



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de alimentos vegetales

Alumno: Estrella Salazar Peña

Junio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de alimentos vegetales.

Alumno: Estrella Salazar Peña

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del alumno Estrella Salazar Peña. La firma es fluida y estilizada, con una gran letra inicial que se extiende hacia abajo.

Junio, 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Frutas y verduras como base de la dieta humana	2
<i>2.1.1. Hábitos alimenticios y enfermedades asociadas</i>	<i>2</i>
2.2. Contaminación de los alimentos vegetales	3
<i>2.2.1. Géneros patógenos más comunes en alimentos vegetales</i>	<i>5</i>
2.3. Microorganismos más frecuentes transmitidos por los alimentos	6
2.4. Métodos de conservación postcosecha	10
<i>2.4.1. Tipos de conservación de alimentos frescos</i>	<i>10</i>
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Alimentos empleados	12
4.2. Medios utilizados y su preparación	12
<i>4.2.1. Descripción de los medios empleados</i>	<i>12</i>
<i>4.2.2. Preparación de los medios de cultivo</i>	<i>16</i>
<i>4.2.3. Preparación de la solución salina</i>	<i>18</i>
4.3. Procesado de los alimentos y siembra en placa	19
4.4. Recuento y tinción	20
<i>4.4.1. Recuento</i>	<i>20</i>
<i>4.4.2. Tinción</i>	<i>21</i>
4.5. Prueba de la catalasa	22
4.6. Cálculo de la superficie del alimento	23
5. RESULTADOS	25
5.1. Recuentos en medios selectivos y no selectivos	25
<i>5.1.1. Resultados obtenidos en el recuento microbiano</i>	<i>26</i>
5.2. Identificación de las colonias	27

5.3. Análisis estadístico de la carga microbiana de los alimentos estudiados.	
.....	39
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES.....	42
8. BIBLIOGRAFÍA.....	43

RESUMEN

Los alimentos vegetales son productos fundamentales que deben de estar incluidos en nuestra dieta para poder alcanzar un buen estado de salud. A pesar de que son muy importantes para prevenir algunas enfermedades, también pueden ser una vía de transmisión de microorganismos patógenos para el ser humano. Esto se debe a su consumo en crudo y a una mala manipulación. El consumo de fruta contaminada por determinadas bacterias patógenas para el ser humano es la causa de diversas patologías, como salmonelosis, listeriosis, gastroenteritis, etc. En este ensayo se han analizado 10 frutas diferentes y se ha intentado hacer una identificación aproximada de la carga microbiana presente, mediante estudios a nivel macroscópico y microscópico, para poder comparar su crecimiento en los distintos medios de cultivo empleados. En base a nuestros resultados, podemos afirmar que la carga microbiana es normal y que en principio no se detecta presencia de microorganismos patógenos en los medios ensayados.

Palabras clave: alimentos vegetales, microorganismos patógenos, carga microbiana.

ABSTRACT

Vegetable food is a fundamental product that must be included in our diet if we want to have good health. Despite of the fact that they are very important to prevent some diseases, they also can be a route of transmission of pathogenic microorganisms for the human being, due to his raw consumption and a bad handling. The consumption of contaminated fruit with certain pathogenic bacteria for the human being is the reason of diverse pathologies, such as salmonellosis, listeriosis, gastroenteritis, etc. In this project, 10 different fruits have been analyzed and we've tried to do an approximate identification of the microbial load, using studies at macroscopic and microscopic level, so we can compare his growth in the different means of culture used. Basing on our results, we affirm the microbial load is normal and there is not presence of pathogenic microorganisms in the culture medium.

Keywords : Vegetable food, pathogenic microorganism, microbial load.

1. INTRODUCCIÓN.

2.1. Frutas y verduras como base de la dieta humana

Según el Código Alimentario Español se denomina fruta a la infrutescencia, al fruto, la semilla o las partes carnosas de órganos florales que hayan alcanzado un grado adecuado de madurez y sean propias para el consumo humano. Las frutas y las verduras son una fuente muy importante de vitaminas, minerales, fibra y otros componentes bioactivos. Son alimentos de origen vegetal que comparten ciertas características, como su elevado contenido en azúcares, su elevada acidez, su aroma y que por lo general se consumen frescos. La fruta está compuesta principalmente por agua, celulosa, sustancias pécticas, vitaminas y azúcares, además tienen un pH inferior a 4,5 exceptuando algunas frutas como el melón, el higo o el plátano cuyo pH es superior a este valor. El pH actúa como un factor selectivo ante el crecimiento bacteriano (Pascual y Calderón, 2000). Estos alimentos tienen una baja densidad energética, haciendo que un consumo adecuado de ellos, sea un factor de prevención de diversas enfermedades crónicas no infecciosas (Canella *et al.*, 2018).

2.1.1. Hábitos alimenticios y enfermedades asociadas

El consumo de frutas y verduras son la base para conseguir una dieta sana y equilibrada que ayudará a prevenir enfermedades crónicas como cardiopatías, el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, la diabetes, la obesidad, apoplejía, cataratas e incluso aquellas enfermedades que derivan de carencias de micronutrientes. La idea de mantener una buena alimentación para gozar de buena salud es algo que viene de mucho tiempo atrás y que el mismo Hipócrates reconocía diciendo: "Si pudiéramos darle a cada individuo la cantidad correcta de alimentos y ejercicio, no muy poco ni demasiado, habríamos encontrado el camino más seguro hacia la salud". A día de hoy, estas enfermedades crónicas no infecciosas son responsables de millones de muertes al año en todo el mundo. En Europa, por ejemplo, representan un 70% de la mortalidad (Omran, 1971). Además de representar un elevado porcentaje de mortalidad, suponen un gasto económico muy elevado para los estados, gasto que se estima que aumentará en un 22% para el año 2030 (Bloom *et al.*, 2011). Hipócrates observó que muchas de estas enfermedades se podían evitar con una dieta sana y equilibrada en la que aumentase el consumo de alimentos

beneficiosos como las frutas y las verduras (De Lorenzo, 2012). Estudios realizados en Estados Unidos revelan que un tercio de los fallecimientos por cáncer podrían evitarse adquiriendo nuevos hábitos alimenticios. Estos datos sugieren que cambios en la alimentación, como una ingesta adecuada de carne y vegetales reducirían enfermedades derivadas de una mala alimentación. Las Guías Alimentarias 2010 para la población estadounidense recomendaban una ingesta de al menos 4 porciones de frutas y 5 porciones de verduras diarias, lo cual no corresponde con la realidad (Lui, 2013). Otros estudios que se han realizado han demostrado que el consumo de frutas y verduras por persona está relacionado con el nivel socioeconómico del país, siendo los países más pobres los que tienen un índice de consumo más bajo y aquellos que cuentan con ingresos más elevados tienen un índice de consumo más elevado (Tuomisto, 2017; Miller *et al.*, 2016). Dentro de cada país también se ha detectado que el consumo es mayor en los barrios ricos que en los pobres (Dubowitz *et al.*, 2008 ; Pessoa *et al.*, 2015).

