



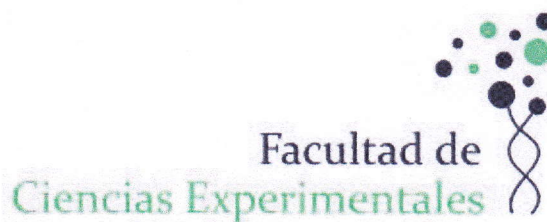
UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis Microbiológico de Alimentos Vegetales

Alumno: Gaspar Duro Fernández

Junio, 2020



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis Microbiológico de Alimentos Vegetales

Alumno: Gaspar Duro Fernández

Junio, 2020

ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
2.1 Los alimentos vegetales.....	3
2.2 Microorganismos en alimentos vegetales.....	4
3. Objetivos.....	6
4. Material y métodos.....	7
5. Resultados.....	13
5.1 Medios selectivos y carga microbiana.....	18
5.2 Características de cepas.....	24
5.3 Antibiograma.....	35
5.4 Comparación de recuentos.....	36
6. Discusión.....	37
7. Conclusiones.....	40
8. Bibliografía.....	41

1. RESUMEN

Los alimentos vegetales han tenido y siguen teniendo una enorme importancia, no solo como alimento para las personas y el ganado, sino también como fuente de compuestos bioactivos, sustancias que tienen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor. Sin embargo, estos alimentos también pueden ser fuente de enfermedades u otros problemas, debido a la presencia de microorganismos, patógenos o no, en ellos. El origen de estos microorganismos puede ser ambiental o debido a la manipulación de estos alimentos durante su procesamiento, y pueden tener consecuencias negativas, como estropear el alimento o convertirlo en una fuente de enfermedades. En el presente trabajo se han analizado 10 alimentos de origen vegetal (espinacas, zanahoria, acelga, lechuga, col, tomate, brócoli, pimiento verde, coliflor y pimiento rojo) para poner de manifiesto los microorganismos presentes en estos, tanto comprobando su carga microbiana total como caracterizando las distintas colonias encontradas mediante cultivo de medios selectivos, tinción de Gram, prueba de la catalasa, antibiograma y observación al microscopio.

Palabras clave: alimentos vegetales, microorganismos, carga microbiana, enterobacterias, *Staphylococcus*.

Abstract

Vegetables have had and still have an enormous importance, not only as food for people and cattle, but also as sources of bioactive compounds, substances that have a beneficial effect on the consumer's health. However, vegetables can also be a source for sickness or other problems, due to the presence of microorganisms, both pathogen and not, in them. These microorganisms can come from the ambient or from the manipulation of the crops during their processing, and they can have negative effects, like spoiling the food or turning it into a source for sickness. In this project, 10 vegetables have been analyzed (spinach, carrot, chard, lettuce, cabbage, tomato, broccoli, green pepper, cauliflower, and red pepper) to obtain information about the microorganisms present in them, by both determining the total microbial load and characterizing the different found colonies by culturing on selective culture mediums, Gram staining, catalase test, antibiogram and observation with a microscope.

Key words: vegetables, microorganisms, microbial load, enterobacteria, *Staphylococcus*

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Los alimentos vegetales

Según el Diccionario de la Lengua Española, "vegetal" se refiere a todo aquello que es "perteneciente o relativo a las plantas", o que es "obtenido de las plantas" . A su vez, un alimento es un "conjunto de sustancias que los seres vivos comen o beben para subsistir"

Un alimento vegetal es, por tanto, cualquier parte obtenida de una planta que se puede usar como alimento para cubrir las necesidades nutritivas.

Los alimentos vegetales han tenido y siguen teniendo una gran importancia para la humanidad. Aunque ya eran consumidos por los antiguos cazadores-recolectores, su domesticación y cultivo controlado, es decir, la aparición de la agricultura, hace unos 12.000 años, tuvo un profundo impacto en la forma de vida de los humanos, siendo un factor clave en la aparición de las primeras ciudades y, en consecuencia, de las primeras civilizaciones (National Geographic, 2019).

Según el *Informe del consumo alimentario en España 2018* publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en ese año se consumieron en España 90,5 kg de fruta por persona, mientras que el consumo de hortalizas, verduras y patatas fue de 85,1 kg por persona.

Aunque se pueden distinguir distintos tipos de alimentos de origen vegetal, como hortalizas, verduras, frutas, cereales y tubérculos, en este trabajo el foco de análisis está en las hortalizas.

El *Código Alimentario Español* define a las hortalizas como "cualquier planta herbácea hortícola en sazón que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinada". A su vez, distingue dos tipos de hortalizas: las verduras, cuya parte comestible consiste en sus partes verdes; y las legumbres frescas, que son los "frutos y semillas no maduros de las hortalizas leguminosas".

Las hortalizas son parte de los llamados "alimentos funcionales", entendidos como aquellos alimentos que poseen determinadas sustancias que, aunque no posean cualidades nutritivas, es decir, no aportan energía ni son nutrientes en sí mismos, si tienen un efecto, beneficioso en este caso, sobre funciones fisiológicas del consumidor, es decir, un efecto positivo sobre la salud. (Barragán Valbuena, 2010) Estas sustancias son llamadas compuestos bioactivos, e incluyen, por ejemplo, a los polifenoles, los fitoestrógenos, los isoprenoides, los ácidos grasos esenciales, etc. Un ejemplo de estos beneficios se ve en la capacidad de actuar como antioxidante

de los polifenoles, gracias a la cual ayudan a prevenir diversos problemas cardiacos (Drago Serrano, López López, y Sainz Espuñes, 2006).

Así, es clara la importancia social y para la salud que tienen los alimentos de origen vegetal. Precisamente por eso, evitar los posibles percances para la salud que puedan derivar del consumo de estos alimentos de este tipo que hayan sido contaminados por microorganismos patógenos es de gran interés público. Como es lógico, los alimentos vegetales siempre presentan cierta carga microbiana, pero es importante determinar la carga microbiana concreta para asegurar que no sea peligrosa, así como determinar qué tipos de microorganismos son los que la forman.

2.2 Microorganismos en alimentos vegetales

Aunque recientemente han aparecido una mayor cantidad de enfermedades producidas por microorganismos presentes en hortalizas, no hay, al menos actualmente, un método eficaz para eliminar la contaminación microbiológica en estos alimentos una vez ha tenido lugar. (Puig Peña et al, 2013) Por lo tanto, la única manera de prevenir estas incidencias es mediante el control durante la producción y durante la conservación de las condiciones de seguridad que eviten la contaminación microbiológica.

La carga microbiana, es decir, la cantidad de microorganismos presentes, de los alimentos vegetales depende de diversos factores. De forma natural, si no se toma ninguna medida, aparecen las siguientes cargas microbianas, expresadas en unidades formadoras de colonias por gramo, para estos ejemplos de alimentos de origen vegetal (*Tabla 1*). Esta microbiota proviene del suelo donde se cultiva, el agua usada para su riego, el aire, distintos insectos...

Alimento	UFC/g
Espárragos	10^4 - 10^5
Judías	$3 * 10^6$
Brócoli	10^4 - 10^5
Repollo	$4 * 10^3$ - 10^6
Zanahoria	$4 * 10^5$
Coliflor	10^4 - 10^5
Maíz	10^5 - 10^7
Guisantes	$3 * 10^5$ - $3 * 10^7$

Lechuga	$2 * 10^4$
Patatas	$8 * 10^4 - 3 * 10^7$
Judías verdes	$6 * 10^5 - 3 * 10^6$
Espinacas	$2 * 10^6 - 3 * 10^7$

Tabla 1: carga microbiana natural en algunos alimentos vegetales
Moreno J, *Control microbiológico en frutas y hortalizas*

Por supuesto, también aparece contaminación microbiana por culpa de los utensilios utilizados, la manipulación industrial de los alimentos y su mala conservación.

Existen tres tipos de factores que influyen sobre el tipo y la cantidad de microorganismos que pueden aparecer en los alimentos vegetales (Moreno, 2012):

- Factores intrínsecos, características propias del alimento, como los nutrientes que contiene, su pH...
- Factores extrínsecos, entendidos como las condiciones del ambiente en el que crece y se conserva el alimento. Sobre todo la temperatura y la humedad del ambiente.
- Factores implícitos, entendidos como las características propias de los microorganismos invasores.

Hablando específicamente de bacterias, algunas de las que normalmente se pueden encontrar en los alimentos vegetales son las enterobacterias, ya que son bacterias ubicuas muy presentes en la naturaleza. También es algo común la presencia de bacterias del ácido láctico, o BAL, las cuales, gracias a productos de su metabolismo como el ácido láctico o el peróxido de hidrógeno, actúan como inhibidores para ciertos microorganismos patógenos (Ramírez Ramírez et al, 2011).

La presencia de *Staphylococcus aureus* es también algo común, y aparece debido a la manipulación de estos alimentos.

Aparte de estas bacterias más "comunes", es posible la aparición de bacterias patógenas en los alimentos vegetales, sobre todo debido a la contaminación fecal o de aguas residuales (Carrillo y Audisio, 2007).

Algunas de las bacterias patógenas más comunes en alimentos vegetales son, por ejemplo, *Listeria Monocytogenes*, que provoca listeriosis; *Bacillus Cereus*, que provoca enfermedad diarreica, y *Clostridium botulinum*, causante del botulismo (Sánchez).

Esto convierte a los alimentos vegetales en posibles fuentes de transmisión de enfermedades. Por ello, es de gran interés público que exista un control sobre la presencia de microorganismos en estos alimentos. En el presente proyecto se ha trabajado con 10 alimentos vegetales frescos de distintas fruterías y supermercados con el fin de poner de manifiesto qué cantidad y qué tipos de microorganismos están presentes en ellos.

3. OBJETIVOS

- Obtener información sobre los microorganismos presentes en 10 alimentos vegetales.
- Determinar la carga microbiana.
- Identificar las colonias encontradas mediante distintas pruebas (tinción de Gram, prueba de la catalasa, antibiograma)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de crecimiento: se prepararon los siguientes medios, cada uno en un matraz con 800 ml de agua destilada y la cantidad de medio en polvo indicada para cada uno:

- TSA (40 g/l): 32 gramos.
- MRS (62 g/l): 49,6 gramos
- EMB (37'5 g/l): 30 gramos
- KAA (33 g/l); 26,4 gramos
- V- J (60 g/l) 48 gramos
- M-H (38 g/l): 30,4 gramos

Medio TSA (Tryptone Soy Agar): es un medio de cultivo general, muy rico en nutrientes, usado para para el cultivo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios, tanto patógenos como no. Entre los microorganismos posiblemente patógenos que pueden crecer en este medio, se encuentra el neumococo *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria*, *Brucella*, *Listeria*, *Corynebacteria*. (Panreac Applichem)

Medio MRS Agar (de Man, Rogasa y Sharpe): es un medio selectivo, preparado especialmente para favorecer el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*, y que también permite el crecimiento de *Pediococcus* y *Leuconostoc*, es decir, es un medio selectivo para bacterias del ácido láctico, mientras inhibe el crecimiento de otros tipos gracias al citrato de amonio en su composición. (Panreac Applichem)

Medio EMB Agar (Eosin Methylene Blue): es un medio selectivo que favorece el crecimiento de Enterobacterias, que forman colonias rosas, *Escherichia coli*, que forma colonias verdes, y otras bacterias como *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Panreac Applichem)

Medio Agar KAA Confirmativo (Kanamicina, Aesculina, Azida): medio selectivo usado para confirmar la presencia de Enterococos intestinales, mientras inhibe el crecimiento de otros tipos. Esa presencia de Enterococos es señal de contaminación fecal, y forman colonias translúcidas con un halo negro alrededor. (Condolab)

Medio V-J Agar (Vogel-Johnson): medio selectivo usado para detectar la presencia de Estafilococos, especialmente *Staphylococcus aureus*, que forma colonias negras con halos amarillos, así como *Staphylococcus Epidermidis*, que forma colonias grisáceas sin halos. (Condolab)

Medio M-H Agar (Mueller-Hinton): desarrollado originalmente para la detección de *Neisseria*, actualmente es usado para la realización de antibiogramas. (*Condolab*)

Solución salina: Bote con 700 ml de agua destilada y 6,3 gramos de sal (9%)

Tubos Eppendorf con 900 microlitros de solución, preparados en un bote con 50 ml de agua y 0,45 g de sal.

