias} \times \text{dilución}}{\text{Volumen}} \times 10 \text{ (5g/45ml de solución salina)}$$

### 5.1 Resultados obtenidos en el recuento microbiano.

A continuación, se muestran diez tablas, enumeradas del 1 al 10 en las que se expresa el recuento microbiano en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cada uno de los alimentos analizados.

- FRESA:

| UFC/ml | Disolución madre | $10^{-1}$         | $10^{-2}$          | $10^{-3}$         | $10^{-4}$       |
|--------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| TSA    | 250              | $1,3 \times 10^4$ | $1,35 \times 10^5$ | $7,5 \times 10^5$ | $3 \times 10^6$ |
| KAA    | 0                | 0                 | -                  | -                 | -               |
| V-J    | 0                | 0                 | -                  | -                 | -               |
| EMB    | 50               | 0                 | -                  | -                 | -               |
| MRS    | 500              | 0                 | -                  | -                 | -               |

**Tabla 1:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en la fresa.

En el recuento microbiano realizado en la fresa, podemos observar, que solamente aparece crecimiento bacteriano en el medio de cultivo TSA hasta  $10^6$  UFC, en los demás medios de cultivo el número de UFC/ml es mínimo y solamente aparecen en la dilución madre del alimento.

- PEREJIL:

| UFC/ml | Disolución madre   | $10^{-1}$         | $10^{-2}$ | $10^{-3}$         | $10^{-4}$       |
|--------|--------------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------------|
| TSA    | <300               | <300              | <300      | $2,4 \times 10^6$ | $1 \times 10^7$ |
| KAA    | 0                  | 0                 | -         | -                 | -               |
| V-J    | 200                | 500               | -         | -                 | -               |
| EMB    | $1,3 \times 10^4$  | $1 \times 10^6$   | -         | -                 | -               |
| MRS    | $6,65 \times 10^3$ | $1,5 \times 10^4$ | -         | -                 | -               |

**Tabla 2:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en el perejil.

En el caso del perejil, el recuento de UFC/ml llega a ser de  $10^6$  en EMB, lo que sugiere la presencia de enterobacterias y de  $10^4$  en MRS con posible existencia de



bacterias lácticas. Además de presentar escaso crecimiento en V-J, aunque el crecimiento en el medio general, TSA, llega hasta  $10^7$  UFC/ml.

- ESPINACAS:

| UFC/ml | Disolución madre   | $10^{-1}$ | $10^{-2}$          | $10^{-3}$         | $10^{-4}$       |
|--------|--------------------|-----------|--------------------|-------------------|-----------------|
| TSA    | <300               | <300      | $4,35 \times 10^5$ | $5,5 \times 10^5$ | $4 \times 10^6$ |
| KAA    | 0                  | 0         | -                  | -                 | -               |
| V-J    | $2,05 \times 10^3$ | 0         | -                  | -                 | -               |
| EMB    | $1,13 \times 10^5$ | 0         | -                  | -                 | -               |
| MRS    | $1,3 \times 10^3$  | 0         | -                  | -                 | -               |

**Tabla 3:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en las espinacas.

En este alimento, las espinacas, la presencia de microorganismos tiene lugar únicamente en la solución madre en los medios selectivos VJ y MRS, sugiriendo la presencia de *Staphylococcus* y bacterias lácticas. También aparece crecimiento en EMB, de  $10^5$  UFC/ml, presencia de enterobacterias y sin embargo no hay crecimiento en KAA. En el medio general TSA los recuentos llegan a ser del orden de  $10^6$  UFC/ml.

- COL RIZADA:

| UFC/ml | Disolución madre  | $10^{-1}$         | $10^{-2}$       | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ |
|--------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------|-----------|
| TSA    | $1,9 \times 10^4$ | $6,6 \times 10^4$ | $3 \times 10^4$ | 0         | 0         |
| KAA    | 0                 | 0                 | -               | -         | -         |
| V-J    | 0                 | 0                 | -               | -         | -         |
| EMB    | 50                | 0                 | -               | -         | -         |
| MRS    | 0                 | 0                 | -               | -         | -         |

**Tabla 4:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en la col.

En la muestra utilizada de col rizada, solamente aparecen UFC en los medios TSA y EMB, pero en ambos casos escasamente, debido a que en el medio EMB solamente

se observaron 50 UFC/ml en la disolución madre, sin embargo en el medio TSA aparece crecimiento microbiano hasta  $10^4$  UFC/ml.

- BROTOS TIERNOS DE ENSALDA:

| UFC/ml | Disolución madre  | $10^{-1}$         | $10^{-2}$ | $10^{-3}$         | $10^{-4}$         |
|--------|-------------------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------|
| TSA    | <300              | <300              | <300      | $1,2 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^7$ |
| KAA    | 0                 | 0                 | -         | -                 | -                 |
| V-J    | 0                 | 0                 | -         | -                 | -                 |
| EMB    | <300              | $2,4 \times 10^5$ | -         | -                 | -                 |
| MRS    | $2,1 \times 10^4$ | $3,2 \times 10^4$ | -         | -                 | -                 |

**Tabla 5:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos de brotes tiernos procedentes de una bolsa de ensalada.