En la actualidad debido al ritmo de vida acelerado, debido al estrés y al sedentarismo, los hábitos alimenticios de la mayor parte de la población han cambiado, fomentando el consumo de alimentos hipercalóricos, con más azúcares libres o alimentos con más grasas saturadas que aumentan el riesgo de padecer problemas de salud (Hay Lui, 2013; Guesry, 2005). Tanto la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) como la OMS (Organización Mundial de la Salud) han publicado un informe en el que recomiendan un aumento en el consumo de frutas y verduras y en el que reconocen que un bajo consumo es un factor de riesgo para la salud.

2.2. Contaminación de los alimentos vegetales.

La contaminación de las frutas y hortalizas que ingerimos por microorganismos patógenos para los humanos, es causada generalmente por un factor externo. Cada alimento tiene sus propias propiedades que son las que van a determinar qué tipo de microorganismo van a crecer en él. Además de las características del alimento, la manipulación a la que va a estar expuesto es otro factor fundamental que va a determinar el que haya una carga microbiana u otra. El entorno, el tipo de agua de riego, la maquinaria con la que se procesan, el estado en el que se encuentre, también van a favorecer el desarrollo de algunos microorganismos (Yousef y Carlstrom, 2006).

Uno de los factores que va a determinar qué carga microbiana aparece en el alimento son las **aguas residuales sin tratar**, que se utilizan para el riego de cultivos domésticos, las cuales suelen contener microorganismos patógenos para el hombre que ocasionan trastornos gastrointestinales. **Las aguas residuales tratadas** también pueden contener microorganismos, aunque en menos cantidad. Otro factor es **el suelo**, que es una fuente muy importante de bacterias esporógenas termorresistentes y donde encontramos la mayor variedad de microorganismos, aunque por lo general no patógenos. Son de especial importancia algunas levaduras y mohos, además de algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Leuconostoc* (Frazier et al, 1993).

Los **microorganismos procedentes de animales** que contaminan los alimentos residen, por lo general en las vías respiratorias o en el tubo digestivo. Las bacterias que suelen aparecer en las vías respiratorias son estafilococos mientras que las que aparecen en el tracto gastrointestinal son bacterias entéricas. Los microorganismos que se encuentran en la superficie corporal no suelen causar trastornos (Frazier et al, 1993).

El agua natural, además de contener su propia carga microbiana, contiene microorganismos procedentes del suelo, animales y aguas residuales. El contenido de microorganismos presentes en las aguas superficiales es muy variable debido a su autodepuración. Por el contrario, en las aguas subterráneas el contenido microbiano es mucho menor. Las principales especies bacterianas que se pueden encontrar en las aguas naturales son especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterobacter* y *Escherichia* (Frazier et al, 1993).

Otro factor que afecta a la contaminación de los alimentos es **el aire**, que puede transportar los microorganismos. La cantidad de microorganismos que contenga el aire va a depender de la velocidad con la que se desplaza, la intensidad de la luz, la humedad del ambiente, la localización geográfica y la cantidad de partículas que haya en suspensión. La contaminación de los alimentos no siempre tiene por qué producirse en el mismo momento, puede darse antes de su cosecha, antes de su almacenamiento o durante su manipulación (Frazier et al, 1993).

Los cambios ambientales que se están produciendo en la actualidad, como el cambio climático, el aumento de ozono en el suelo, la disponibilidad de agua, la degradación del suelo o la deforestación entre otras causas afectan a la salud y bienestar de la población, afectando de forma indirecta a la agricultura y a la alimentación a nivel mundial debido a un aumento en la biodiversidad de plagas y patógenos (Tuomisto, 2017).

2.2.1. Géneros patógenos más comunes en alimentos vegetales

La microbiota que se encuentra en la superficie de cada alimento es distinta en cada una de ellas. No obstante, se suelen encontrar bacterias del ácido láctico, especies de coliformes, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, levaduras y mohos. La carga microbiana va a depender de la planta y del medio en el que se encuentre, con valores que oscilan entre miles y millones de bacterias por centímetro cuadrado.

El hecho de que muchas frutas y verduras se consuman en crudo, sin ningún tratamiento previo, hace que sean peligrosas para la salud, en el caso de que se encuentren contaminadas y este riesgo se ha incrementado puesto que la demanda social de alimentos cada vez más naturales ha crecido. En estos últimos años el número de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas ha aumentado (Puig *et al*, 2014; Collins, 1997). Hasta los años 50 los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos eran *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*. Posteriormente en los años 60 se empezó a utilizar la refrigeración en cadena de los alimentos y de esta forma se pudieron identificar bacterias del género *Yersinia*.

El aumento en la demanda de estos alimentos dio lugar a cuatro brotes epidémicos relacionados con cepas de *Salmonella*, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC, O157:H7) en el otoño de 2006 en Estados Unidos (Doyle, 2008). Se realizó una revisión entre los años 1973 y 1997 en la que se identificaron 190 brotes relacionados con el consumo de frutas, hortalizas y zumos. Se detectaron 16.000 enfermos entre los cuales hubo 8 fallecidos. Los microorganismos causantes de estos brotes fueron *Salmonella* y *E. coli* EHEC principalmente, aunque también estuvieron implicados *Clostridium*, *Shigella*, *Bacillus* y *Staphylococcus* (Sivapalasingam *et al*, 2004). En la última década los brotes de gastroenteritis que han sido causados por cepas de

Salmonella no tifoidea y *E. coli* se han relacionado con el consumo de frutas y verduras. Estos brotes, que se han dado de forma esporádica y cuando las condiciones han sido favorables para su expansión. Además de generar problemas de salud, también provocaron enormes pérdidas multimillonarias en el cultivo industrial. Las observaciones que se han realizado confirmarían que las plantas pueden actuar como huéspedes intermediarios entre los microorganismos patógenos y el ser humano (Marvasi *et al*, 2013; Barak *et al*, 2012).

2.3. Microorganismos más frecuentes transmitidos por los alimentos.

Una enfermedad de origen alimentario es cualquier proceso patológico producido por el consumo de un alimento. Estas enfermedades transmitidas por los alimentos y causadas por microorganismos pueden ser de dos tipos, infecciones e intoxicaciones. La diferencia entre ellas es que las infecciones se producen por la ingesta de células vivas y las intoxicaciones se producen por la ingesta de toxinas que han sido generadas por los microorganismos en los alimentos en los que se encuentran. Algunas de las bacterias patógenas que se manifiestan en los alimentos son las siguientes (Tortora y Berdell, 2007):

Familia Enterobacteriaceae: Abarca una gran multitud de géneros, cuyas características son bacterias Gram negativas, de morfología bacilar, anaerobias facultativas, fermentadoras de glucosa y de otros hidratos de carbono y que no producen oxidasa. Son productoras de la proteína bacteriocina, que provocan la lisis de ciertas especies manteniendo el equilibrio ecológico en el intestino. Su hábitat es muy variado, pudiéndose encontrar en el tubo digestivo del ser humano, de animales y en diversos ambientes. Este grupo de bacterias se denominan enterobacterias precisamente por su procedencia del tracto intestinal. Por su importancia clínica se han desarrollado diversas técnicas para su aislamiento e identificación. Entre las especies que afectan al ser humano por su ingesta a través de alimentos se encontrarían las bacterias pertenecientes a las especies y géneros *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia enterocolitica*.