Tubos de ensayo con 3 ml de TSB por tubo, preparados en un matraz de 150 ml con 30 g/l, es decir, 4,5 gramos de TSB y 150 ml de agua destilada.

Pipetas, micropipetas, puntas de pipeta.

Gradillas

Papel de aluminio

Pinzas de madera

Matraces

Probetas

Algodón

Escobillones

Colorantes: Cristal Violeta, Lugol, Safranina.

Peróxido de Hidrógeno

Etanol

Báscula

Tubos Falcon

Mechero Bunsen

Asa de siembra

Autoclave

Parafilm

Discos de antibiótico: AMP10, E15, CN10

Stomacher y bolsas de Stomacher

5 gramos de cada uno de los siguientes alimentos: zanahoria, brócoli, acelga, col, pimiento verde, pimiento rojo, coliflor, espinacas, tomate, lechuga.

Preparación de medios: Se pesaron en la báscula las cantidades necesarias de medio en polvo (*Figura 1*) Se midió en una probeta la cantidad de agua destilada (normalmente 800 ml) necesaria. Se añadieron ambos componentes en un matraz, y estese agitó hasta obtener una disolución homogénea.

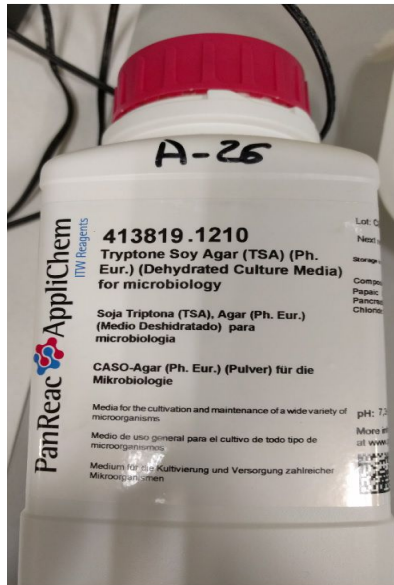


Figura 1: Bote de medio TSA en polvo

Tras esto, se taparon los matraces de algodón y papel de aluminio, como se ve en la Figura 3. Esto se repitió para los 6 medios distintos. Tras tener listos los matraces, estos se introdujeron en el autoclave para su esterilización, 20 minutos a 121°C cada uno, excepto los matraces con MRS, ya que la glucosa presente en este medio de cultivo se carameliza a esa temperatura, por lo que se puso a 115°C.



Figura 2: Matraz con medio M-H

Tras dejar que se atemperaran los matraces a 55 °C se pasó su contenido a placas de petri. Esto se realizó en condiciones de esterilidad, al lado de un mechero bunsen encendido, abriendo poco cada placa, vertiendo cierta cantidad de medio y

moviendo un poco la placa hasta que el medio cubriera toda la superficie.

Se prepararon frascos con solución salina: 700 ml de agua destilada, y 6,3 gramos de sal. De nuevo, usando la báscula y la probeta.

Aparte, se prepararon 50 ml de solución salina en un matraz (con 0,45 gramos de NaCl), repartidos en 50 tubos eppendorf con 900 microlitros cada uno. También se prepararon 50 tubos TSB con 3 ml cada uno, preparados en un matraz de 150 ml de agua con 4,5 gramos de TSB.

Tras todos estos preparativos, comenzó el análisis en sí: de cada alimento fueron pesados 5 gramos, que fueron añadidos a una bolsa de STOMACHER, con 45 ml de solución salina (de los frascos preparados con anterioridad) (*Figura 3*) Se apretaron y masajearon las bolsas hasta que el agua fue enturbiada, o bien se introdujo en el aparato STOMACHER en el caso de los alimentos más duros. A partir de este punto se trabajó siempre en condiciones de esterilidad gracias al mechero Bunsen. Esta solución salina turbia fue pasada a un tubo falcon, rotulado y guardado (*Figura 4*)



Figura 3: Bolsa de STOMACHER con 5 gramos de acelga



Figura 4: Tubos Falcon con diluciones procedentes de distintos alimentos vegetales

Se realizaron entonces diluciones seriadas: con 4 tubos eppendorf, de los preparados con anterioridad con 900 microlitros de solución salina, por alimento, marcados como -1, -2, -3 y -4. El -1 fue hecho dos veces, para tener suficiente. Se pasan 100 microlitros de la disolución original (el tubo Falcon) al tubo -1. Se agita, y se pasan 100 microlitros de este al tubo -2. Así sucesivamente, hasta obtener 5

diluciones distintas de concentración decreciente.

Se cogieron y marcaron las placas de medios preparadas con anterioridad: 4 placas de TSA, cada una para cada dilución -1, -2, -3, y -4. Por duplicado: 8 placas de TSA. Para cada medio selectivo se prepararon dos placas, para las diluciones -1 y 0. La dilución 0 es el tubo falcon original, al que se vertió el contenido de la bolsa de STOMACHER. También por duplicado: 4 placas por medio.

Con micropipeta, se cogieron 100 microlitros de la dilución correspondiente, se colocaron en la placa, y se extendió sobre la superficie usando un asa de siembra esterilizada tras cada uso con el mechero.

Tras todo esto, se dejaron las placas en estufas, todos los medios a 37 °C (excepto el MRS, que se puso a 30°C) durante 24-48 horas.

Tras este tiempo se comprobó, para cada alimento, en que medios se había dado crecimiento de microorganismos, se seleccionó de cada medio la dilución con una cantidad de colonias más conveniente (entre 30 y 300), se contaron las colonias y se calcularon las UFC (unidades formadoras de colonias).

Las unidades formadoras de colonias se calculan con la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = (\text{n}^\circ \text{ de colonias} * \text{factor de dilución} * 10) / \text{volumen}.$$

El n° de colonias se determina simplemente contando en la placa. El factor de dilución depende de la dilución usada: si usamos la -1, es 10. -2, 10^2 ; -3, 10^3 ...

El 10 es un factor de dilución extra que afecta a todos, ya que inicialmente diluimos 5 gramos de alimento en 45 ml de solución salina. El volumen corresponde al que se sembró en placa, 0,1 ml para todos también.

Además, se buscaron distintos tipos de colonias en cada medio, y cada tipo fue sometido a tres pruebas: tinción de Gram, prueba de la catalasa, y antibiograma.

Para la tinción de GRAM:

1. Se coge muestra de la colonia con un asa circular esterilizada
2. Se vierte una gota de agua destilada sobre un porta.
3. Se extiende la muestra de la colonia sobre la gota de agua y sobre el porta.
4. Se deja secar la gota, y se fija la muestra con el mechero. Se deja enfriar.
5. Se aplica colorante Cristal Violeta 2 minutos.
6. Se aplica el Lugol que, actuará como mordiente, durante 2 minutos.
7. Se decolora con etanol.
8. Se lava con agua
9. Se aplica colorante safranina 3 minutos

10. Se deja secar y se observa al microscopio.

En el microscopio se verán los microorganismos: cocos, bacilos, levaduras... Además, si son azules o violetas, son Gram +. Si son rosas, son Gram -. (Figura 6 y 7)

Para comprobar la actividad de la catalasa, con un asa circular, esterilizada en mechero, se coge una muestra de la colonia a investigar. En un portaobjetos se deposita la muestra. A continuación se vierte H₂O₂ sobre la muestra. Si burbujea, la colonia corresponde a microorganismos con actividad catalasa +. Si no, catalasa -. La prueba de la catalasa sirve para distinguir entre *Staphylococcus* (catalasa +)

Con el antibiograma se busca determinar la sensibilidad/resistencia de las cepas obtenidas frente a distintos antibióticos. Para hacerlo, se coge una muestra de la colonia con una punta de pipeta, y se resuspende en un tubo de TSB, preparado con anterioridad, que se deja en una estufa 24 horas a 37 ° (30° si es procede de MSR). Tras este tiempo, se prepararon placas de medio M-H con un disco de antibiótico central. En cada placa se colocan 6 cepas. Se prueban 3 antibióticos distintos, con un antibiótico por placa, para cada cepa. Esta prueba se realizó a 30 de las cepas obtenidas, con preferencia por aquellas provenientes de medios selectivos, intentando tener muestras representativas de cada alimento y cada medio. Los antibióticos usados fueron Ampicilina (AMP) (discos de 10 microgramos); Eritromicina (E) (discos de 15 microgramos); Gentamicina (CN) (discos de 10 microgramos).

Se recogió muestra del tubo de TSB con un escobillón esterilizado, y se extendió desde el centro de la placa, lo más cerca posible del disco pero sin tocarlo, hacia el exterior. Este proceso fue llevado a cabo para las 30 cepas en tres placas distintas con cada antibiótico. A continuación, las placas se dejaron 24 horas en una estufa a 37 ° C. Tras esto se observa el crecimiento: debe haber una gruesa línea de crecimiento de microorganismos desde el centro hacia fuera. Si la línea aparece completa, la cepa presenta resistencia total al antibiótico. Si es sensible al antibiótico, el comienzo de la línea no presentará crecimiento. Se midió entonces la longitud en centímetros de esta sección. Como esto es el radio y queremos saber el diámetro, se multiplica por 2. Esto es un indicador de la sensibilidad al antibiótico.

5.RESULTADOS

Uno de los resultados obtenidos gracias a estos análisis fue la carga microbiana de cada alimento, expresada en Unidades formadoras de colonias por gramo de alimento para cada tipo de medio empleado (*Tabla 1*).

Las pruebas de caracterización de cepas encontradas en los alimentos, entre las que se encuentran el medio en el que han crecido, tinción de Gram (*Figura 5 y 6*) morfología (*Figuras 7, 8, 9*), catalasa, y antibiograma (*Figura 10*) se encuentran resumidas en la *Tabla 2*.

Alimento	TSA	MRS	EMB	KAA	V-J	M-H
Espinacas	$2,87 \cdot 10^7$	$1,65 \cdot 10^4$	+++	-	$9,2 \cdot 10^3$	-
Zanahoria	$2,48 \cdot 10^7$	$8,5 \cdot 10^3$	+++	-	-	-
Acelga	$2,9 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	+++	-	$1,9 \cdot 10^4$	-
Lechuga	$2,22 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^3$	$2,33 \cdot 10^5$	-	-	-
Col	$9,3 \cdot 10^5$	-	$2,37 \cdot 10^4$	-	-	-
Tomate	$5 \cdot 10^3$	-	-	-	$2 \cdot 10^2$	-
Brócoli	$2,2 \cdot 10^5$	-	$5,4 \cdot 10^4$	-	$3 \cdot 10^2$	-
Pimiento V.	$9 \cdot 10^3$	-	$1,1 \cdot 10^4$	-	$2 \cdot 10^2$	-
Coliflor	$1,6 \cdot 10^4$	-	-	-	$4 \cdot 10^2$	-
Pimiento R.	$1,8 \cdot 10^4$	-	-	-	$3 \cdot 10^2$	-

Tabla 1: Unidades formadoras de colonias de cada alimento en cada medio

ALIMENTO	MEDIO	MORFOLOGÍA	TINCIÓN DE GRAM	CATALAS A	ANTIBIOGRAM A
Espinacas	VJ	Bacilos	+	+	CN10: 0,8 cm E15: 0,4 cm AMP10: 0
	MRS	Cocos	+	+	CN10: 0 E15: 0 AMP10: 0
	EMB	Bacilos	-	+	CN10: 0,2 cm E15: 0 AMP10: 0
		Bacilococos	+	+	CN10: 0,6 cm E15: 0,6 cm AMP10: 0
Zanahoria	TSA	Cocobacilos	-	+	
	MRS	Bacilos	+	-	CN10: 1,8 cm E15: 0,2 cm AMP10: 0
		Cocos	-	-	CN10: 1,8 cm E15: 0 AMP10: 0
	EMB	Cocobacilos	-	+	CN10: 0,4 cm E15: 1 cm AMP10: 0
Acelga	TSA				
	V-J	Cocos	+	+	CN10: 1,4 cm E15: 1,6 cm AMP10: 0,8 cm
		Levaduras		+	CN10: 0 E15: 0 AMP10: 0
	MRS	Cocobacilos	+	+	CN10: 0 E15: 0,6 cm AMP10: 0,4 cm
		Cocobacilos	-	-	CN10: 0,4 cm E15: 1,4 cm AMP10: 0
	EMB	Bacilos	-	+	CN10: 1,4 cm E15: 0 AMP10: 0
		Bacilos	-	+	CN10: 0,6 cm E15: 0 AMP10: 0