Destacan en esta muestra de brotes tiernos procedentes de una bolsa de ensalada, los recuentos de UFC/ml en MRS y EMB con valores de  $10^4$  y  $10^5$  respectivamente, por lo que podemos decir que existe presencia de bacterias lácticas y de enterobacterias. Además hay crecimiento en el medio general TSA, del orden de  $10^7$  UFC/ml,

- CALABACIN:

| UFC/ml | Disolución madre | $10^{-1}$         | $10^{-2}$ | $10^{-3}$         | $10^{-4}$         |
|--------|------------------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------|
| TSA    | <300             | <300              | <300      | $1,5 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ |
| KAA    | 100              | 500               | -         | -                 | -                 |
| V-J    | <300             | $3,1 \times 10^4$ | -         | -                 | -                 |
| EMB    | <300             | $5,3 \times 10^4$ | -         | -                 | -                 |
| MRS    | 300              | $1 \times 10^3$   | -         | -                 | -                 |

**Tabla 6:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en el calabacín.

En el caso de la muestra de calabacín, aparecen recuentos de UFC/ml en todos los medios de cultivo utilizados para el ensayo, destacar que es el único alimento donde

además aparece crecimiento microbiano en KAA, confirmándose por tanto la presencia de *Staphylococcus*.

- PIMIENTO:

| UFC/ml | Disolución madre | $10^{-1}$         | $10^{-2}$         | $10^{-3}$       | $10^{-4}$         |
|--------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| TSA    | <300             | $9,8 \times 10^4$ | $1,1 \times 10^5$ | $2 \times 10^5$ | $2,5 \times 10^6$ |
| KAA    | 0                | 0                 | -                 | -               | -                 |
| V-J    | 100              | 0                 | -                 | -               | -                 |
| EMB    | 0                | 0                 | -                 | -               | -                 |
| MRS    | 0                | 0                 | -                 | -               | -                 |

**Tabla 7:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en el pimiento.

En el recuento microbiano realizado en el pimiento, el crecimiento bacteriano se ha producido fundamentalmente en el medio general, TSA del orden de  $10^6$  UFC/ml. Aunque se aprecia un escaso crecimiento en el medio V-J del orden de 100 UFC/ml en la disolución madre

- BERENJENA:

| UFC/ml | Disolución madre  | $10^{-1}$         | $10^{-2}$         | $10^{-3}$       | $10^{-4}$       |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| TSA    | <300              | $6 \times 10^4$   | $1,2 \times 10^5$ | $5 \times 10^4$ | $3 \times 10^6$ |
| KAA    | 0                 | 0                 | -                 | -               | -               |
| V-J    | $2,9 \times 10^4$ | $2,8 \times 10^4$ | -                 | -               | -               |
| EMB    | <300              | $2,5 \times 10^3$ | -                 | -               | -               |
| MRS    | $2,5 \times 10^3$ | $2,5 \times 10^3$ | -                 | -               | -               |

**Tabla 8:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en la berenjena.

En el caso de la muestra de berenjena, aparecen recuentos de UFC/ml en todos los medios de cultivo utilizados para el ensayo, del orden de  $10^4$  UFC/ml en los medios selectivos, excepto en el medio KAA. Esto nos indica la presencia de enterobacterias y bacterias lácticas. En TSA, el crecimiento llega a ser del orden de  $10^6$  UFC/ml.

- PUERRO:

| UFC/ml | Disolución madre  | $10^{-1}$         | $10^{-2}$         | $10^{-3}$       | $10^{-4}$         |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| TSA    | <300              | $1,2 \times 10^5$ | $2,1 \times 10^5$ | $5 \times 10^5$ | $3,1 \times 10^7$ |
| KAA    | 300               | 0                 | -                 | -               | -                 |
| V-J    | $2,5 \times 10^4$ | $1,1 \times 10^5$ | -                 | -               | -                 |
| EMB    | $1,1 \times 10^4$ | $2,3 \times 10^4$ | -                 | -               | -                 |
| MRS    | 0                 | 0                 | -                 | -               | -                 |

**Tabla 9:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en el puerro.

En el recuento microbiano realizado en el puerro, podemos observar crecimiento en todos los medio de cultivo utilizados en el estudio, excepto en MRS. En el caso de los medios selectivos, se obtuvieron cargas microbianas del orden de  $10^4$  UFC/ml, mientras que en el medio general TSA fueron del orden de  $10^5$  UFC/ml. Por tanto, los datos obtenidos nos sugieren la presencia de enterobacterias y *Staphylococcus*, pero no de bacterias lácticas, debido a la ausencia de crecimiento en el medio MRS.