- **Género *Escherichia*:** Es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Tiene forma bacilar, es un microorganismo anaerobio facultativo, capaz de fermentar tanto la glucosa y otros carbohidratos produciendo gas y ácido. ***Escherichia coli*** es la especie dominante en el tracto

intestinal humano formando parte de su microbiota normal pero en algunos casos puede aparecer como un patógeno. Puede causar infecciones urinarias oportunistas o gastrointestinales, septicemias, meningitis, etc. La versatilidad de este microorganismo se debe a que ha adquirido diversos factores de virulencia con el paso del tiempo. El principal reservorio de *E.coli* es el ganado vacuno, pero también se puede encontrar en alimentos como la leche cruda y pasteurizada, cuajadas de queso, sidra, zumo de naranja, lechuga o carne desecada de venado (Yousef y Carlstrom, 2006).

- **Género *Salmonella*:** Estas bacterias tienen forma de bacilo y son bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas. Se caracterizan por su incapacidad de fermentar lactosa y sacarosa. El hábitat principal es el intestino del ser humano y de animales de granja y de compañía. Una de sus vías de transmisión es el agua. Casi todos los miembros que pertenecen a este género se consideran microorganismos potencialmente patógenos. La *salmonella* es la responsable de las infecciones gástricas conocidas como salmonelosis y tan solo es necesaria la ingesta de 1 a 10 células para que se desarrolle la intoxicación. Además de esta patología, también causa gastroenteritis y septicemia. Por lo general se detecta en alimentos de procedencia avícola. El patógeno más frecuente y que se encuentra relacionado con el consumo de frutas y verduras frescas es la ***Salmonella enteérica***.
- **Género *Shigella*:** Son bacterias Gram negativas con forma bacilar, anaerobias facultativas y mesófilas, responsables de enfermedades gastrointestinales y disenterías en muchos países (Niyogi, 2005). Las heces humanas son su reservorio principal puesto que es muy raro encontrarlas en heces de animales. Se puede encontrar en aquellos lugares donde se haya producido una contaminación fecal humana, como en alimentos que hayan sido regados con aguas contaminadas. Esta bacteria también se transmite por contacto directo con una persona infectada y se necesitan concentraciones muy bajas para que esto ocurra (100 UFC/g). Son las responsables de la disentería bacilar o shigelosis, además de ser la segunda causa de la diarrea del viajero.
- **Género *Yersinia*:** Dentro de este género, la especie de mayor interés es *Yersinia enterocolitica*, debido a que se ingiere por alimentos o aguas contaminadas y posteriormente colonizan el intestino. Es la principal especie

productora de gastroenteritis. Esta bacteria se desarrolla a partir de 4°C, pero con el tratamiento y cocción adecuada se elimina sin ningún tipo de problema.

Otros géneros: Además de las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, se pueden encontrar otras bacterias no relacionadas con esta bacteria:

- **Género *Staphylococcus*:** Tiene forma de coco Gram positivo y catalasa positiva con una disposición en forma de racimo, su especie más importante es *Staphylococcus aureus*. Destaca su resistencia a condiciones de sequedad durante largos periodos de tiempo. Es responsable de diversas enfermedades en el ser humano, incluyendo las transmitidas por alimentos. Este patógeno produce la *enterotoxina estafilocócica*, responsable de la *gastroenteritis estafilocócica*, transmitida por los alimentos y muy común. Para que sea patógena tiene que encontrarse en una concentración de 10^6 UFC/g. Los alimentos más susceptibles de tenerla son productos lácteos, ensaladas y algunas carnes.
- **Género *Listeria*:** De este género, tan solo la especie *L. monocytogenes* se considera patógena para el ser humano. Una de sus características es su capacidad para fermentar carbohidratos y hemolizar la sangre. Son productoras de catalasa pero no de oxidasa. *Listeria monocytogenes* tiene forma de bacilo corto y tiene flagelos cortos que permiten su movimiento. Es capaz de crecer en condiciones aerobias y a muy bajas temperaturas. La ingesta de alimentos contaminados con esta bacteria puede provocar una infección conocida como listeriosis y tan solo se necesitan más de 10^2 microorganismos para que se produzca. Se ha aislado en alimentos como la leche, ensaladas, carnes y pescados.
- **Género *Lactobacillus*:** Son un género de bacterias del ácido láctico que sintetizan diversos tipos de Bacteriocinas, importantes en el papel de la conservación de alimentos vegetales. Son bacterias Gram positivas, con forma bacilar y que por lo general se agrupan formando cadenas largas. Algunos lactobacilos lo que hacen es alterar los alimentos, como es el caso de *Lb. plantarum* que se encuentra en numerosas frutas y verduras fermentadas (Di Cagno *et al.*, 2013). Otros son beneficiosos para la industria, como por ejemplo *Lb. bulgaricus*. Comercialmente, muchas de las bacterias del género

Lactobacillus se utilizan para la producción de chucrut, pickles, yogurt y mantequilla entre otros. Normalmente las bacterias del ácido láctico tienden a adaptar su metabolismo al medio en el que se encuentran. Las frutas y las verduras son alimentos propensos a cambios ambientales y es por esto, la síntesis de bacteriocinas tiene un papel fundamental en el control del deterioro y envenenamiento de las frutas y verduras crudas (Rizzello *et al.*, 2014; Fan y Truelstrup, 2012; Yousef y Carlstrom, 2006).

- **Género *Streptococcus*:** Son bacterias ácido lácticas Gram positivas cuya morfología es esférica, su disposición es en cadenas y son homolácticas. Para la elaboración de algunos productos lácteos como el yogurt y el queso se utilizan *Streptococcus thermophilus*.
- **Género *Leuconostoc*:** Son también bacterias del ácido láctico Gram positivas con forma de coco y que aparecen en parejas o cadenas. Son bacterias heterolácticas que al fermentar los carbohidratos producen ácido y gas. Son bastante tolerantes a la sal y algunas especies de este género se utilizan en la fermentación de hortalizas.
- **Género *Clostridium*:** Este género cuenta con más de 100 especies de bacterias Gram positivas catalasa negativa, con morfología bacilar. Son microorganismos anaerobios y esporulados. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, localizándose principalmente en el suelo, tracto intestinal del ser humano y animales. La especie de mayor relevancia causante de patologías en humanos es *Clostridium perfringens* (Hernández-Chavarría *et al.*, 2001). Las cepas que provocan intoxicaciones alimentarias se encuentran con mayor frecuencia en el suelo, agua, polvo, trato gastrointestinal de personas y animales y en ciertos alimentos, como carnes y verduras. Su crecimiento óptimo se da a los 45°C. Las endosporas son termorresistentes, lo que dificulta su eliminación mediante procesos de cocción. Por lo general, los alimentos vegetales que han sido contaminados con esta bacteria se debe a que han estado en contacto con aguas residuales contaminadas. Afecta principalmente a carnes cocinadas, pescado, empanadas, pescados, salsas y alimentos envasados al vacío.

La elección, preparación, manipulación y el uso de los medios de cultivo que se van a utilizar es un paso fundamental para la realización de cualquier análisis

microbiológico puesto que cada medio contiene unos nutrientes determinados y agentes que permitirán la selección y diferenciación de microorganismos concretos (Yousef y Carlstrom, 2006).