Lechuga	TSA	Cocobacilos	-	+	
	MRS	Bacilos	+	-	CN10: 1,4 cm E15: 1,2 cm AMP10: 0
	EMB	Cocobacilos	-	+	CN10: 1 cm E15: 0 AMP10: 0
		Cocobacilos	-	+	CN10: 1,2 cm E15: 0 AMP10: 0
Col	TSA	Cocos	+	+	
		Cocos	+	+	
	EMB	Bacilos	-	+	CN10: 1 cm E15: 0 AMP10: 0
		Cocobacilos	-	+	CN10: 1 cm E15: 0 AMP10: 0
		Bacilos	-	-	
Tomate	TSA	Cocos	+	+	
	V-J	Cocos	+	-	CN10: 1 cm E15: 0 AMP10: 0
Brócoli	TSA	Bacilos	-	+	
	V-J	Cocos	+	-	CN10: 1,6 cm E15: 1,8 cm AMP10: 2 cm
		Bacilos	+	-	
	EMB	Bacilos	+	+	CN10: 0,2 cm E15: 0 AMP10: 0
		Bacilos	-	+	CN10: 0,8 cm E15: 0,4 cm AMP10: 0
Pimiento Verde	TSA	Bacilos	+	+	
		Cocos	+	+	
		Cocos	+	+	
	EMB	Bacilos	+	+	CN10: 1,3 cm E15: 0 AMP10: 0
					CN10: 1,6 cm

Coliflor	TSA	Bacilos	+	+	E15: 2,6 cm AMP10: 3 cm
		Cocos	+	+	CN10: 2,2 cm E15: 0 AMP10: 1,2 cm
		Cocos	+	+	CN10: 1,8 cm E15: 0 AMP10: 0
	V-J	Cocos	+	-	CN10: 1,2 cm E15: 0 AMP10: 2 cm
Pimiento rojo	TSA	Cocos	+	+	CN10: 0,8 cm E15: 0 AMP10: 0
		Cocos	+	+	CN10: 1,4 cm E15: 0 AMP10: 1,2 cm
	V-J	Cocos	+	+	CN10: 0,6 cm E15: 0 AMP10: 0

Tabla 2: Resultados de las pruebas de caracterización

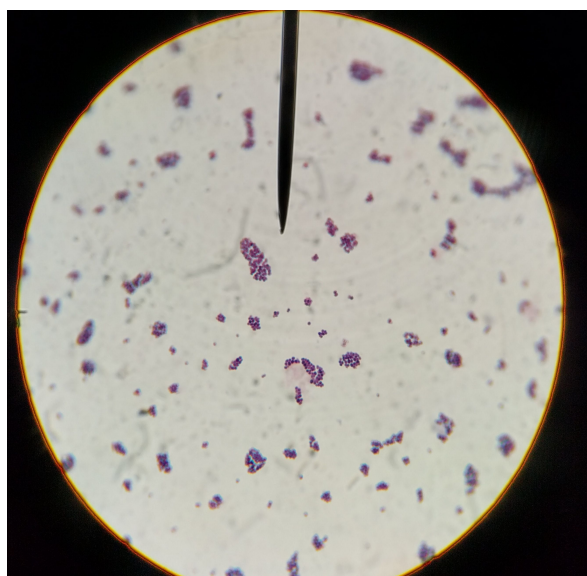


Figura 5: Ejemplo de tinción de Gram +

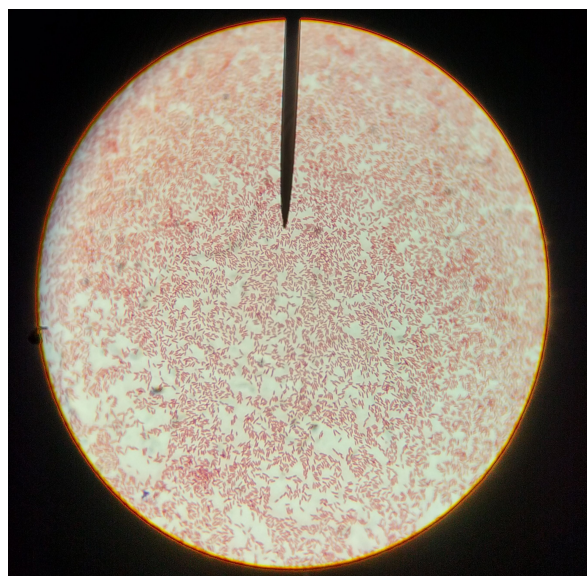


Figura 6: Ejemplo de tinción de Gram -

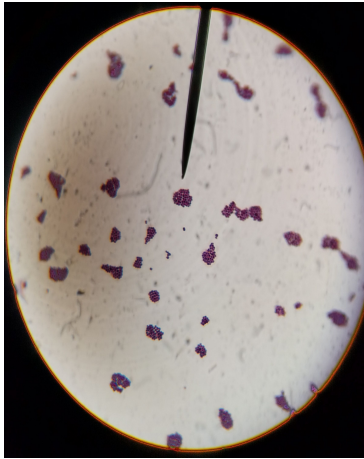


Figura 7: Tinción de colonia obtenida de col en medio TSA. Ejemplo de morfología de cocos

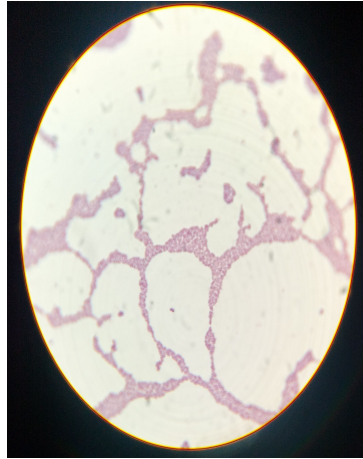


Figura 8: Tinción de colonia obtenida de acelga en medio MRS. Ejemplo de morfología de cocobacilos

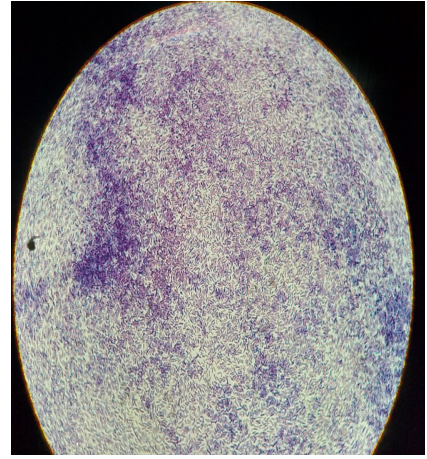


Figura 9: Tinción de colonia obtenida de brócoli en medio EMB. Ejemplo de morfología de bacilos

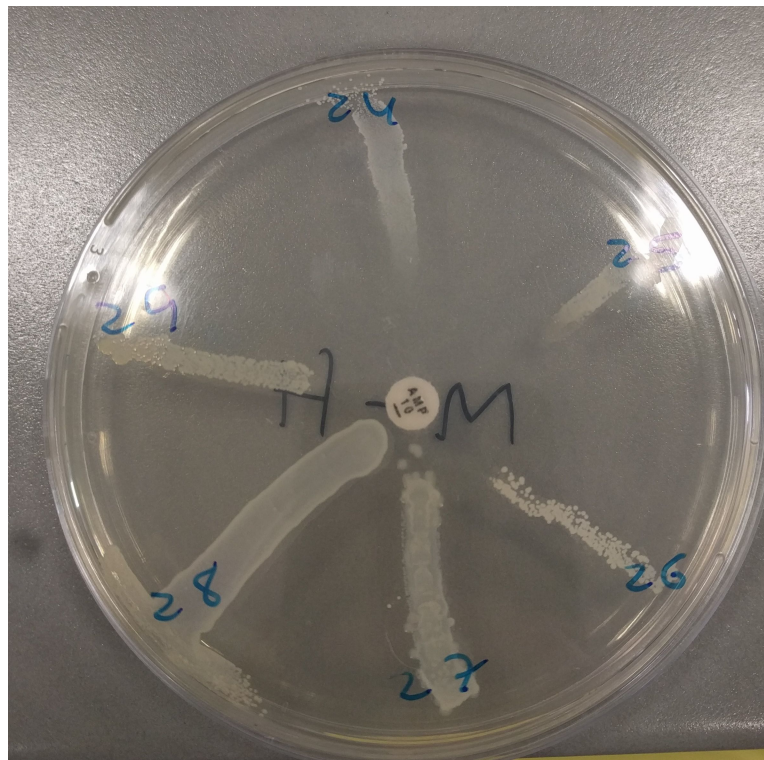


Figura 10: Ejemplo de antibiograma

5.1 Medios selectivos y carga microbiana

Espinacas

Para este alimento, ha habido crecimiento en los medios TSA, V-J, MRS y EMB. Los recuentos de cada medio se encuentran reflejados en la *Tabla 3*

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$2,87 \cdot 10^7$
V-J	$9,2 \cdot 10^3$
MRS	$1,65 \cdot 10^4$
EMB	+++

Tabla 3: recuento microbiano en espinacas

El crecimiento en medio V-J (*Figura 12*) sugiere la presencia de estafilococos, y las colonias, son negras con halos amarillos, por lo que se trata de *Staphylococcus aureus*; y debido al crecimiento en MRS (*Figura 13*), hay presencia de bacterias lácticas. Ya que hay crecimiento en EMB (*Figura 11*), hay presencia de enterobacterias.

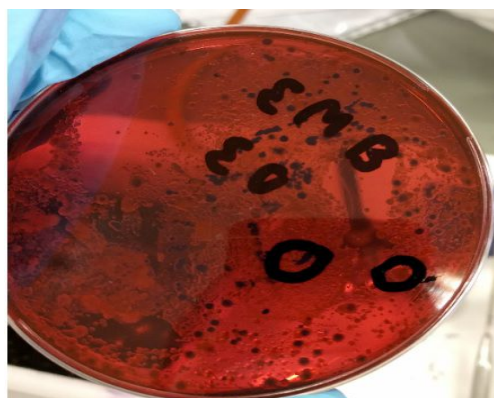


Figura 11: Colonias procedentes de espinacas en medio EMB



Figura 12: Colonias procedentes de espinacas en medio V-J



Figura 13: Colonias procedentes de espinacas en medio MRS

Zanahoria

Ha habido crecimiento en TSA, MRS y EMB. Los recuentos de cada medio están recogidos en la *Tabla 4*.

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$2,48 \cdot 10^7$
MRS	$8,5 \cdot 10^3$
EMB	+++

Tabla 4: recuento microbiano en zanahoria.

En el medio TSA se observan colonias de distintos tamaños y colores (*figura 14*). El crecimiento en MRS (*figura 15*) indica bacterias lácticas, mientras que el crecimiento en EMB indica la presencia de enterobacterias.