- ZANAHORIA:

| UFC/ml | Disolución madre | $10^{-1}$         | $10^{-2}$ | $10^{-3}$         | $10^{-4}$         |
|--------|------------------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------|
| TSA    | <300             | <300              | <300      | $1,7 \times 10^7$ | $8,5 \times 10^6$ |
| KAA    | 0                | 0                 | -         | -                 | -                 |
| V-J    | 300              | 0                 | -         | -                 | -                 |
| EMB    | <300             | $2,1 \times 10^5$ | -         | -                 | -                 |
| MRS    | <300             | $1,9 \times 10^5$ | -         | -                 | -                 |

**Tabla 10:** Recuento microbiano expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro obtenidos en la zanahoria.

En el caso de la muestra de zanahoria, podemos observar, en general recuentos elevados del orden de  $10^5$  UFC/ml en los medios selectivos EMB y MRS, por lo que sugiere la presencia de enterobacterias y de bacterias lácticas. Sin embargo, destaca el escaso crecimiento microbiano en los medios V-J y KAA, siendo en este

último inexistente. Donde sí se observa un recuento elevado, es el medio general TSA, en concreto, de orden del de  $10^7$  UFC/ml

## 5.2 Identificación de las colonias.

Una vez realizado el recuento de las placas, se realiza un análisis morfológico a nivel macroscópico de las colonias, teniendo en cuenta color, tamaño y brillo. Después hacemos un análisis microscópico, realizando una tinción de Gram de cada tipo de colonia. Por último, se realiza la prueba de la determinación de la actividad catalasa de cada tipo de colonia, que nos permitirá hacer una identificación presuntiva de cada una de las bacterias que estamos estudiando. Los resultados obtenidos, se muestran en las tablas enumeradas del 11 a 20.

- Fresa:

| Medio | Morfología     | Gram | Catalasa |
|-------|----------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca | +    | -        |
| EMB   | Colonia negra  | -    | +        |
| MRS   | Colonia blanca | +    | -        |

**Tabla 11:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de fresa.

- Perejil:

| Medio | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|-------|------------------------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca               | +    | +        |
| TSA   | Colonia amarilla<br>Levadura | -    | +        |
| TSA   | Colonia naranja              | +    | +        |
| V-J   | Colonia negra                | +    | +        |
| EMB   | Colonia naranja              | -    | +        |
| EMB   | Colonia rosa                 | -    | +        |
| MRS   | Colonia blanca               | +    | -        |
| MRS   | Colonia rosa                 | +    | -        |
| MRS   | Colonia parda                | +    | -        |

**Tabla 12:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de perejil.

- Espinacas:

| Medio | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|-------|------------------------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca               | -    | +        |
| TSA   | Colonia amarilla<br>Levadura |      | -        |
| EMB   | Colonia rosa                 | -    | +        |
| EMB   | Colonia negra                | -    | +        |
| EMB   | Colonia naranja              | -    | +        |
| V-J   | Colonia negra                | +    | -        |
| MRS   | Colonia blanca               | +    | -        |

**Tabla 13:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de espinacas.

- Col rizada:

| Medio | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|-------|------------------------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca               | +    | -        |
| TSA   | Colonia amarilla             | +    | +        |
| TSA   | Colonia naranja:<br>Levadura |      | +        |
| EMB   | Colonia negra                | -    |          |

**Tabla 14:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de col rizada.

- Brotes tiernos de ensalada:

| Medio | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|-------|------------------------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca               | +    | +        |
| TSA   | Colonia amarilla<br>Levadura |      | -        |
| EMB   | Colonia blanca               | -    | -        |
| EMB   | Colonia negra                | -    | -        |
| MRS   | Colonia blanca               | +    | -        |

**Tabla 15:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de brotes tiernos.

- Calabacín:

| Medio | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|-------|------------------------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca               | -    | +        |
| TSA   | Colonia amarilla<br>Levadura | -    | +        |
| EMB   | Colonia verde<br>brillante   | -    | -        |
| EMB   | Colonia rosa                 | -    | +        |
| EMB   | Colonia naranja              | -    | +        |
| KAA   | Colonia blanca               | +    | -        |
| V-J   | Colonia negra                | +    | +        |
| MRS   | Colonia blanca               | +    | -        |

**Tabla 16:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de calabacín.

- Pimiento:

| Medio | Morfología                                         | Gram | Catalasa |
|-------|----------------------------------------------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca                                     | +    | +        |
| V-J   | Colonia negra:<br>Son hifas del<br>propio vegetal. | -    | -        |

**Tabla 17:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de pimiento.

- Berenjena:

| Medio | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|-------|------------------------------|------|----------|
| TSA   | Colonia blanca               | -    | +        |
| TSA   | Colonia amarilla<br>Levadura | -    | +        |
| EMB   | Colonia blanca               | -    | -        |
| V-J   | Colonia blanca               | +    | +        |

|            |                  |   |   |
|------------|------------------|---|---|
| <b>V-J</b> | Colonia amarilla | - | + |
| <b>MRS</b> | Colonia blanca   | - | - |