2.4. Métodos de conservación postcosecha.

La calidad de un alimento está determinada por sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales. Una forma de estimar la calidad microbiológica de los alimentos es mediante un recuento total en placa (RTP), por ejemplo, si hacemos el análisis microbiológico de un alimento y encontramos un RTP elevado, esto indica que la calidad de ese alimento es baja (Yousef y Carlstrom, 2006; Morton, 2001). Como ya se sabe, las frutas tienen una microbiota propia en su superficie, siendo levaduras y mohos los más abundantes. Debido a factores externos, es posible que estos alimentos estén contaminados con otras bacterias. Existen tratamientos para prevenir o controlar las alteraciones posteriores a la recolección, como el uso de temperaturas altas o bajas.

2.4.1. Tipos de conservación de alimentos frescos

1. Conservación por frío: Es uno de los métodos más antiguos y eficaces utilizados ya que con este tratamiento se frena el crecimiento de los microorganismos y evita el uso de productos químicos (Luire, 2001). Existen dos variantes de este método.

- **El pre-enfriamiento** es un método en el que se suministra frío inmediatamente después de la recolección y su principal objetivo es enfriar el fruto recién recolectado. Este mecanismo puede emplear aire frío en cámaras de refrigeración, agua fría o poniendo la fruta en contacto directo con hielo.
- **La refrigeración**, que es el más utilizado y consiste en el mantenimiento de los alimentos a temperaturas bajas pero sin que lleguen a congelarse. Es el tratamiento que mejor conserva el producto, manteniendo su calidad y conservando sus propiedades (Watkins y Ekman, 2005).

2. Conservación por calor: En este tratamiento se utiliza agua caliente, vapor y aire caliente forzado (Luire, 1998). Con el uso de agua caliente, a una temperatura de 50°C, se consigue una disminución en la concentración de patógenos en la superficie del alimento sin afectar a la calidad.

3. Conservación mediante la utilización de conservantes químicos: En la actualidad es uno de los métodos más empleados. Se utilizan productos como el 1-metilciclopropano (1-MCP), que inhibe la acción del etileno controlando de esta forma la maduración y prolongando la duración de la fruta en condiciones óptimas, manteniendo su calidad. También se emplean sales de calcio que son útiles para mantener la textura de las frutas y reducir la degradación y podredumbre de las frutas (Poovaiah, 1986).

4. Conservación mediante el uso de radiaciones ionizantes: No es el método más óptimo para la conservación de frutas ya que aunque inhibe el desarrollo de patógenos, origina desordenes fisiológicos y maduración anómala. Es un método que está siendo muy estudiado por los posibles efectos que pueda tener sobre la salud, cosa que no debería de ocurrir puesto que estas radiaciones ionizantes deben de realizarse dentro de unos límites.

5. Conservación por modificación de la atmósfera: Es un método que empezó a utilizarse en el año 1930 y que a día de hoy son muchas las aplicaciones que se le están dando. El oxígeno es un elemento que tiene un papel muy importante en las alteraciones microbiológicas. Al controlar la composición de la atmósfera que rodea a las frutas, se ralentiza el proceso de maduración, prolongando la vida útil del alimento y manteniendo su calidad. Las concentraciones de oxígeno y de dióxido de esta atmósfera modificada deben de ser del 2% y del 5% respectivamente (Beaudry, 2000).

3. OBJETIVOS

Los objetivos que se plantean para este ensayo son los siguientes:

1. Determinar la carga microbiana presente en los alimentos vegetales.
2. Determinar el tipo de tinción de Gram, morfología y actividad catalasa de las colonias aisladas.
3. Realizar una identificación preliminar de los microorganismos aislados en alimentos vegetales.
4. Realizar un estudio comparativo de la carga microbiana aparecida en el medio general y en los medios selectivos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Alimentos empleados

Para la realización de este proyecto se han utilizado 10 alimentos vegetales que se han obtenido de diversos centros comerciales y pequeños comercios de la provincia de Jaén. Para el procesado de dichos alimentos se dividieron en tres grupos procesados en días diferentes cada uno de ellos.

4.2. Medios utilizados y su preparación

Para realizar este proyecto, los 10 alimentos analizados, se han sembrado en 5 medios, un medio general y los 4 restantes, medios selectivos (Imagen 1).

El tipo de medio de cultivo que se emplee va a depender del microorganismo que se quiera aislar. Además, cada microorganismo presenta unos requerimientos nutricionales distintos, lo que requiere el empleo de medios nutricionalmente adaptados a cada uno de ellos.

El medio general es aquel en el que puede crecer cualquier tipo de microorganismo mientras que el medio selectivo es aquel que favorece el crecimiento de ciertos organismos, suprimiendo el de desarrollo de otros. Es decir, la finalidad del medio selectivo es aislar tipos concretos de microorganismos a partir de la muestra.

4.2.1. Descripción de los medios empleados

Tryptone Soy Agar (TSA) de PanReac AppliChem → Medio de cultivo de color ámbar claro, que contiene peptona de soja y peptona de caseína, lo que lo capacita para soportar el crecimiento de una gran variedad de microorganismos exigentes y no exigentes nutricionalmente. Es un medio general, en el pueden crecer microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y otros más exigentes como *Neisseria*, *Listeria*, *Brucella*, etc (Tabla 1).

Fórmula en g/l	
Pancreatic Digest of casein	15,00
Papaic Digest of Soya Bean	5,00
Cloruro de sodio	5,00
Agar	15,00
pH	7.3±0.2
Temperatura	25°C

Tabla 1: Composición del medio de cultivo.

Kanmycin Esculin Azide Agar (KAA) de Sharlau → Medio de cultivo de color beige claro utilizado para la identificación de *Enterococcus* en alimentos, agua u otros especímenes biológicos. El sulfato de kanamicina junto con la azida de sodio inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Los Enterococos hidrolizan la esculina, produciendo glucosa y esculetina que reaccionará con el citrato de hierro y amonio (Tabla 2).

Fórmula en g/l	
Triptona	20,00
Extracto de levadura	5,00
Cloruro de sodio	5,00
Citrato de disodio	1,00
Esculina	1,00
Citrato de hierro y amonio	0,5
Azida de sodio	0,15
Sulfato de Kanamicina	0,02
Agar	10
pH	7±0,2
Temperatura	25°C

Tabla 2: Composición del medio de cultivo KAA

Eosina Azul de Metileno (EMB) de Cultimed → Medio de cultivo de color vino que se utiliza normalmente para el aislamiento de bacilos Gram negativos y escasas exigencias nutricionales (Imagen 1). En él se pueden distinguir microorganismos fermentadores de lactosa y/o y microorganismos no fermentadores de lactosa, partiendo de los colorantes eosina y azul de metileno. Aquellas bacterias que hacen

uso de la lactosa y/o sacarosa formarán colonias con el centro oscuro con brillo metálico y un halo azulado/rosado mientras que aquellas que no hacen uso de la lactosa/ sacarosa formarán colonias con el centro oscuro y un halo transparente.

Se utiliza para la detección de bacterias coliformes, especialmente la especie *Escherichia coli* (Imagen 2). Además de éstas, también se utiliza para la diferenciación de *Enterobacter aerogenes* y *Candida albicans* (Tabla 3).



Imagen 1: Crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* en medio EMB.

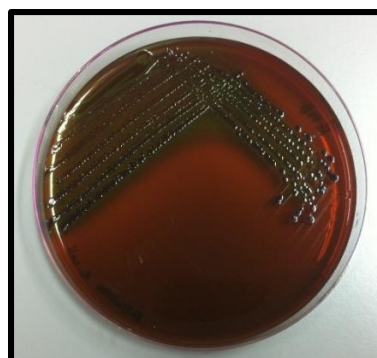


Imagen 2: Crecimiento de bacterias entéricas Gram negativas.