Figura 14: Colonias procedentes de zanahoria en medio TSA



Figura 15: Colonias procedentes de zanahoria en medio MRS

Acelga: MRS, V-J, TSA -3, EMB

Para este alimento ha habido crecimiento en TSA, MRS, EMB y V-J. Los recuentos de cada medio están recogidos en la *Tabla 5*

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$2,9 \cdot 10^6$
V-J	$1,9 \cdot 10^4$
MRS	$1,2 \cdot 10^4$
EMB	+++

Tabla 5: recuento microbiano de acelga

El crecimiento en medio V-J, ya que se observan colonias negras con halos amarillos, hay presencia de *Staphylococcus aureus* (*Figura 16*). El crecimiento en MRS implica la presencia de bacterias lácticas (*Figura 17*). La presencia de colonias en medio EMB implica la presencia de enterobacterias (*Figura 18*)

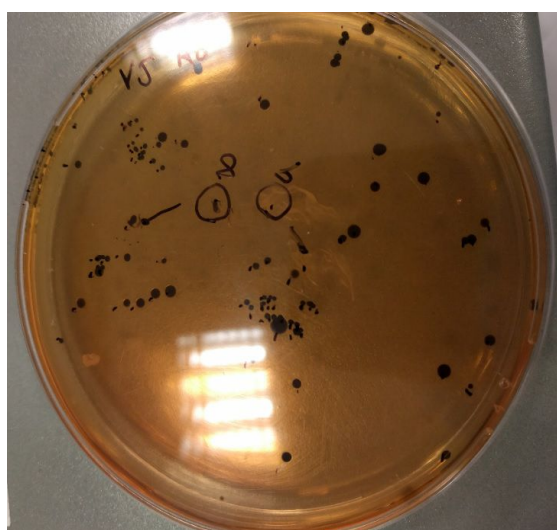


Figura 16: Colonias procedentes de acelga en medio V-J

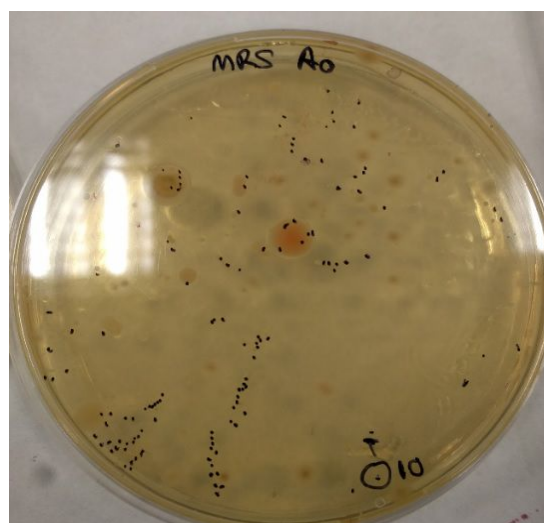


Figura 17: Colonias procedentes de acelga en medio MRS



Figura 18: Colonias procedentes de acelga en medio EMB

Lechuga

Ha habido crecimiento en TSA, EMB y MRS. Los recuentos bacterianos de cada medio están recogidas en la *Tabla 6*

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$2,22 \cdot 10^6$
MRS	$3,4 \cdot 10^3$
EMB	$2,33 \cdot 10^5$

Tabla 6: recuento microbiano de lechuga

En la placa de TSA han aparecido, además de las colonias bacterianas normales, diversas estructuras formadas por hongos (*Figura 19*). El crecimiento en MRS implica la presencia de bacterias lácticas (*Figura 20*). El crecimiento en EMB quiere decir que hay enterobacterias (*Figura 21*).

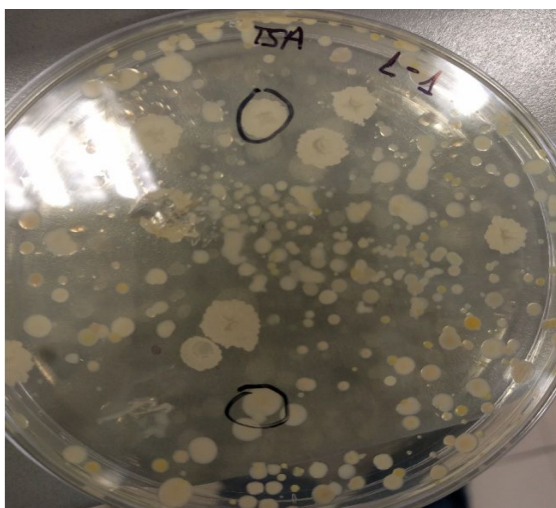


Figura 19: Colonias procedentes de lechuga en medio TSA

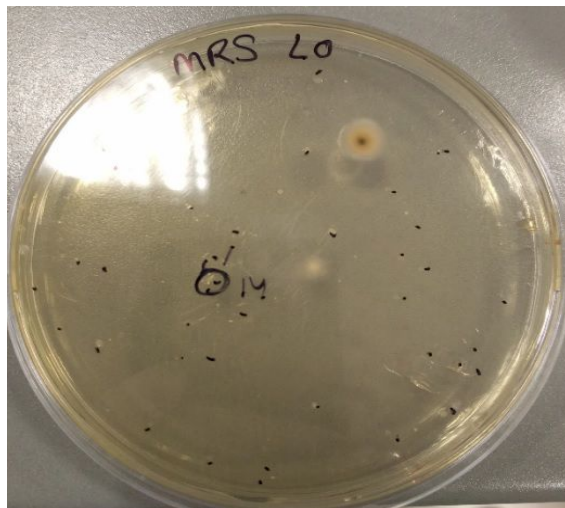


Figura 20: Colonias procedentes de lechuga en medio MRS

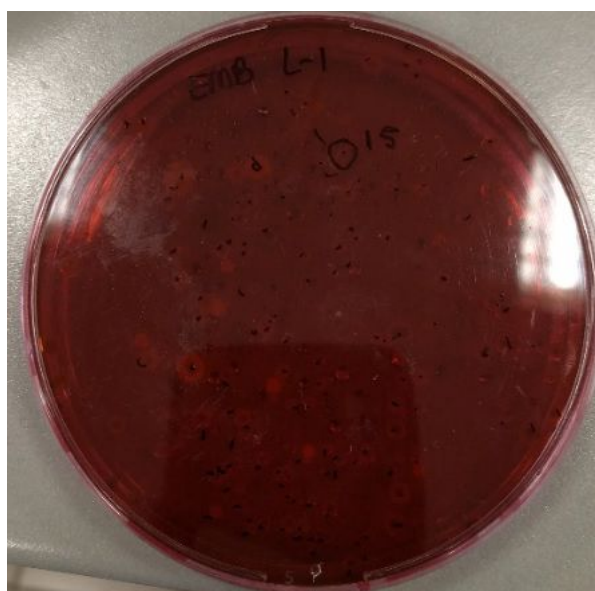


Figura 21: Colonias procedentes de lechuga en medio EMB

Col

Para este alimento ha habido crecimiento en TSA y en EMB. El recuento está reflejado en la *Tabla 7*

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$9,3 \cdot 10^5$
EMB	$2,37 \cdot 10^4$

Tabla 7: recuento microbiano de col.

El crecimiento en EMB implica la presencia de Enterobacterias.

Tomate

Ha habido crecimiento en TSA y V-J. El recuento microbiano está reflejado en la *Tabla 8*.

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$5 \cdot 10^3$
V-J	$2 \cdot 10^2$

Tabla 8: recuento microbiano en tomate

El crecimiento V-J implica la presencia de *Staphylococcus*. Sin embargo, el recuento es bastante bajo, tan solo han aparecido dos colonias en la dilución 0

Brócoli

Ha habido crecimiento en TSA, V-J y EMB. El recuento microbiano está reflejado en la *Tabla 9*

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$2,2 \cdot 10^5$
V-J	$3 \cdot 10^2$
EMB	$5,4 \cdot 10^4$

Tabla 9: recuento microbiano en brócoli

En TSA ha aparecido un único tipo de colonia . La presencia de colonias en el medio V-J implica la presencia de *Staphylococcus* . El crecimiento en EMB implica la presencia de Enterobacterias.

Pimiento verde

Ha habido crecimiento en TSA, V-J y EMB. El recuento microbiano está reflejado en la *Tabla 10*

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$9 \cdot 10^3$
V-J	$2 \cdot 10^2$
EMB	$1,1 \cdot 10^4$

Tabla 10: recuento microbiano en pimiento verde

En la placa de TSA se observan dos tipos de colonias. El crecimiento en V-J implica la presencia de *Staphylococcus*, aunque tan solo han aparecido dos colonias. La presencia de colonias en EMB implica la presencia de Enterobacterias.

Coliflor

Ha habido crecimiento en TSA y V-J. El recuento microbiano está reflejado en la *Tabla 11*.

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$1,6 \cdot 10^4$
V-J	$4 \cdot 10^2$

Tabla 11: recuento microbiano en coliflor

El crecimiento en medio V-J implica la presencia de *Staphylococcus*, aunque el recuento es más bien bajo.

Pimiento rojo

Ha habido crecimiento en TSA y V-J. El recuento microbiano está reflejado en la *Tabla 12*

Medio de cultivo	UFC/g
TSA	$1,8 \cdot 10^4$
V-J	$3 \cdot 10^2$

Tabla 12: recuento microbiano en pimiento rojo

En medio TSA aparecen dos tipos de colonias. El crecimiento en medio V-J implica la presencia de *Staphylococcus*, pero el recuento es bajo-

5.2 Características de cepas

Para cada alimento se encuentran reflejadas en las tablas enumeradas de la 13 a 22 cada una de las colonias encontradas y analizadas. Se indica el medio, la morfología de la cepa, el resultado de la tinción de Gram, y el resultado de la prueba de la catalasa. Las observaciones al microscopio de las colonias analizadas se encuentran en las figuras numeradas de la 22 a 54.

Para cada alimento se analizaron preferentemente las colonias procedentes de medios selectivos, y si no había suficientes, se analizaron las de medio TSA.

Espinacas

Se analizaron una colonia procedente de medio V-J, otra procedente medio MRS y dos procedentes de medio EMB.

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
VJ	Bacilos	+	+
MRS	Cocos	+	+
EMB	Bacilos	-	+
	Bacilococos	+	+

Tabla 13: caracterización de cepas encontradas en espinacas

La colonia analizada de medio Vogel Johnson no presenta morfología de coco, propia de los estafilococos. Seguramente se trate de contaminación.



Figura 22: Vista al microscopio de colonia procedente de espinacas cultivada en medio V-J

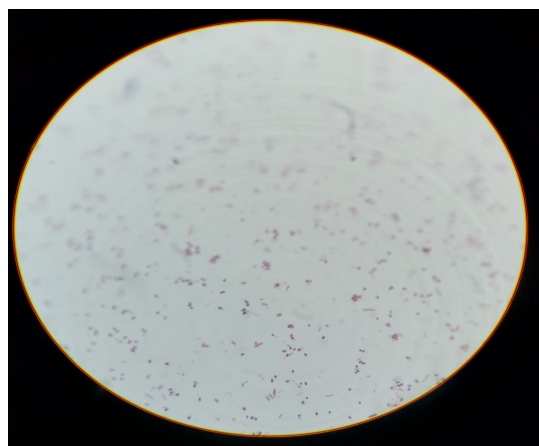


Figura 23: Vista al microscopio de colonia procedente de espinacas cultivada en medio EMB

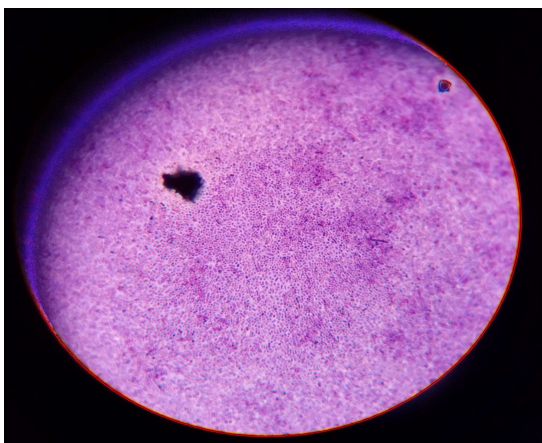


Figura 24: Vista al microscopio de colonia procedente de espinacas en medio EMB

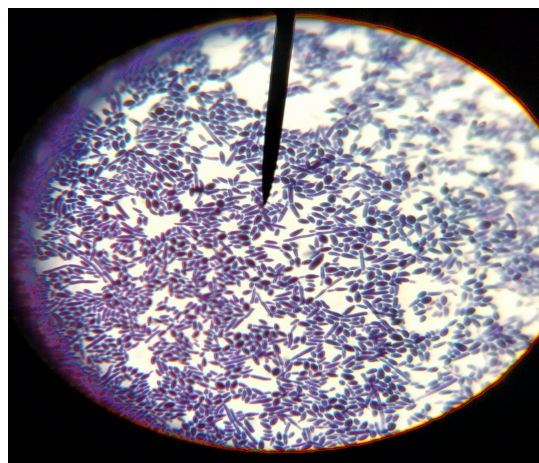


Figura 25: Vista al microscopio de colonia procedente de espinacas en medio MRS

La colonia analizada del medio MRS presenta actividad catalasa, lo cual es raro en bacterias del ácido láctico, aunque no imposible.

Zanahoria

Se analizaron una colonia de medio TSA, dos de medio MRS y una de medio EMB.

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Cocobacilos	-	+
MRS	Bacilos	+	-
	Cocos	+	-
EMB	Cocobacilos	-	+

Tabla 14: características de colonias aisladas de zanahoria.