**Tabla 18:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de berenjena.

- Puerro:

| Medio      | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|------------|------------------------------|------|----------|
| <b>TSA</b> | Colonia blanca               | -    | +        |
| <b>TSA</b> | Colonia amarilla<br>Levadura |      | +        |
| <b>EMB</b> | Colonia parda                | -    | +        |
| <b>EMB</b> | Colonia negra                | -    | +        |
| <b>V-J</b> | Colonia blanca               | +    | +        |
| <b>V-J</b> | Colonia amarilla             | +    | +        |
| <b>KAA</b> | Colonia blanca               | +    | +        |

**Tabla 19:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de puerro.

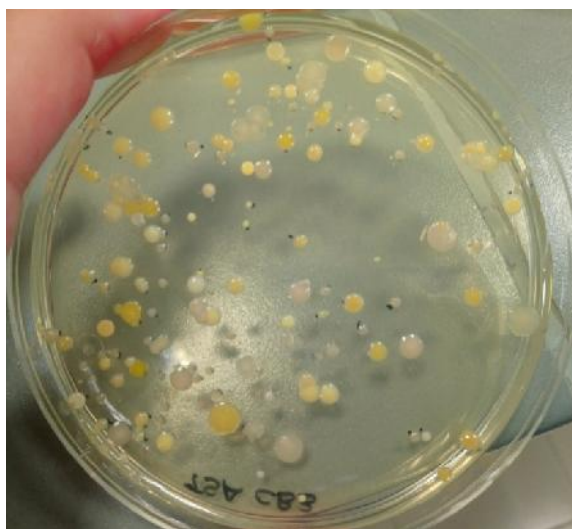
- Zanahoria:

| Medio      | Morfología                   | Gram | Catalasa |
|------------|------------------------------|------|----------|
| <b>TSA</b> | Colonia blanca               | -    | +        |
| <b>TSA</b> | Colonia amarilla<br>Levadura | -    | +        |
| <b>EMB</b> | Colonia rosa                 | -    | +        |
| <b>EMB</b> | Colonia negra                | -    | +        |
| <b>V-J</b> | Colonia rosa                 | +    | +        |
| <b>V-J</b> | Colonia negra                | +    | +        |
| <b>MRS</b> | Colonia blanca               | +    | -        |

**Tabla 20:** Identificación macroscópica y microscópica de las colonias bacterianas de la muestra de zanahoria.

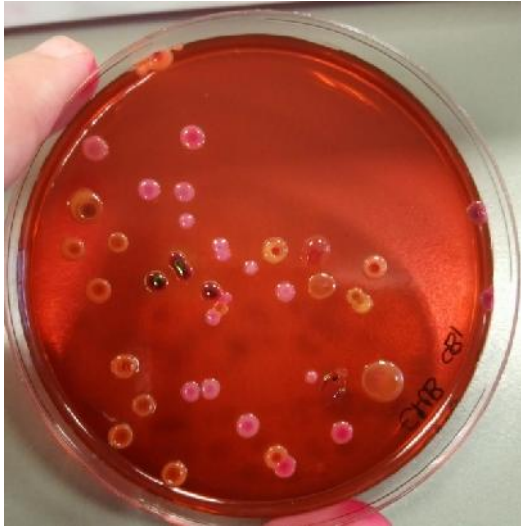


En general, tras el análisis de los resultados, se puede observar, como principalmente se pueden encontrar dos tipos de colonias en el medio general TSA, unas de color blanco y otras de color amarillo, las cuales se pueden observar en la figura 16. Las de color amarillo, se corresponde probablemente a levaduras.