Composición (g/l)

Eosina amarillenta	0,4
Azul de metileno	0,065
Lactosa	5,0
Peptona bacteriológica	10,0
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2,0
Sacarosa	5,0
Agar	13,5
pH	7,2 ±0,2

Tabla 3: Compuestos medio de cultivo EMB

Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) de PanReac AppliChem → Medio de cultivo de color beige oscuro utilizado para el aislamiento y recuento de *Lactobacillus*. La peptona bacteriológica, la dextrosa, el sulfato de magnesio y el sulfato de manganeso proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de este tipo de bacterias mientras que el Amonio Hidrógeno Citrato inhibe el crecimiento del resto de los microorganismos (Tabla 4).

Fórmula en g/l	
Dextrosa	20,00
Peptona bacteriológica	10,00
Extracto de carne	8,00
Acetato de sodio	5,00
Extracto de levadura	4,00
Fosfato dipotásico	2,00
Amonio Hidrógeno Citrato	2,00
Polisorbato 80	1,00
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Agar	10,00
pH	6.2±0.2
Temperatura	25°C

Tabla 4: Composición del medio de cultivo MRS

Vogel Johnson Agar (VJ Agar) de Scharlau→ Medio de cultivo color anaranjado utilizado para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus* fermentadores de manitol a partir de alimentos u otros materiales sanitarios y clínicos. La tripteína y el extracto de levadura proporcionan los nutrientes, el cloruro de litio y la glicina inhiben el crecimiento de algunos microorganismos Gram negativos y Gram positivos, haciendo este medio selectivo para estafilococos (Imagen 3). El rojo de fenol es el indicador de pH y el Agar es el agente solidificante al igual que en el resto de los medios (Tabla 5).

Los estafilococos que fermentan el manitol, producen un viraje en el medio, cambiando éste de color (Imagen 4).

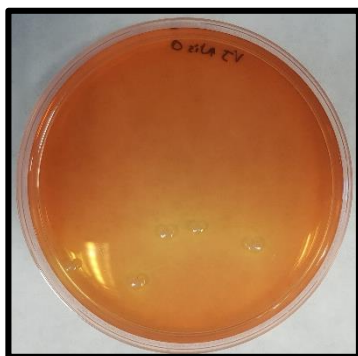


Imagen 3: Medio VJ sin virar.

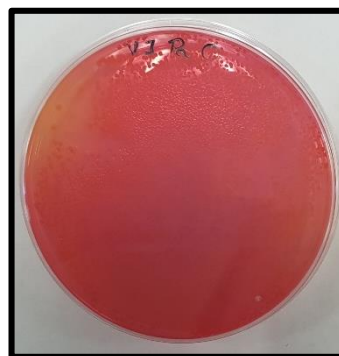


Imagen 4: Medio VJ virado.

Fórmula en g/l	
Triptona	10,00
Extracto de levadura	5,00
Manitol	10,00
Fosfato dipotasico	5,00
Cloruro de litio	5,00
Glicina	10,00
Rojo de fenol	0,025
Agar	15,00
pH	7,2±0,2
Temperatura	25°C

Tabla 5: Composición del medio de cultivo VJ

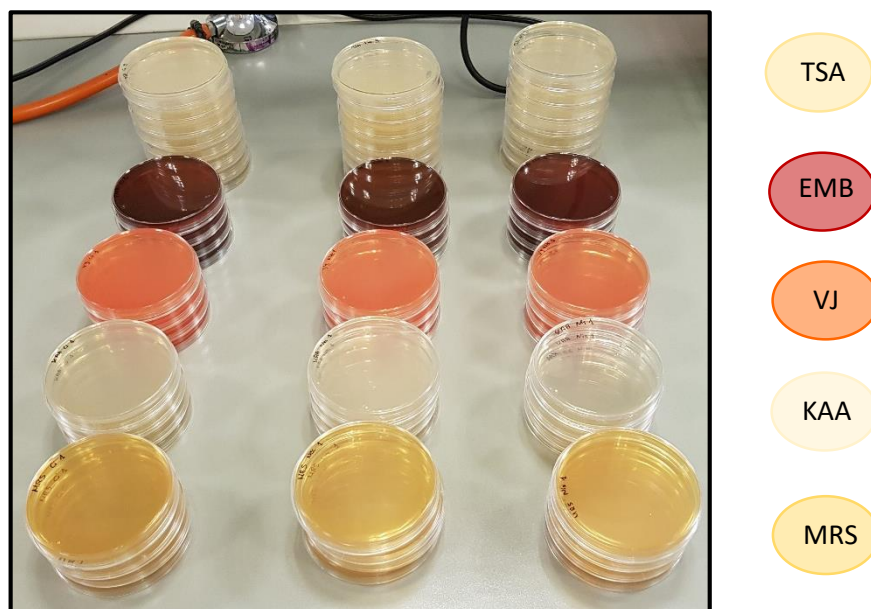


Imagen 5: Medios de cultivo utilizados para el aislamiento y recuento de muestras.

4.2.2. Preparación de los medios de cultivo

Se ha preparado un matraz de 800 ml para cada medio selectivo, es decir, un matraz de 800 ml para el MRSA, otro para EMB, otro para KAA y otro para Vogel – Johnson. Para el TSA, medio general, se han preparado dos matraces, uno de 800 ml y otro de 400 ml, puesto que el número de placas que se han requerido de este medio es mayor.

Para la preparación de cada medio se va a partir del medio deshidratado comercial que indica los gr/l que se necesitan de dicho medio y la cantidad de agar que contiene (Imagen 6). Como en la preparación comercial los gramos que se necesitan vienen para 1 l, se ha que ajustado la cantidad para los 800 ml del matraz. Además de esto, cada medio cuenta con una cantidad de agar determinada, cantidad que también se ha ajustado hasta 18 gr/l para dar mayor consistencia a los medios (Tabla 6).

MEDIO	CANTIDAD DE MEDIO EN 800 ml	CANTIDAD DE AGAR EN 800ml
TSA	40gr/l 800 ml → 32 gr	15 gr/l + 3gr/l = 18gr/l 800 ml → 2.4 gr
EMB	36gr/l 800ml → 28.8 gr	13.5 gr/l + 4.5 gr/l = 18 gr/l 800ml → 3.6 gr
KAA	43gr/ l 800ml → 34.4 gr	10gr/l + 8 gr/l = 18gr/l 800 ml → 6.4 gr
VJ	60gr/l 800ml → 48 gr	15 gr/l + 3 gr/l = 18 gr/l 800 ml → 2.4 gr
MRSA	62gr/l 800 ml → 49.6 gr	10 gr/l + 8 gr/l = 18 gr/l 800 ml → 6.4 gr

Tabla 6: Cálculo de la cantidad de gramos requeridos de medio y de agar.



Imagen 6: Medios deshidratados comerciales de Scharlab (Barcelona) empleados.