La actividad catalasa negativa de las colonias MRS es esperada. Puede tratarse de lactobacillus en el caso de la primera colonia, y de otra bacteria láctica en el caso de la segunda.

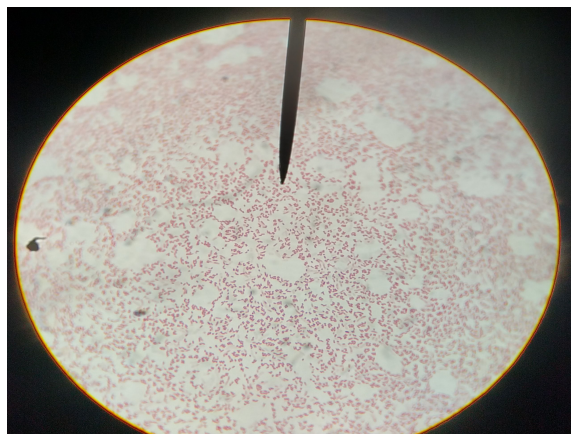


Figura 26: Vista al microscopio de colonia procedente de zanahoria en medio TSA

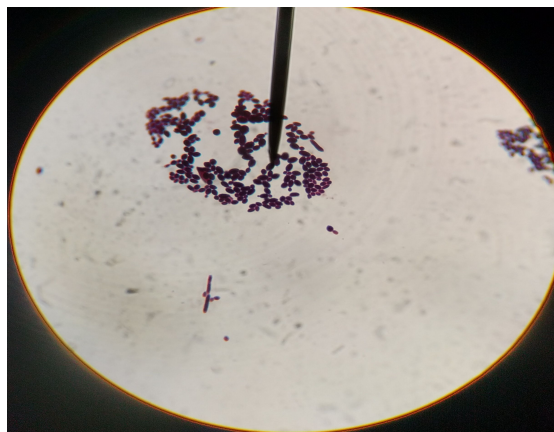


Figura 27: Vista al microscopio de colonia procedente de zanahoria en medio MRS

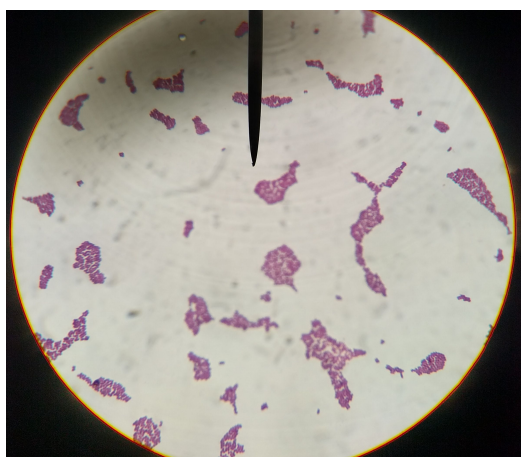


Figura 28: Vista al microscopio de colonia procedente de zanahoria en medio MRS

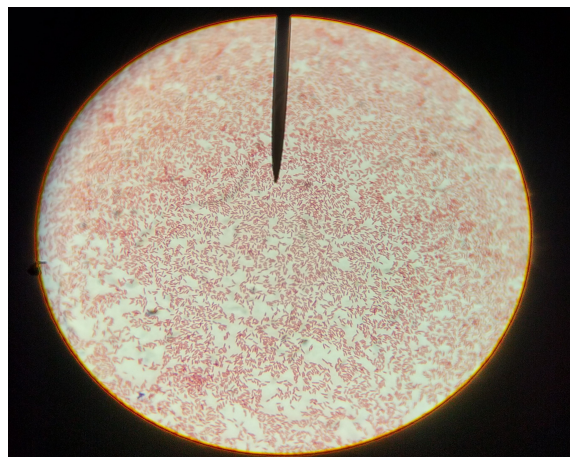


Figura 29: Vista al microscopio de colonia procedente de zanahoria en medio EMB

Acelga

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
V-J	Cocos	+	+
MRS	Cocobacilos	+	+
	Cocobacilos	-	-
EMB	Bacilos	-	+
	Bacilos	-	+

Tabla 15: características de colonias aisladas de acelga.

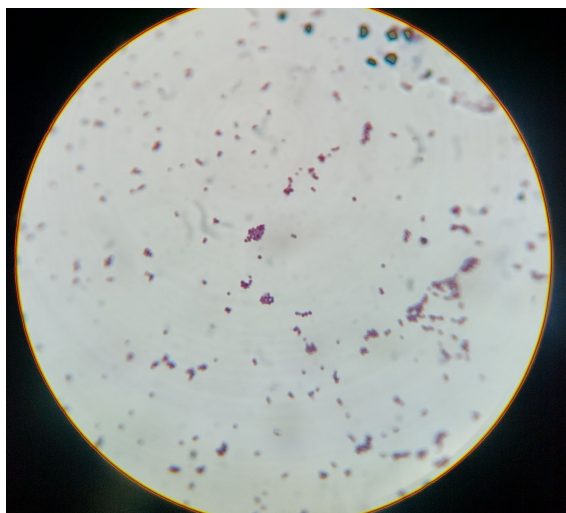


Figura 30: Vista al microscopio de colonia procedente de acelga en medio V-J

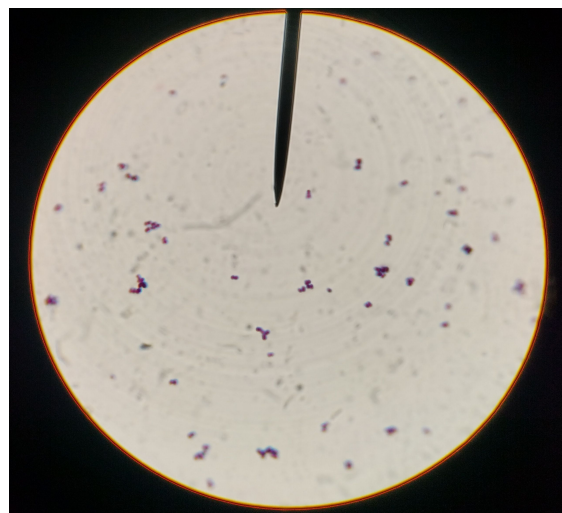


Figura 31: Vista al microscopio de colonia procedente de acelga en medio MRS

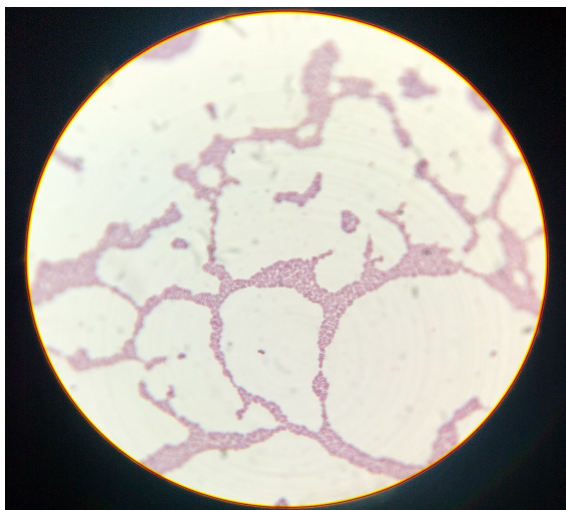


Figura 32: Vista al microscopio de colonia procedente de acelga en medio MRS

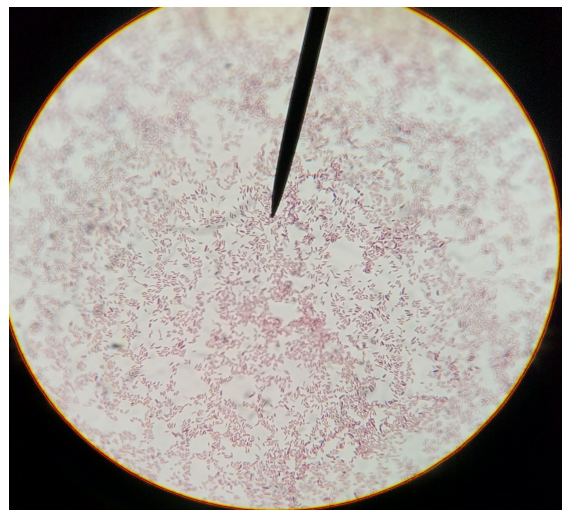


Figura 33: Vista al microscopio de colonia procedente de acelga en medio EMB

La tinción de Gram y el resultado de la actividad catalasa de la colonia aislada de V-J

indica que puede tratarse de *Staphylococcus aureus*. Los resultados de las colonias EMB sugieren que puede tratarse de *E. coli*, aunque las colonias no exhibían el color verde característico, por lo que puede tratarse de otras enterobacterias.

Lechuga

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Cocobacilos	-	+
MRS	Bacilos	+	-
EMB	Cocobacilos	-	+
	Cocobacilos	-	+

Tabla 16: características de colonias aisladas de lechuga

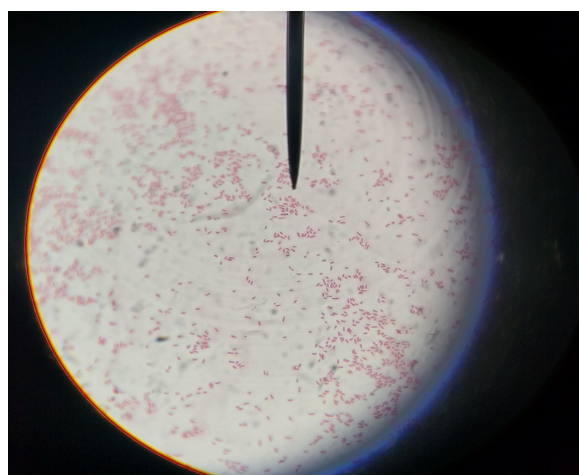


Figura 34: Vista al microscopio de colonia procedente de lechuga en medio TSA

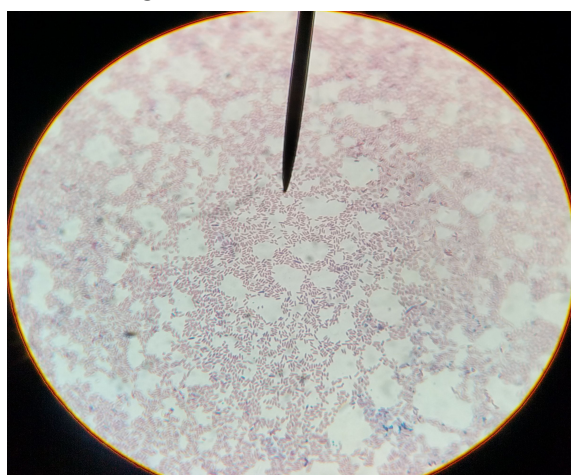


Figura 35: Vista al microscopio de colonia procedente de lechuga en medio EMB

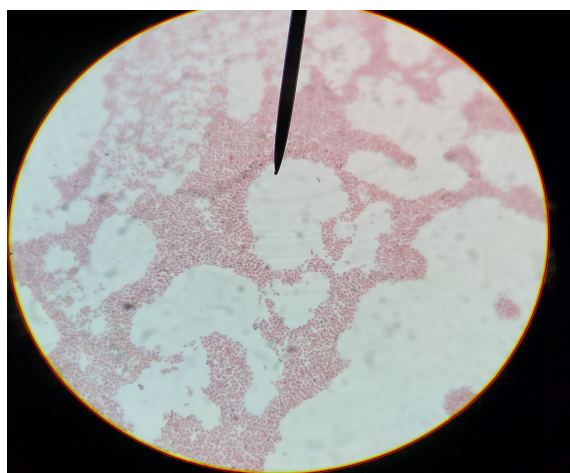


Figura 36: Vista al microscopio de colonia procedente de lechuga en medio EMB

Col

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Cocos	+	+
	Cocos	+	+
EMB	Bacilos	-	+
	Cocobacilos	-	+
	Bacilos	-	-