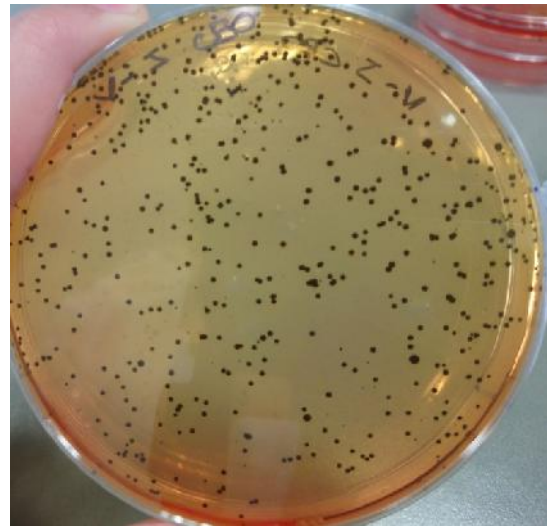


**Figura 16:** Placa de Petri con medio TSA, en el que se observan colonias blancas

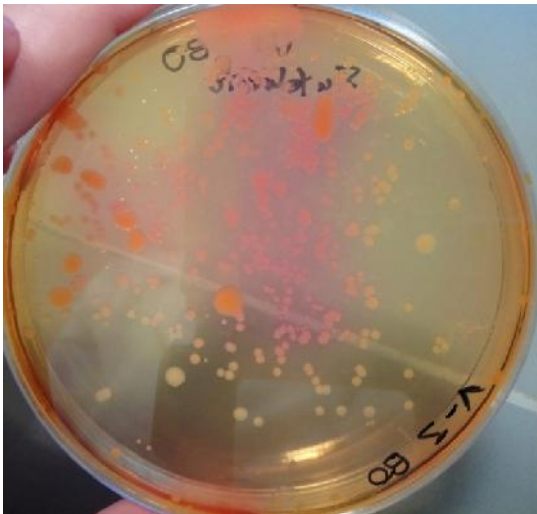
En el medio EMB, aunque hay colonias de diferente morfología, es decir, de color negro, rosa, blanca, casi todas coinciden con que son bacterias Gram – y catalasa +, lo que coincide con lo esperado. Mencionadas colonias se pueden observar en la figura 17. Sin embargo, en el caso del medio V-J existen varias morfologías negras, blancas o rosadas, en este medio lo esperado es que la mayoría de las colonias obtenidas fueran de color negro tal y como se observa en la figura 18, pero como podemos ver en la figura 19, no siempre ocurre. Esto es debido a un error en la elaboración de los medios, ya que durante mencionado procedimiento, no se añadió terurito potásico, por lo que las bacterias no se tornan a color oscuro. Aún así podemos decir que la mayoría de las bacterias son Gram + y catalasa +.



**Figura 17:** Placa de Petri con medio EMB, en el que se observan colonias verde brillante, rosa y naranja.



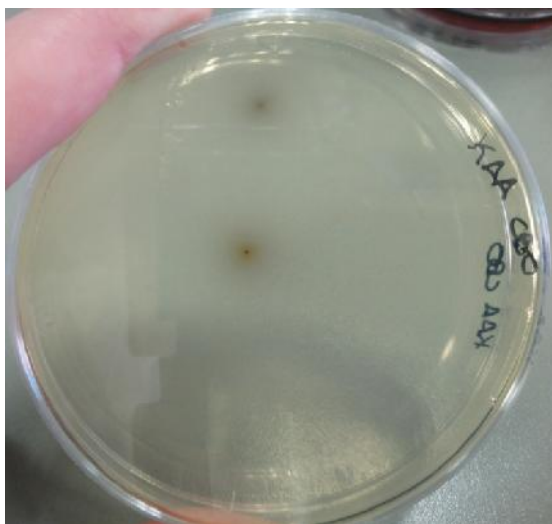
**Figura 18:** Placa de Petri con medio V-J con telurito potásico, en el que se observan colonias negras.



**Figura 19:** Placa de Petri con medio V-J sin telurito potásico, en el que se observan colonias blancas.

En el caso del medio KAA, vemos como solo hay presencia de colonias de color pardo (Figura 20), en todos los casos las bacterias son Gram +, pero cuando se realiza la prueba de la catalasa, se puede ver como en un caso es + y en otro -.

Finalmente en el medio MRS, las colonias obtenidas son de color blanco (Figura 21), no de gran tamaño, pero en su mayoría Gram + y catalasa -.



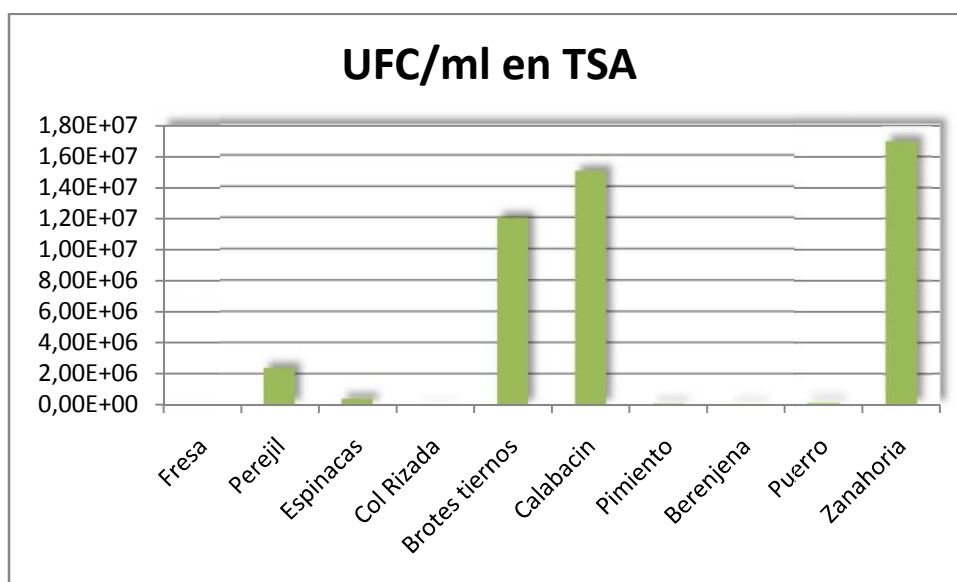
**Figura 20:** Placa de Petri con medio KAA, en el que se observan colonias pardas.