4.2.3. Preparación de la solución salina

Se han preparado 3 matraces de 200 ml de solución salina al 0.9 % utilizando para ello agua destilada y cloruro de sodio. De esta solución salina, se destinarán 50 ml para la dilución inicial de cada alimento. Utilizando esta misma solución salina, se han preparado tres gradillas con tubos eppendorf de 1,5 ml que se utilizarán para las diluciones seriadas. Estos tubos eppendorf contienen 0,9 ml de dicha solución (Imagen 7).



Imagen 7: gradilla con eppendorf con 0,9 ml de solución salina.

A continuación se introducen en el autoclave los matraces con los medios, la solución salina, los cuales se han tapado con un tapón de algodón hidrófobo y papel de aluminio, 3 gradillas con 20 eppendorf cada una y 3 cajas de puntas selladas con cinta de autoclavado durante 20 min a 121°C (Imagen 8).



Imagen 8: Medios, solución salina y material para esterilizar.

4.3. Procesado de los alimentos y siembra en placa

Se han utilizado 10 alimentos, en este caso han sido 10 frutas distintas de la temporada de primavera.

Cada alimento ha sido procesado de la misma forma. En primer lugar se han medido las dimensiones (alto, ancho y largo) para poder calcular posteriormente su superficie aproximada. Tras este paso, se han vertido 50 ml de la solución salina en una bolsa hermética, en la que se ha depositado la fruta. Se masajea el alimento durante unos minutos para que de esta forma pase a la solución cualquier tipo de microorganismo de la superficie.

A continuación se hacen diluciones seriadas, considerándose la suspensión inicial obtenida en la bolsa la dilución 0. A partir de esta dilución, se toman 100 µl y se añaden a un eppendorf que contiene 900 µl de solución salina estéril, teniendo así un volumen final de 1 ml y siendo esta la dilución -1. Se repite este proceso para obtener la dilución -2 y -3 (Imagen 9).

Una vez preparadas las diluciones, se pasa a siembra en los distintos medios. Para el TSA se siembran placas con las diluciones 0, -1, -2 y -3 por duplicado, obteniendo un total de 8 placas, mientras que para los medios selectivos solo se siembran las diluciones 0 y -1, también por duplicado, con un total de 4 placas por medio. En cada placa se siembran 100 µl de la dilución correspondiente, siempre en condiciones de esterilidad (Imagen 10).

Las placas se dejan incubando a 37°C en la estufa durante 48 horas, todos los medios excepto el MRSA, que se incuba a 30°C, temperatura óptima de crecimiento de las bacterias lácticas. (Imagen 11).



Imagen 9: Preparación de las diluciones seriadas.



Imagen 10: Preparación de placas para la siembra

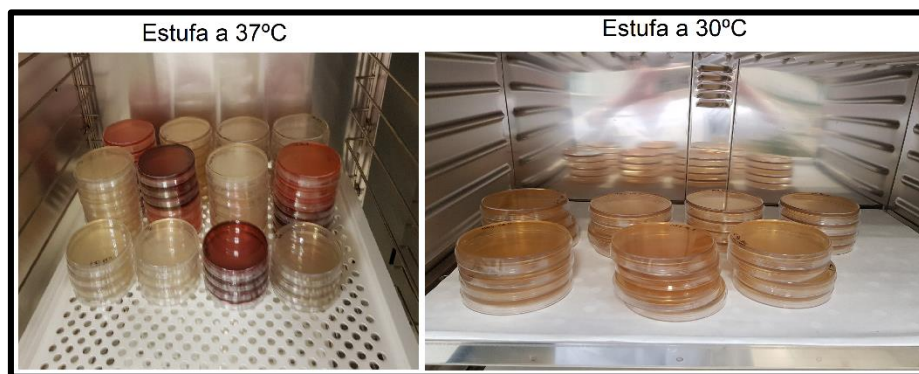


Imagen 11: Placas incubando en las estufas.

4.4. Recuento y tinción

4.4.1. Recuento

Pasadas las 48 horas de incubación se procede al recuento de las colonias crecidas en las distintas placas. Para dicho recuento se utilizan aquellas placas correspondientes a la dilución en que hayan crecido un número de colonias que oscile entre 20 y 200. Para conocer el número de colonias que hay en cada placa, vamos marcando en la base de la placa con un rotulador aquellas colonias que ya hemos contado para no cometer errores y así obtener un número más exacto de UFC (unidades formadoras de colonias) y vamos creando zonas en las que ya conocemos el número de colonias (Imagen 12 y 13).

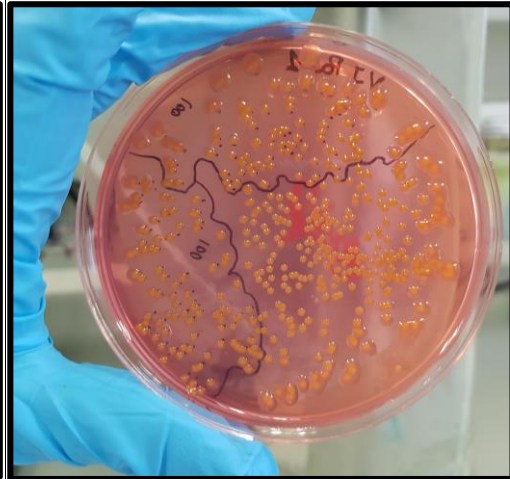
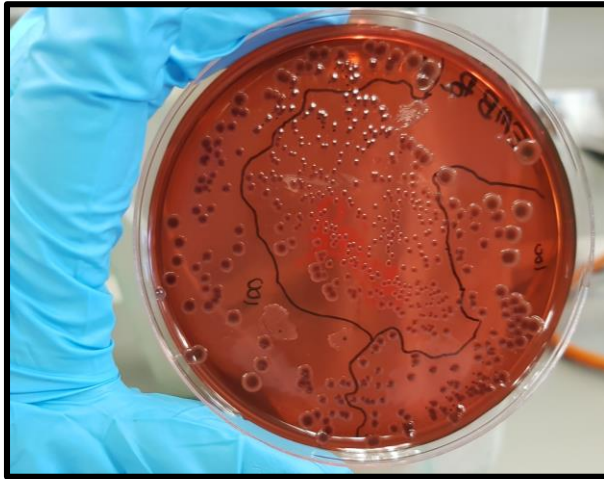


Imagen 12: Recuento en placa EMB.

Imagen 13: Recuento en placa VJ.

4.4.2. Tinción

Tras el recuento de cada medio, se realiza una tinción de GRAM para cada tipo de colonia obtenida en los medios. La tinción de Gram fue desarrollada por el bacteriólogo Christian Gram en 1884 y el objetivo principal de esta tinción es clasificar a las bacterias en dos clases: Bacterias Gram positivas y Bacterias Gram negativas, en función de su pared celular.

La tinción se ha realizado para determinar la morfología (cocos, bacilos, cocobacilos) y el tipo de agrupación (parejas, tétradas, racimos, cadenas), en su caso, del microorganismo aislado. El protocolo es el siguiente:

1. Colocar una gota de agua destilada en el portaobjetos y resuspender la colonia aislada.
2. Fijación con calor.
3. Cubrir el portaobjetos con cristal violeta (2').
4. Cubrir el portaobjetos con lugol (2').
5. Decoloración con etanol.
6. Lavar con agua destilada para detener la decoloración.
7. Agregar safranina para cubrir el portaobjetos y dejar actuar (3').
8. Lavar con agua destilada.
9. Dejar secar la preparación
10. Observación al microscopio.