Tabla 17: características de colonias aisladas de col

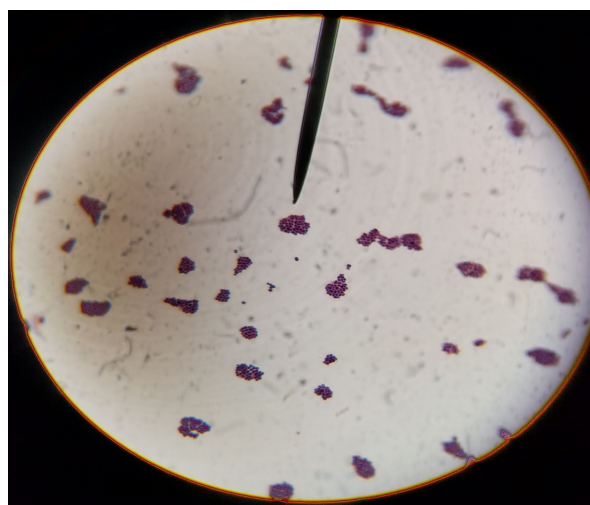


Figura 37: Vista al microscopio de colonia procedente de col en medio TSA

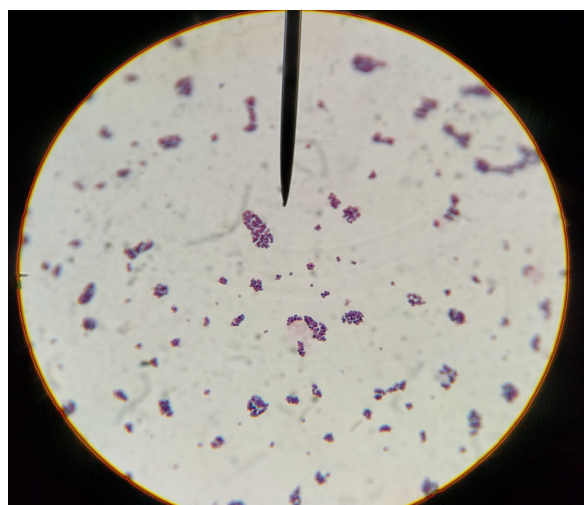


Figura 38: Vista al microscopio de colonia procedente de col en medio TSA

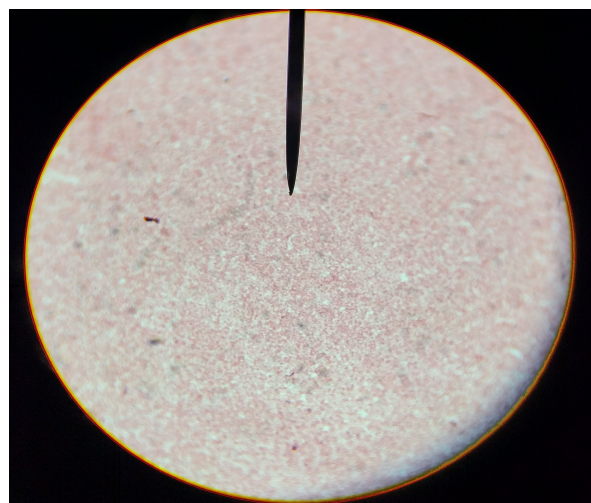


Figura 39: Vista al microscopio de colonia procedente de col en medio EMB

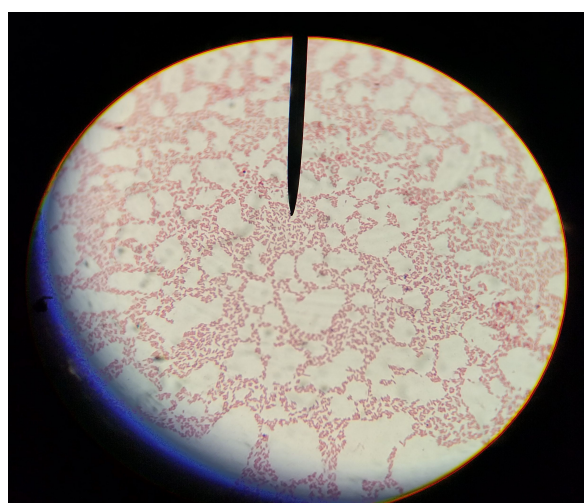


Figura 40: Vista al microscopio de colonia procedente de col en medio EMB

Tomate

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Cocos	+	+
V-J	Cocos	+	-

Tabla 18: características de colonias aisladas de tomate

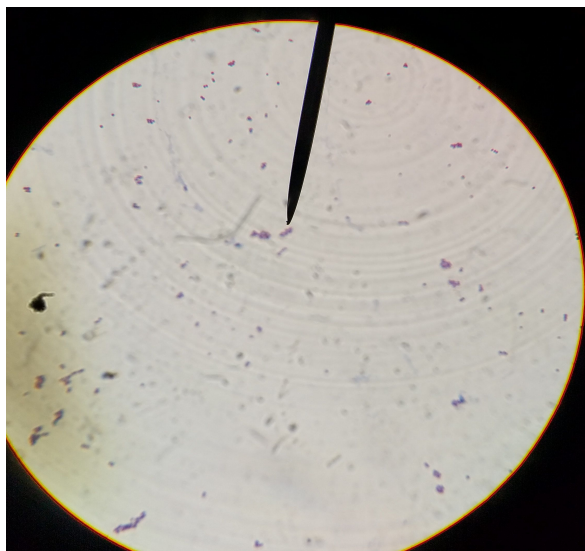


Figura 41: Vista al microscopio de colonia procedente de tomate en medio TSA

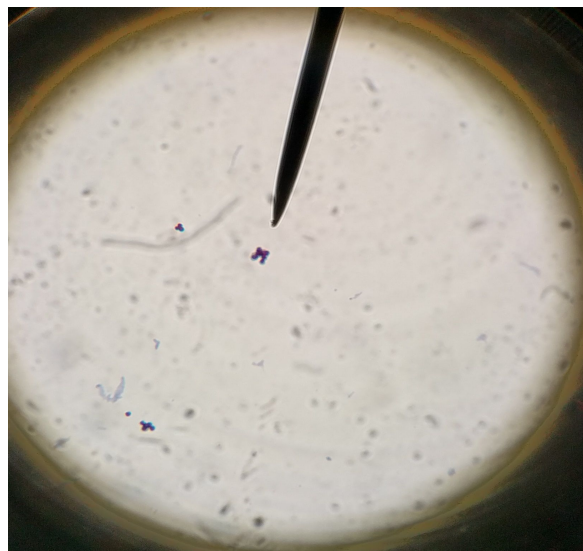


Figura 42: Vista al microscopio de colonia procedente de tomate en medio V-J

Brócoli

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Bacilos	-	+
V-J	Cocos	+	-
	Bacilos	+	-
EMB	Bacilos	+	+
	Bacilos	-	+

Tabla 19: características de colonias aisladas de brócoli

La presencia de bacilos en el medio V-J seguramente se deba a una contaminación.

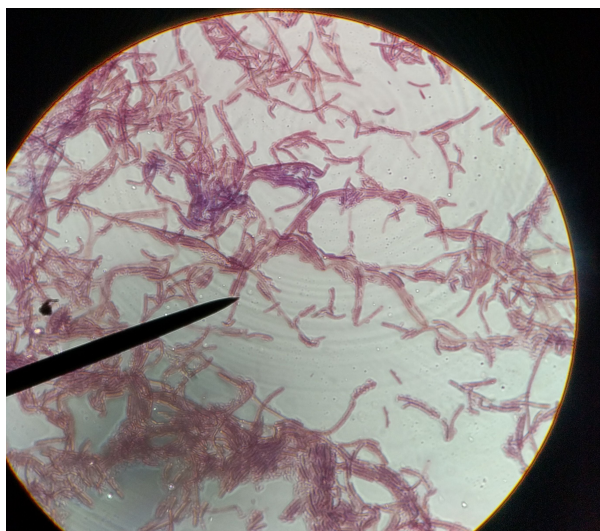


Figura 43: Vista al microscopio de colonia procedente de brócoli en medio TSA

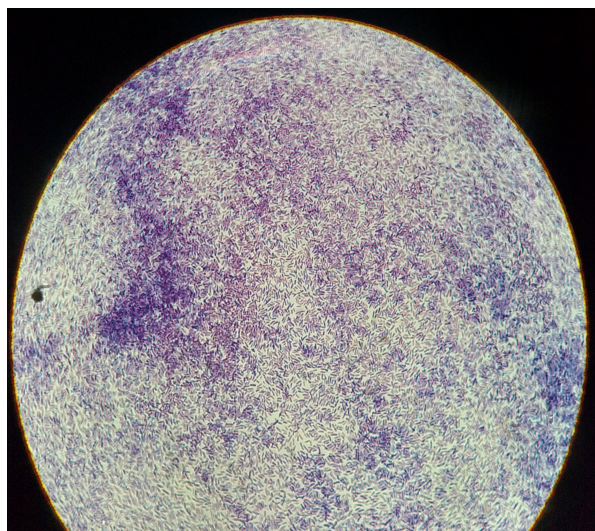


Figura 44: Vista al microscopio de colonia procedente de brócoli en medio EMB

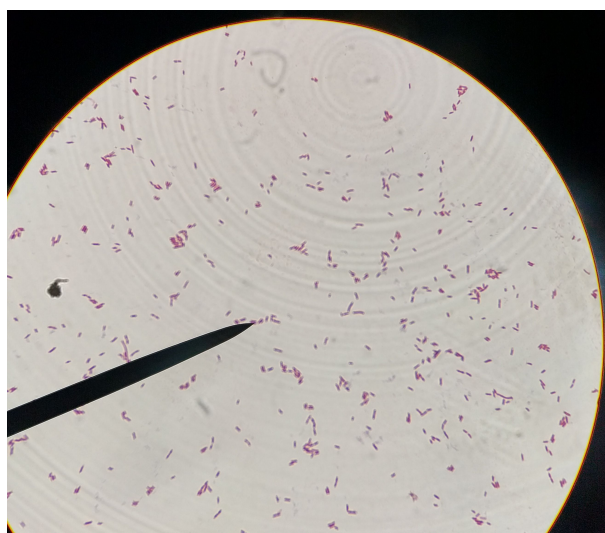


Figura 45: Vista al microscopio de colonia procedente de brócoli en medio EMB

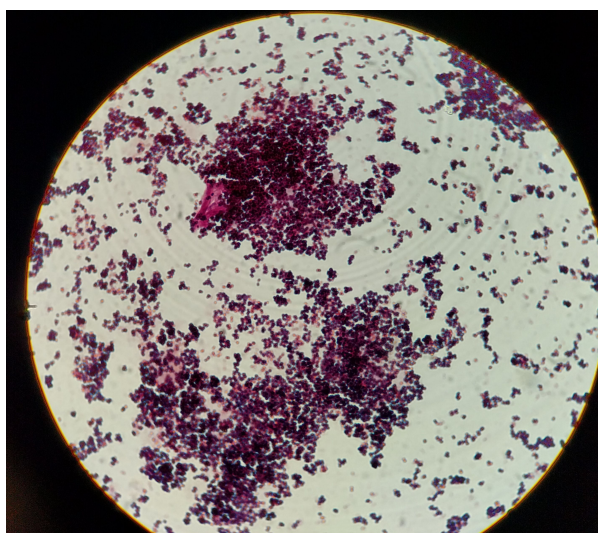


Figura 46: Vista al microscopio de colonia procedente de brócoli en medio V-J

Pimiento verde

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Bacilos	+	+
	Cocos	+	+
	Cocos	+	+
EMB	Bacilos	+	+

Tabla 20: características de colonias aisladas de pimiento verde

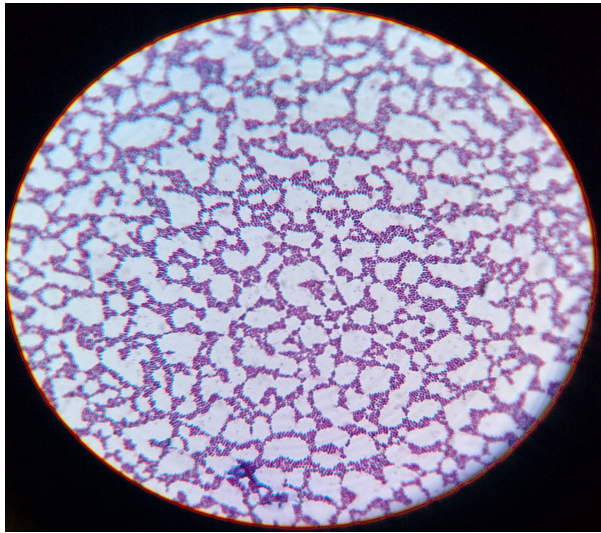


Figura 47: Vista al microscopio de colonia procedente de pimiento verde en medio TSA