**Figura 21:** Placa de Petri con medio MRS, en el que se observan colonias blancas.

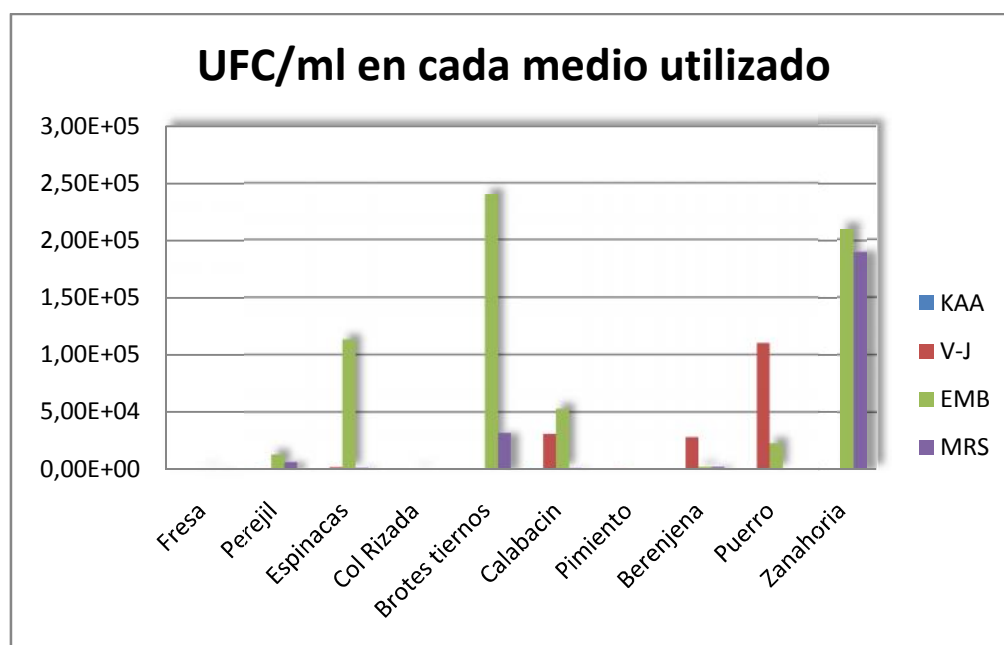
### 5.3 Representación gráfica de la carga microbiana de los alimentos.

Con los datos que se han ido recopilando, se han realizado varios gráficos, en los que se compara la carga microbiana presente en cada alimento con los medios utilizados.



**Gráfico 1:** Representación de la carga microbiana en medio TSA.

Por un lado, en el gráfico 1 tenemos el crecimiento bacteriano de cada uno de los alimentos utilizados en este ensayo en el medio general, es decir, en TSA. El eje de la Y indica el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y en el eje de la X aparecen las distintas frutas y hortalizas. Se puede observar como la mayor carga microbiana se encuentra en la zanahoria y el calabacín. Mientras la menor carga microbiana se ha registrado en fresa, col rizada, berenjena y pimiento.



**Gráfico 2:** Representación de la carga microbiana en los medios selectivos.

En el siguiente gráfico (Gráfico 2), están representados, los datos de carga microbiana de los alimentos en los distintos medios selectivos que se han empleado. De nuevo, en el eje de la Y tenemos las UFC/ml y en el eje de la X los vegetales y los medios. En primer lugar, si observamos el medio EMB, se puede ver, como la mayor tasa de crecimiento se ha obtenido en los brotes tiernos, también se ha registrado crecimiento microbiano en zanahoria, calabacín y espinacas. Sin embargo, en puerro y berenjena donde mayor crecimiento aparece es en el medio V-J.

Por el contrario, hay medios como el KAA u otros que debido a su escasa presencia microbiana no se pueden observar representados, pero si obtuvieron UFC/ml durante el recuento. En este caso KAA no se observa en

ninguna muestra. Finalmente en el MRS, las mayores cargas microbianas se han observado en la zanahoria.

Por otro lado, si comparamos ambas gráficas podemos ver, observando el eje Y, existe una mayor cantidad de UFC/ml en el medio general, es decir, en TSA, donde además en mayor o menor medida hay crecimiento de todas las muestras, mientras que en los medios selectivos, es decir, KAA, V-J, EMB y MRS, el número de UFC/ml es menor.

## 6. DISCUSIÓN.

En los últimos años, se ha detectado un mayor número de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas, la información disponible muestra que es un problema que crece en importancia. Comprender la complejidad del problema de la contaminación microbiana de los vegetales y tener conciencia de su importancia, es el primer paso para lograr una alta calidad en los productos hortícolas. La contaminación de alimento, puede ser causada por diferentes motivos como hemos visto anteriormente.