Una vez que se ha teñido, en el microscopio se pueden observar dos tipos de bacterias, que pueden ser Gram positivas o Gram negativas:

- Gram positivas: son aquellas bacterias que mantienen la coloración del cristal violeta tras la decoloración, por lo que van a aparecer de color violeta/morado (Imagen 14).
- Gram negativas: por el contrario, son las bacterias que se tiñen con el colorante de contraste, es decir, con la safranina y aparecerán de color rosa (Imagen 15).

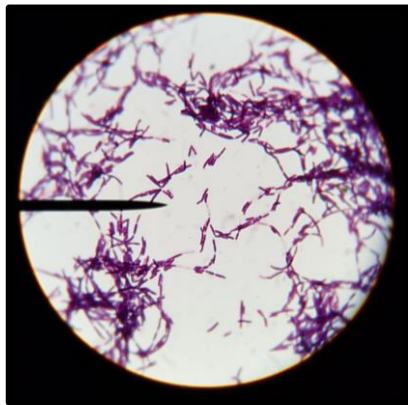


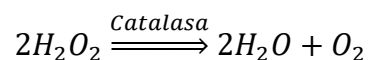
Imagen 14: Bacteria GRAM (+) observada al microscopio.



Imagen 15: Bacteria GRAM (-) observada al microscopio.

4.5. Prueba de la catalasa

La enzima catalasa cataliza la liberación de oxígeno y agua a partir del peróxido de hidrógeno:



Para realizar esta prueba, partimos de la colonia que se ha utilizado para la tinción, se toma una parte de ella y se deposita, con la ayuda de un asa bacteriológica, sobre una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Podemos visualizar dos tipos de respuestas (Imagen 16):

- Catalasa positiva: Se puede observar burbujeo y esto indica que hay producción de oxígeno.

- Catalasa negativa: No se observa burbujeo, por lo que no hay producción de oxígeno.



Imagen 16: Prueba de la catalasa en una de las colonias aisladas de la breva. Se puede observar como la colonia blanca del TSA es catalasa negativo mientras que en el resto es catalasa positiva.



Imagen 17: Materiales y colorantes utilizados en la tinción de GRAM y prueba de la catalasa.

4.6. Cálculo de la superficie del alimento

Para calcular la superficie de cada una de las frutas utilizadas, se ha aproximado la forma de dicho alimento a la figura geométrica más similar y se han medido distintas dimensiones: largo, ancho y alto. Una vez que se han obtenido estos datos, aplicando la fórmula correspondiente, se consigue el valor más aproximado posible al de la superficie de cada uno de los alimentos analizados, como podemos observar en la tabla 7.

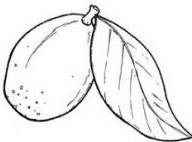
Alimento y figura geométrica	Área	Alimento y figura geométrica	Área
 Paraguay ≈ Cilindro	$A = 2\pi \cdot r(h + r)$ $= 2\pi \cdot 4(2,5 + 4)$ $= 163,4 \text{ cm}^2$	 Breva ≈ Cono	$A = \pi \cdot r^2 + \pi r g =$ $= \pi \cdot 2,25^2 + \pi \cdot 2,25 \cdot 5,5 =$ $= 54,8 \text{ cm}^2$
 Albaricoco ≈ Esfera	$A = 4\pi \cdot r^2 = 4\pi \cdot (2,5)^2$ $= 78,5 \text{ cm}^2$	 Pera ≈ Cono Pedúnculo ≈ cilindro	$Area_{total} = \text{Cuerpo de la pera} + \text{pedúnculo}$ $= 62,22 \text{ cm}^2$ $A_{pera} = \pi \cdot r^2 + \pi r g =$ $= \pi \cdot 2,5^2 + \pi \cdot 2,5 \cdot 5,15 =$ $= 60,08 \text{ cm}^2$ $A_{pedúnculo} = 2\pi \cdot r(h + r) =$ $= 2\pi \cdot 0,2(1,5 + 0,2) = 2,14 \text{ cm}^2$
 Melocotón ≈ Esfera	$A = 4\pi \cdot r^2 = 4\pi \cdot (3)^2$ $= 113,1 \text{ cm}^2$	 Níspero ≈ cono	$A = \pi \cdot r^2 + \pi r g =$ $= \pi \cdot 2,5^2 + \pi \cdot 2,5 \cdot 6,5 =$ $= 54,8 \text{ cm}^2$
 Cereza ≈ Esfera	$A = 4\pi \cdot r^2 = 4\pi \cdot (1)^2$ $= 12,6 \text{ cm}^2$	 Nectarina ≈ Esfera	$A = 4\pi \cdot r^2 = 4\pi \cdot 3,5^2$ $= 153,9 \text{ cm}^2$
 Fresa ≈ Cono	$A = \pi \cdot r^2 + \pi r g$ $= \pi \cdot 2^2 + \pi \cdot 2 \cdot 4,92$ $= 43,5 \text{ cm}^2$	 Ciruela ≈ Esfera	$A = 4\pi \cdot r^2 = 4\pi \cdot 2,5^2 =$ $= 78,5 \text{ cm}^2$

Tabla 7: Cálculo de la superficie de los alimentos.

$h = \text{altura}; r = \text{radio}; g = \text{hipotenusa}$

Hay que puntualizar que para el cálculo de la superficie de aquella fruta cuya aproximación ha sido a un cono, se ha recurrido al Teorema de Pitágoras para obtener el valor de “ g ” y de esta forma poder calcular la superficie.

Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se calculan en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{cm^2} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{superficie}}$$

5. RESULTADOS.

5.1. Recuentos en medios selectivos y no selectivos

Una vez que se han incubado las placas durante 48 horas en la estufa a la temperatura óptima de 37°C para el crecimiento bacteriano, procedemos al recuento de colonias. Nos quedamos con aquella placa que tenga un número significativo de colonias, es decir, aquella que contenga entre 20 y 200 UFC. A partir de estas placas, haremos un estudio morfológico a nivel macroscópico de la colonia en el que se deben de incluir datos como color, tamaño, borde, textura y brillo, para posteriormente realizar una tinción de Gram y poder realizar un estudio a nivel microscópico en el que se incluya la morfología de la bacteria, la agrupación y si hay algún dato más destacable. Además de realizar la tinción de Gram, se hará la prueba de la catalasa.

Con los datos obtenidos en el recuento se realiza el cálculo de Unidades Formadoras de Colonias por cm² (UCF/ cm²) de cada medio. Con estos cálculos conoceremos el número de microorganismos presentes en la superficie de cada alimento (Tabla 8).

5.1.1. Resultados obtenidos en el recuento microbiano.

	TSA	EMB	KAA	MRS	VJ
	UFC/cm²	UFC/cm²	UFC/cm²	UFC/cm²	UFC/cm²
Paraguay	2,02X10 ⁴	9,18X10 ³	0	4,90X10 ³	9,18X10 ³
Melocotón	1,15X10 ²	1,77X10	0	7,03X10 ³	2,65X10
Coque	3,38X10 ³	6,37X10	0	0	4,46X10
Pera	0	0	0	4,02X10	4,82X10
Nectarina	3,25X10 ⁰	0	0	2,27X10	0
Cereza	6,75X10 ³	3,97X10	0	0	3,97X10
Breva	2,74X10	0	0	9,12X10 ⁰	2,74X10 ²
Fresa	9,43X10 ²	0	0	0	0
Ciruela	3,18X10	0	0	7,39X10 ²	0
Níspero	2,74X10 ²	1,82X10	9,12X10 ⁰	4,56X10 ²	6,39X10

Tabla 8: Unidades formadoras de colonias por superficie (UFC/cm²) de cada alimento con su respectivo medio de cultivo.