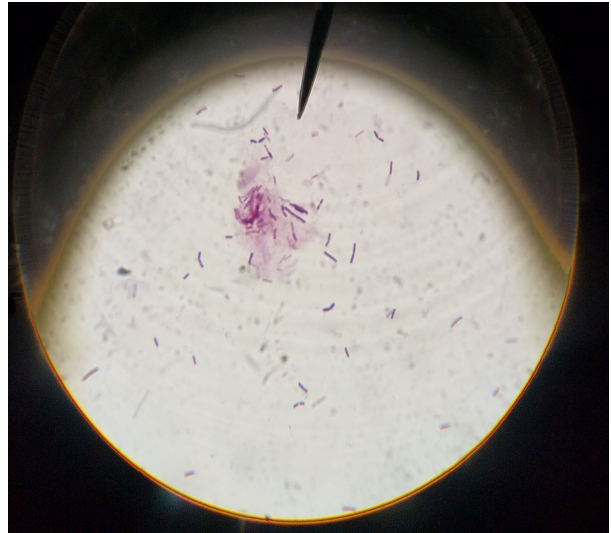


Figura 48: Vista al microscopio de colonia procedente de pimiento verde en medio TSA

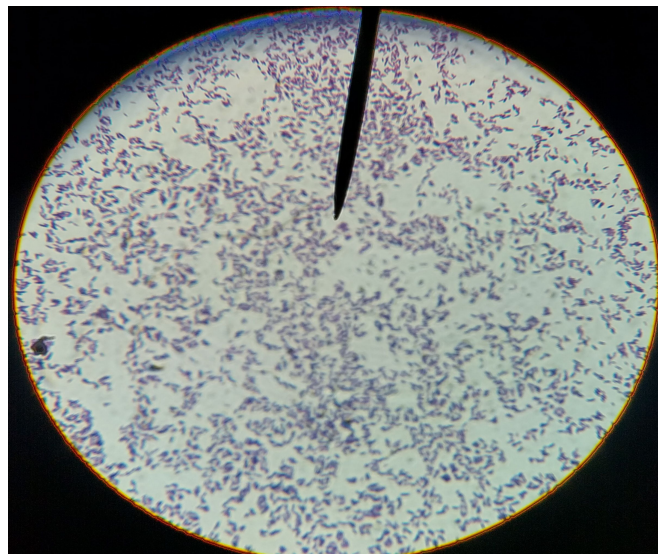


Figura 49: Vista al microscopio de colonia procedente de pimiento verde en medio EMB

Coliflor

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Bacilos	+	+
	Cocos	+	+
	Cocos	+	+
V-J	Cocos	+	-

Tabla 21: características de colonias aisladas de coliflor

Debido a que tan solo había una colonia en medio selectivo (V-J), para este alimento se analizaron tres colonias distintas encontradas en medio TSA.

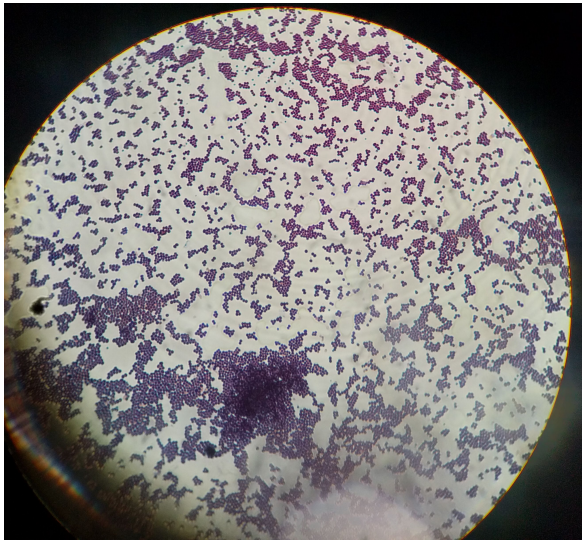


Figura 50: Vista al microscopio de colonia procedente de coliflor en medio TSA

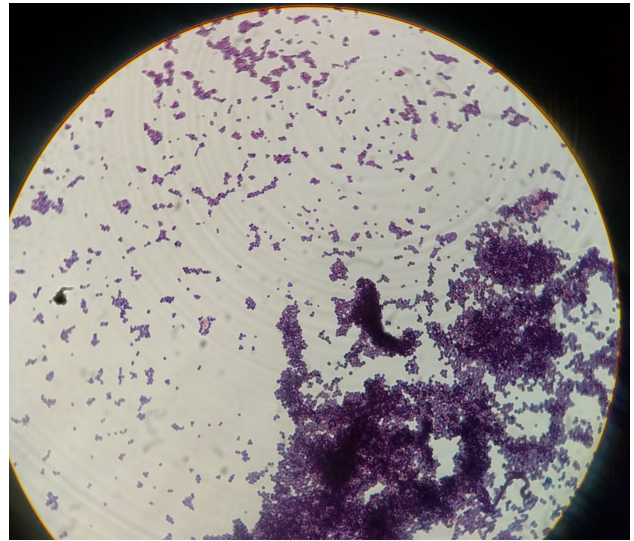


Figura 51: Vista al microscopio de colonia procedente de coliflor en medio TSA

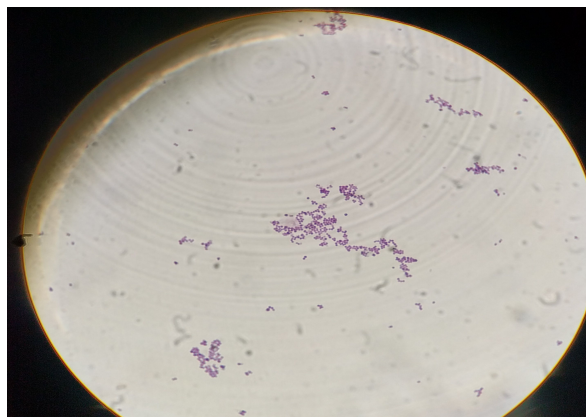


Figura 52: Vista al microscopio de colonia procedente de coliflor en medio V-J

Pimiento rojo

Medio de cultivo	Morfología	Tinción de Gram	Actividad Catalasa
TSA	Cocos	+	+
	Cocos	+	+
V-J	Cocos	+	+

Tabla 22: características de colonias aisladas de pimiento rojo

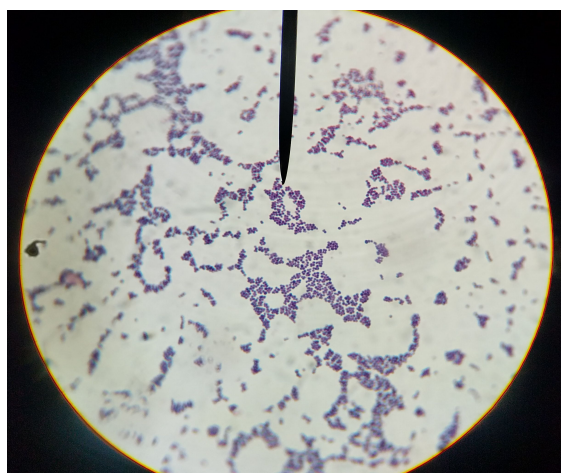


Figura 53: Vista al microscopio de colonia procedente de pimiento rojo en medio TSA

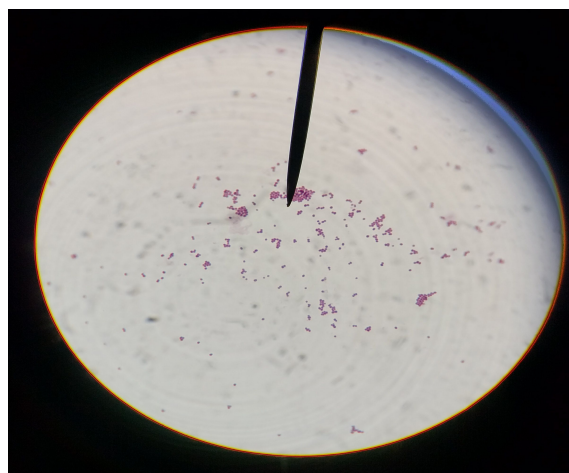


Figura 54: Vista al microscopio de colonia procedente de pimiento rojo en medio V-J

5.3 Antibiograma

Los resultados de las 30 pruebas de antibiograma realizadas se encuentran reflejadas en la *Tabla 23*

Alimento	Medio	CN10	E15	AMP10
Espinacas	V-J	0,8	0,4	0
	MRS	0,6	0,6	0
	EMB	0,2	0	0
		0,6	0	0
Zanahoria	MRS	1,8	0,2	0
		1,8	0	0
	EMB	0,4	1	0
Acelga	V-J	1,4	1,6	0,8
		0	0	0
	MRS	0	0,6	0,4
		0,4	1,4	0
	EMB	1,4	0	0
		0,6	0	0
Lechuga	MRS	1,4	1,2	0
	EMB	1	0	0
		1,2	0	0
Col	EMB	1	0	0
		1	0	0
Tomate	V-J	1	0	0
Brócoli	V-J	1,6	1,8	2
	EMB	0,2	0	0
		0,8	0,4	0
Pimiento verde	EMB	1,3	0	0
Coliflor	TSA	1,2	0	2
		1,6	2,6	3
		2,2	0	1,2
	V-J	1,8	0	0
Pimiento rojo	TSA	0,8	0	0
		1,4	0	1,2
	V-J	0	0	0

Tabla 23: resultados de las pruebas de antibiograma, expresados en centímetros.

5.4 Comparación de recuentos

En las siguiente gráficas (*Figuras 55 y 56*) se encuentran comparados los recuentos microbianos de cada alimento, en el medio general TSA.

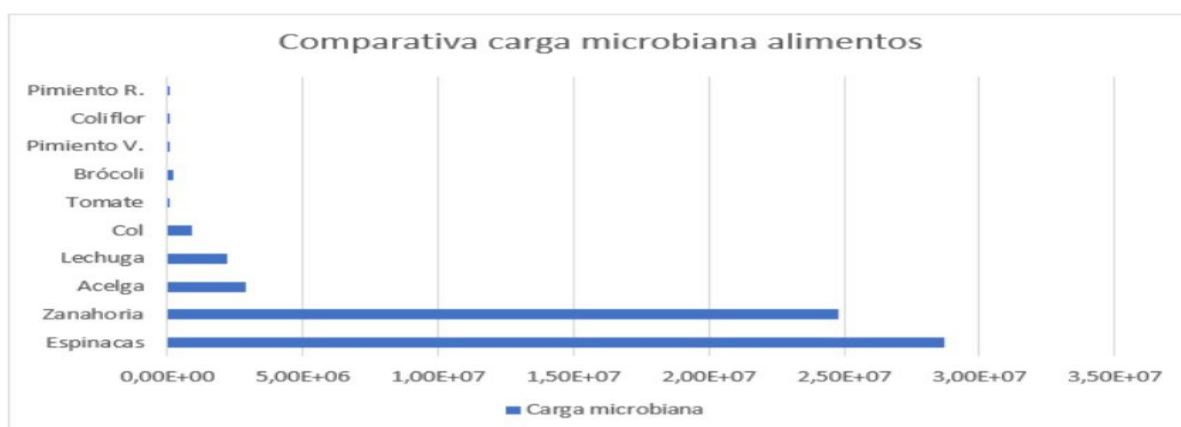


Figura 55: gráfica comparativa de carga microbiana en medio TSA para todos los alimentos

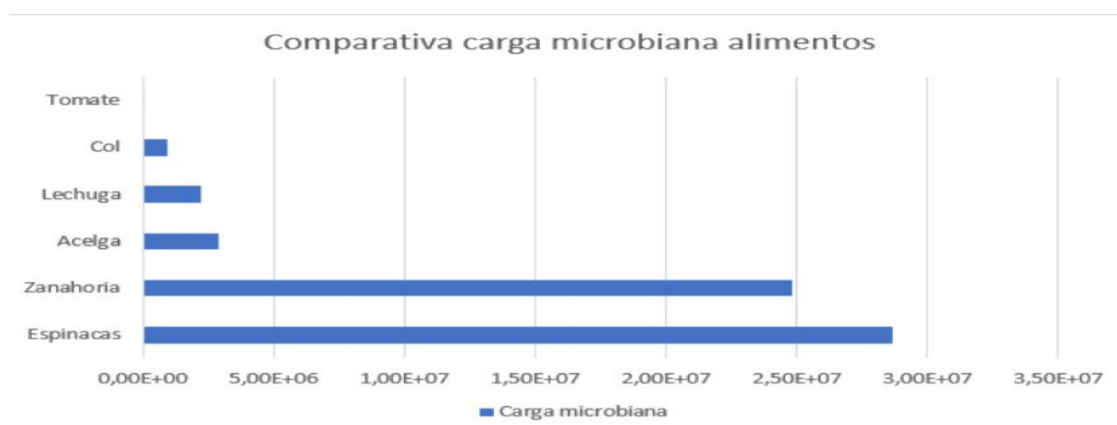


Figura 56: gráfica comparativa de carga microbiana en medio TSA para los alimentos con mayor carga.