En el estudio de Dziedzinska *et al.* en 2018, describe la aparición de las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sp.* y *Escherichia coli* en fresas frescas. *L. monocytogenes* es una bacteria láctica mientras *Cronobacter sp.* y *E. coli*, son enterobacterias de manera que estos resultados son similares a los del presente ensayo, ya que en el análisis que se ha llevado a cabo, sugiere la presencia de enterobacterias y bacterias lácticas, debido al crecimiento en los medios EMB y MRS, aunque este es escaso en fresa. Sin embargo, las verduras de hoja verde y sus ensaladas listas para comer, son reconocidas como fuente de brotes de intoxicación alimentaria en muchas partes del mundo. Entre una amplia gama de patógenos que causan enfermedades transmitidas por los alimentos están *E. coli* O157: H7, *Salmonella spp.* Y *L. monocytogenes* los cuales, son los patógenos más comunes que contaminan las verduras de hoja verde (Taban and Halkman, 2011). Si comparamos esto, con los resultados obtenidos de las muestras de hoja verde y ensaladas listas para comer que se han analizado en este trabajo, es decir, col rizada, brotes tiernos de ensalada, espinacas y perejil, vemos como todos excepto la col rizada, efectivamente tiene altas concentraciones, sobre todo de enterobacterias, debido a su crecimiento en EMB, en las que se incluye *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella spp.*

En otro artículo publicado en 2019, por Fessard y Remize, determina la presencia de bacterias lácticas en frutas y vegetales, en este estudio se han detectado bacterias de este tipo en siete de las diez muestras estudiadas, en concreto fresa, perejil, espinacas, brotes tiernos procedentes de una bolsa de ensalada, calabacín, berenjena y zanahoria, se trata de bacterias que crecen en el medio MRS.

En el presente estudio, se puede poner de manifiesto la gran variabilidad microbiológica presente en los diferentes alimentos ensayados. Los medios de cultivo seleccionados para la realización del estudio, nos permiten visualizar la diferencia existente entre ellos. Si bien la mayoría de los alimentos no presentan una carga microbiana total superior a  $10^5$ , si es cierto que es destacable la aparición de enterobacterias, bacterias lácticas e incluso bacterias del género *Staphylococcus*.

Como ocurre en el caso del calabacín, la posible aparición de *Staphylococcus* puede ser debida a su manipulación, ya que este género se utiliza como indicador de una mala manipulación, dado que su fuente principal es la superficie corporal del hombre.

Con los datos que hemos obtenido, podemos apreciar que todas las muestras menos el pimiento verde tienen presencia de enterobacterias, las cuales reciben su nombre por la localización, debido a que se encuentran en el tubo digestivo aunque se trata de bacterias ubicuas, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. Por lo que es común su presencia.

Otro tipo de bacterias que hemos podido identificar en el ensayo, son las bacterias lácticas, las cuales aparecen en fresa, perejil, espinacas, brotes tiernos, calabacín, berenjena y zanahoria. Las bacterias lácticas se han utilizado desde hace cientos de años para la obtención de alimentos fermentados como el yogurt, quesos, encurtidos, vinos, cervezas y otros. Pero desde hace tiempo, se conoce que las bacterias lácticas, poseen el potencial de inhibir en los alimentos el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos, lo que indica la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos (Hernández *et al.*, 1993). Además de contribuir en la

biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva (Ramirez *et al.*, 2011).

Los alimentos como perejil, espinacas, puerro y zanahoria presentan un gran crecimiento bacteriano, ya que se han hecho recuentos de UFC en cuatro de los cinco medios de cultivo utilizados. En el caso del calabacín y del puerro además ha existido crecimiento en el medio KAA, siendo por tanto los alimentos que mayor variabilidad microbiológica presenta.

La fresa, col rizada y pimienta, sin embargo han sido los alimentos con menor carga microbiana, ya que solamente en dos medios de cultivo se ha podido realizar recuento de UFC. Esto puede ser debido a que presentan sobre todo la fresa, un pH ácido.

## **7. CONCLUSIONES.**

A partir de los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Las muestras que presenta una mayor variabilidad microbiológica, son el calabacín y el puerro, ya que se han obtenido UFC en todos los medios utilizados en el estudio. Además son los únicos en el que se ha obtenido UFC en el medio KAA, por tanto podemos confirmar la presencia de *Staphylococcus*.
2. El alimento que presenta una menor variabilidad microbiológica, es el pimienta verde, ya que solo se han obtenido UFC en el medio general TSA.
3. La hortaliza de la cual se ha obtenido una mayor carga microbiana es la zanahoria, esto puede ser debido a que la zanahoria, es un alimento que se consume principalmente su raíz, que se encuentra enterrada, por lo que está en contacto con un mayor número de microorganismos.
4. El pimienta, la fresa y la col rizada, son las muestras con menos carga microbiana, esto puede ser debido a que estos alimentos presentan un pH ácido, sobre todo la fresa.
5. En el medio EMB, se puede ver como la mayor tasa de crecimiento se ha obtenido en los brotes tiernos. Sin embargo en puerro y berenjenas donde más crecimiento aparece es en el medio V-J. Por el contrario, en el MRS, las mayores cargas microbianas se han observado en la zanahoria.

6. Existe una mayor cantidad de UFC/ml en el medio general, mientras que en los medios selectivos, es decir, KAA, V-J, EMB y MRS, el número de UFC/ml es menor.
7. La mayoría de los microorganismos aislados en este trabajo, tanto en el medio general como en los medios selectivos, presentan una tinción de Gram, morfología y actividad catalasa que coincide con lo esperado.



## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Agar Eosina-Azul de Metileno (2017). *Scharlau Microbiology* - Ficha de Datos Técnicos. Referencia: 01-068
- Aranceta J, Pérez- Rodrigo C. (2006) Frutas, verduras y salud. Unidad de Nutrición Comunitaria, Servicio de Salud pública, Bilbao. Masson. Barcelona.
- Brackett R. (1994) Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed fruits and vegetables. In: Wiley RC, editor. Minimally processed refrigerated (MPR) fruits and vegetables. USA: *Van Nostrand Reinhold*; p. 269-312.
- Caldo KAA Presuntvo (2012). *Scharlau Microbiology* - Ficha de Datos Técnicos. Referencia: 02-263.
- Cámara M, Sánchez M, Torrija M. (2008) Salud y Nutrición. Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Grupo Elba. Madrid.
- Casp, A. y Abril, J. (2003). Procesos de conservación de alimentos (2ª ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Código Alimentario Español (1991). Colección textos legales. Madrid: Ed. Boletín Oficial del Estado.
- De Roever C. (1998) Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control*; 9:321–347.
- Doyle, M. P. and Erickson, M. C. (2008) Summer meeting 2007- the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 317-330.
- Dziedzinska, R., Vasickova, P., Hrdy, J., Slany, M., Babak, V., and Moravkova, M. (2018). Foodborne Bacterial, Viral, and Protozoan Pathogens in Field and Market Strawberries and Environment of Strawberry Farms. *Journal of food science*, 83(12), 3069-3075.
- Fellows, P. and Sala Trepas, F. (1993). *Tecnología del procesado de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Fessard, A., and Remize, F. (2019). Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and vegetables. *International journal of food microbiology*.

- Food and agriculture Organization of the United Nations world health Organization (2008) Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables, *Meeting Report*.
- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1993). *Microbiología de los alimentos* Ed 3º. Zaragoza. Acribia, S.A. Zaragoza
- Gourabathini, P., Brandl, M. T., Redding, K. S., Gundersson, J. H. and Berk, S. G. (2008) Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 2518-2525.
- Hayes, M., Barret, E., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. and Stanton, C. (2009) Evaluation of an antimicrobial ingredient prepared from a Lactobacillus acidophilus casein fermentate against Enterobacter sakazakii. *Journal of Food Protection*. 72:340-346.
- Heaton, J. C. and Jones, K. (2008) Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 613-626.
- Hernández, PE. (2010) Bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos. Universidad Complutense de Madrid.
- Hernández, P. E., Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Moreira, W. L., Sobrino, O. J., Fernández, M. F., & Sanz, B. (1993). Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiología Sem*, 9, 37-48.
- Hunter, C. J., Williams, M., Petrosyan, M., Guner, Y., Mittal, R. and Mock, D. (2009) Lactobacillus bulgaricus prevents intestinal epithelial cell injury caused by Enterobacter sakazakii-induced nitric oxide both in vitro and in the newborn rat model of necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*. 77:1031-1043.
- Hutson, A. M., Atmar, R. L. and Estes, M. K. (2004) Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiology*. 12: 279-286.
- Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiology Reviews* 12, 39–86.
- McDonnell, G., Russell, A.D., (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147–179.

- MRS Agar (2017). *Scharlau Microbiology* - Ficha de Datos Técnicos. Referencia : 064-PA0007
- Ramirez, J. C., Rosas, P., Velazquez, M. Y., ULLOA, J. A., and Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*.7:1
- Shaw, R. K., Berger, C. N., Feys, B., Knutton, S., Pallen, M. J. & Fraenkel, G. (2008) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 2908-2914.
- Skovgaard, N. (2007) New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 120:217-224
- Solomon, E. B., Yaron, S. y Matthews, K. R. (2002) Transmission of *Escherichia coli* 0157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*.68: 397-400.
- Stiles, M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- Puig, Y. Leyva, V. Rodríguez, A. Carrera, J. Molejón, P. Pérez, Y. and Dueñas, O. (2014). Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 13: 1 Ciudad de La Habana.
- Taban, B. M., and Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens?. *Anaerobe*, 17(6), 286-287.
- Todd E. (1989). Preliminary estimates of costs of food borne disease in the United States. *J Food Prot*; 52: 595-601
- Toledo de Árbol, M. (2016). Food preservation by high hydrostatic pressure treatments (Doctoral). Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales. Departamento de Ciencias de la Salud.
- Tryptone Soy Agar (TSA) (Eur. Ph.)(2017) Scharlau Microbiología - Ficha Técnica. Referencia: 064-PA0031
- Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. (1992). Compendium of methods microbiological examination of foods. *Washington: APHA*. p. 317.

- Vogel Johnson, Agar (2012). *Scharlau Microbiology* - Ficha de Datos Técnicos. Referencia : 01-206
- Vollmer G, Schenker D, Sturm N, Vrenden N. (1999). Frutas, verduras y hortalizas, legumbres. Elementos de bromatología descriptiva. *Acribia*, S.A. Zaragoza.