6. DISCUSIÓN

El dato más llamativo es la enorme diferencia de carga microbiana que existe entre los alimentos analizados. Se observa una distribución escalonada: las espinacas y la zanahoria presentan una enorme carga microbiana, del orden de 10^7 , es decir, más de 10 millones unidades formadoras de colonia por gramo de alimento. La lechuga, la col y la acelga presentan valores cercanos al millón o dos millones de unidades formadoras de colonia por gramo; el brócoli presenta valores de varios cientos de miles; y por último, el pimiento rojo, la coliflor, el pimiento verde y el tomate presentan valores cercanos a los varios miles o incluso cientos de unidades formadoras de colonias.

Estas diferencias pueden deberse a varios factores, como se mencionó en la introducción, tanto intrínsecos como extrínsecos. Dado que las colonias encontradas en medio TSA eran similares entre sí, los factores implícitos dependientes del propio microorganismo se pueden descartar. Los alimentos que menos carga microbiana presentan son el tomate, el pimiento verde y el pimiento rojo, que son los únicos alimentos de la lista que no crecen cerca del suelo. Esto tiene sin duda un importante impacto sobre la carga microbiana presente, ya que el suelo es una de las principales fuentes de contaminación microbiana.

Esto no explica todas las diferencias encontradas, ya que el resto de alimentos si crecen cerca del suelo o incluso dentro, y presentan importantes diferencias. Otro factor propio del alimento que ha podido tener peso sobre esta carga microbiana es el tipo de tejido o la parte del vegetal analizado: de espinacas, col, acelga y lechuga son verduras de hoja, mientras que el brócoli y la coliflor tienen partes más duras, que son las que fueron analizadas. De hecho, un estudio anterior sobre la carga microbiana presente en verduras de hoja presenta valores similares a los encontrados en espinacas, col, acelga y lechuga en este trabajo (Emin Erkan y Vural, 2008), por lo que esta característica seguramente favorezca la contaminación y la proliferación bacteriana. Además de esto, otras características internas del alimento, como el pH o el tipo de nutrientes ha podido tener efecto.

Otro elemento a tener en cuenta es el procesado por el que han pasado estos alimentos. Aunque no hay forma de saber con exactitud las diferencias en este proceso para cada alimento, es seguro afirmar que las ha habido y que han tenido un impacto sobre la carga microbiana presente en los alimentos.

Más allá de la carga microbiana total, los tipos de microorganismos también

presentan importantes diferencias. Lo principal es destacar que para ningún alimento analizado ha habido crecimiento en el medio KAA, lo que habría señalado la presencia de enterococos en los alimentos. Esto, a su vez, sería una señal de contaminación fecal, por lo que es muy positivo que no se haya producido este crecimiento.

Para todos los alimentos excepto el tomate, la coliflor y el pimiento rojo ha habido crecimiento en el medio EMB. Mientras que las espinacas, la zanahoria y las acelgas presentan una enorme cantidad de estas bacterias, ya que todas las placas obtenidas presentaban más de 300 colonias, la lechuga, la col el brócoli y el pimiento verde presentan valores más normales. La mayoría de estas colonias pertenecían a bacterias Gram negativas según los resultados obtenidos de la tinción, lo que quiere decir que se trataba de enterobacterias. El medio EMB inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y, sin embargo, en espinacas, brócoli y pimiento verde han aparecido colonias Gram positivas. Esto seguramente se deba al proceso de tinción, en el que durante el paso de decoloración un exceso o falta de alcohol puede arrojar resultados falsos. Aparte de estos hechos, las enterobacterias son consideradas ubicuas, es decir, están muy presentes en la naturaleza y en distintas superficies, por lo que su presencia no implica una contaminación importante.

Para el medio Vogel-Johnson ha habido crecimiento en espinacas y acelgas, con una carga microbiana elevada; y en tomate, brócoli, pimiento verde, coliflor y pimiento rojo, con una carga microbiana bastante reducida, que en ningún caso llega a las 500 unidades formadoras de colonias. De hecho, aunque la mayoría de colonias analizadas procedentes de este medio mostraron resultados de catalasa positivo, un rasgo característico de los *Staphylococcus*, algunas fueron catalasa negativo; sin embargo, en estos casos, tan solo aparecieron una o dos colonias en las placas, y además de tamaño muy reducido, de las que casi no se pudo extraer una muestra, por lo que quizá fueran catalasa positivo pero no se pudo apreciar el burbujeo que confirmaría el positivo. En el caso de espinacas aparecieron bacilos, lo cual pudo deberse a una contaminación. Además, en el caso de la acelga, han aparecido levaduras. El resto de colonias procedentes de este medio presentaban un color negro junto a un halo amarillo alrededor, es decir, colonias características de *Staphylococcus aureus*. La presencia de esta bacteria se debe a falta de higiene en la manipulación de los alimentos, ya que está presente en la piel de parte de la población.

Finalmente está el medio MRS, selectivo para el crecimiento de bacterias del ácido láctico. Estas bacterias están por tanto presentes en espinacas, zanahoria, acelgas, y lechuga. La presencia de estas bacterias es natural en estos alimentos. Estas bacterias lácticas presentes en verduras frescas actúan, además, como control frente a la presencia de otras bacterias, patógenas en este caso, y hongos. (Trias, Bañeras, Montesinos y Badosa, 2008).

Por otra parte, los resultados que arroja el antibiograma muestran que la gran mayoría de las cepas analizadas no son sensibles a la ampicilina, ya que en tan solo siete de las 30 analizadas ha aparecido una zona sin crecimiento. De estas, cuatro han crecido en medio TSA; 2 en medio V-J y 1 en medio MRS. Dicho de otra forma, las otras 23 cepas analizadas muestran una resistencia a la ampicilina. Un dato a destacar es que, aunque se creía que las colonias aparecidas en medio V-J con morfología de coco pertenecían todas a *Staphylococcus aureus*, y las diferencias en el resultado de la prueba de la catalasa se atribuían al proceso experimental y no a la propia naturaleza de las colonias, lo cierto es que estas diferencias en el antibiograma parecen indicar que en realidad se trata de cepas distintas. *Staphylococcus aureus* debería mostrar sensibilidad para los tres antibióticos utilizados (Maye Bernal y Guzmán, 1984), pero esto solo se ha dado en dos cepas obtenidas de medio V-J.

La eritromicina ha mostrado resultados parecidos, con 11 cepas que han mostrado sensibilidad a esta. De esas colonias, algunas crecieron en medio TSA y otras en medio V-J; pero el dato más importante es que casi todas (excepto una) de las colonias analizadas que crecieron en medio MRS, es decir, bacterias del ácido láctico, han mostrado sensibilidad a la eritromicina. Esto coincide con los resultados de Mora Peñaflor y García Guerrero (2007), que observaron sensibilidad a la eritromicina para todas las cepas de bacterias lácticas analizadas.

El antibiótico que mas eficacia ha demostrado ha sido la gentamicina, ya que tan solo 3 de las 30 cepas analizadas han mostrado resistencia a esta. De estas, dos son procedentes de medio V-J, que también han mostrado resistencia a los otros dos antibióticos; y la otra procede de medio MRS.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de este trabajo son las siguientes:

- De los alimentos de origen vegetal analizados, los que tienen mayor carga microbiana, interpretada como UFC/g, son los de hoja verde y la zanahoria.
- Estos alimentos son también los que mayor variabilidad microbiológica presentan, en especial las espinacas.
- También se observa una correlación entre la carga microbiana y el crecimiento cerca de o en el suelo.
- El alimento analizado con menor carga microbiana es el tomate.
- No ha habido crecimiento en medio KAA, por lo que ningún alimento tiene presencia de enterococos.
- Salvo el tomate, la coliflor y el pimiento rojo, el resto presentan contaminación por enterobacterias, y en la mayoría, con una alta carga microbiana de este tipo.
- Espinacas, acelgas, tomate, brócoli, coliflor, pimiento verde y pimiento rojo tienen presencia de *Staphylococcus*
- Espinacas, acelgas, lechuga y zanahoria tienen presencia de bacterias del ácido láctico.
- La gentamicina muestra bastante más eficacia contra las cepas analizadas que la ampicilina y la eritromicina.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agar KAA Confirmativo para el aislamiento y confirmación de enterococos intestinales en alimentos según Mossel. Información de producto. *Condalab*. Código 1027.
- Agar Vogel-Johnson para el aislamiento selectivo de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras clínicas y alimentos. Información de producto. *Condalab*. Código 1079.
- Agar Mueller Hinton II para pruebas de sensibilidad a antibióticos y para el aislamiento primario de gonococos, meningococos y otros patógenos de muestras clínicas. *Condalab*. Código 1055.
- Barragán Valbuena, P. A. (2010) *Potencial saludable de sustancias bioactivas de algunas verduras* (Tesis doctoral). Recuperado de <http://hdl.handle.net/10554/8603>
- Bernal R., M., y Guzmán, M. (1984) El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*.4(3-4), 112-121. Recuperado de <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Carrillo, L., y Audisio, M. C. (2007) *Manual de microbiología de los alimentos*. Jujuy: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias.
- Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. Boletín Oficial del Estado, núm. 248, de 17 de octubre de 1967. Recuperado de <https://www.boe.es/eli/es/d/1967/09/21/2484/con>
- Drago Serrano, M.E., López López, M., y Sainz Espuñes, T. R. (2006) Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58-68. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=579/57937408>
- Diccionario de la lengua española (ed. 2019) *Definición de alimentos*
- Diccionario de la lengua española (ed. 2019) *Definición de vegetal*
- Emin Erkan, M., y Vural, A. (2008) Investigation of Microbial Quality of Some Leafy Green Vegetables. *Journal of Food Technology*, 6 (6), 285-288.
- Eosina Azul de Metileno (EMB), Agar (Medio Deshidratado) para microbiología, información de producto. *Panreac Applichem*. Código 413762.

- Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (2018). *Informe del consumo alimentario en España 2018*.
- Mora Peñaflor, N., y García Guerrero, A. (2007) *Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos* (tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Moreno, J. (2012) Control microbiológico en frutas y hortalizas. *Curso especialización en seguridad alimentaria. Junta de andalucía*.
- MRS, Agar (Medio Deshidratado) para microbiología, información de producto. *Panreac Applichem*. Código 413784.
- National Geographic (19 de Agosto de 2019). *The Development of Agriculture*. Recuperado de <https://www.nationalgeographic.org/article/development-agriculture/>
- Puig Peña, Y., Leyva Castillo, V., Rodríguez Suárez, A., Carrera Vara, J., Molejón, P. L., Pérez Muñoz, Y., y Dueñas Moreira, O. (2013) 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): 111-119. Recuperado de <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/134>
- Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez González, M. Y., Ulloa, J. A., Arce Romero, F. (2011) Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista fuente Año 2, 7*. Recuperado de <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/436>
- Sánchez, J. G., *Toxiinfecciones alimentarias: ¿una patología emergente?* Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Toxialim.pdf>
- Soja Triptona (TSA), Agar (Ph. Eur.) (Medio Deshidratado) para microbiología, información de producto. *Panreac Applichem*. Código 413819.
- Trias R., Bañeras L., Montesinos E., y Badosa E. (2008) Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *Int Microbiol*, 11 (4), 231-236. doi: 10.2436/20.1501.01.66