En el medio de cultivo **TSA**, se puede observar que hay un crecimiento microbiano que va desde el orden de 10⁰ hasta 10⁴, a excepción de la pera en la cual no se observa crecimiento alguno. La mayor tasa de crecimiento se encuentra en el Paraguay, con un recuento total de 2,02X10⁴ UFC/cm².

En el medio de cultivo **EMB (eosina azul de metileno agar)** para bacterias lactosa positivas, se detecta que el crecimiento de microorganismos en general es muy bajo, salvo en Paraguay, en el que hay un crecimiento de 9,18X10³ UFC/cm².

El medio de cultivo **KAA (Kanamycin aesculin azide)**, el crecimiento microbiano es inexistente en todas las muestras excepto en níspero, con un recuento de 9,12X10⁰ UFC/cm².

En el medio de cultivo **MRS (Man, Rogosa and Sharpe)** a 30°C, se aprecia una variación en el crecimiento de microbiano que va desde el orden de 10 hasta 10³ UFC/cm², salvo en coque, cereza y fresa, muestras en las que el crecimiento es inexistente.

Por último, en el medio de cultivo **VJ (Vogel and Johnson)**, se aprecian recuentos bajos, similares a los que se han obtenido en el medio EMB. En este medio de cultivo no se ha observado ningún tipo de crecimiento en la nectarina, fresa y ciruela. Sin embargo, en paraguay se observa un crecimiento de $9,18 \times 10^3$ UFC/cm².

5.2. Identificación de las colonias.

Con los datos recopilados durante las distintas sesiones podemos hacer una identificación aproximada del tipo de bacterias que han crecido en los distintos medios empleados.

En **TSA** se aprecia un crecimiento muy diverso de colonias, diferenciando 4 tipos con diferentes características. Las colonias blancas rugosas presentan una morfología típica de levaduras, por otra parte, las colonias transparentes, blancas y amarillas tienen morfologías y tinciones variadas.

En el **EMB** se distinguen dos tipos de colonias, unas colonias oscuras con un halo transparente, con una tinción Gram negativa, morfología bacilar o cocobacilar y catalasa positiva. Estas características hacen sospechar que se trata de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Por otra parte, las colonias blancas rugosas tienen una morfología típica de levaduras.

En el **KAA** solo se han diferenciado un tipo de colonias, blancas pequeñas, pero no presentan el halo oscuro característico de las colonias de este medio, por lo que no podemos decir que se trate de bacterias del género *Enterococcus*, aunque el resto de características si coincidan con las características de las bacterias del género *Enterococcus*.

En el **MRS** han aparecido tres tipos de colonias. Se distinguen colonias pequeñas blancas con una tinción Gram positiva donde las bacterias presentan una morfología bacilar. Las colonias blancas de tamaño mediano tienen las mismas características que las colonias blancas pequeñas. Conociendo estas características podemos intuir que se trata de bacterias del género *Lactobacillus*. Las colonias blancas rugosas tienen una morfología típica de levaduras.

En el medio **VJ** encontramos tres tipos de colonias. Las colonias amarillas/transparentes presentan una tinción Gram positiva cuyas bacterias tienen una morfología cocobacilar y dan positivo en la prueba de la catalasa. Por otra parte, las

colonias blancas/ rosáceas aparecen cuando el medio ha virado y las bacterias aparecen como cocos Gram positivos. También han aparecido colonias blancas cuyas bacterias son cocos Gram positivos. Con esta información se puede intuir que se trata de bacterias del género *Staphylococcus*.

- **Paraguay.**

La aparición en TSA de colonias amarillas con bacilos Gram negativos productores de catalasa revela la posible presencia de Enterobacterias, puesto que en el medio EMB también han aparecido colonias oscuras con un halo transparente que tienen las mismas características. Por otra parte, las colonias blancas que han crecido en TSA, cuyas bacterias son cocos Gram positivos productores de catalasa, presentan las mismas características que las colonias que han aparecido en el medio VJ por lo que se podría confirmar la existencia de bacterias del género *Staphylococcus*.

En el KAA no hay crecimiento alguno, descartando así la presencia de *Enterococcus*.

En el medio MRS han crecido tres tipos de colonias distintas: blancas pequeñas, blancas medianas y blancas rugosas. Las colonias blancas pequeñas y las colonias blancas medianas presentan las mismas características, al observarlas al microscopio se pueden ver bacilos Gram positivos catalasa negativa, como podemos observar en la tabla 9. Con estos datos podemos intuir que se trata de bacterias del género *Lactobacillus*. Por último, las colonias blancas rugosas, al observarlas al microscopio se podían ver microorganismos con forma de uso, lo que indicaría que se trata de levaduras.

Paraguay						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Amarilla	Bacilos	-	Sin agrupación	+	Bacteria
	Blanca	Cocos	+	Cadenas cortas/ parejas	+	Bacteria
EMB	Oscura*	Bacilos	-	Sin agrupación	+	Bacteria
KAA	No hay crecimiento					
MRS	Blanca pequeña	Bacilos	+	Sin agrupación	-	Bacteria
	Blanca mediana	Bacilos	+	Sin agrupación	-	Bacteria
	Blanca rugosa	Huso		Sin agrupación		Levadura
VJ	Amarilla	Cocobacilos	+	Cadenas	+	Bacteria
	Blanca	Cocos	+	Racimos	+	Bacteria

Tabla 9: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias del Paraguay. *Las colonias oscuras que han aparecido en el EMB presentan un halo transparente.

- **Melocotón.**

Como se puede observar en la tabla 10, en TSA han aparecido bacterias que tienen las mismas características que las que han aparecido en el medio VJ, siendo cocos Gram positivos con actividad catalasa y es por esto que probablemente se trate de bacterias del género *Staphylococcus*. También han aparecido colonias transparentes que al observarlas al microscopio se observan bacilos Gram negativos sin actividad catalasa. Al no crecer estas bacterias en ninguno de los medios selectivos y no tener más datos, no podemos identificar a que género pertenecen.

En los medios selectivos MRS y VJ se aprecia crecimiento bacteriano por lo que probablemente se trate de bacterias del género *Lactobacillus* y *Staphylococcus*

respectivamente. Al no haber crecimiento bacteriano en los medios EMB y KAA podríamos descartar la presencia de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y bacterias del género *Enterococcus*.

MELOCOTÓN						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Amarilla	Cocos	+	Tétradas	+	Bacteria
	Transparente	Bacilos	-	Sin agrupación	-	Bacteria
	Blanca	Cocos	+	Cadenas cortas o parejas	+	Bacteria
EMB	No hay crecimiento					
KAA	No hay crecimiento					
MRS	Blanca	Huso		Individual		Levadura
VJ	Blanca	Cocos	+	Sin agrupación	+	Bacteria
	Amarilla/ transparente	Cocobacilos	+	Sin agrupación	+	Bacteria

Tabla 10: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en el melocotón.

- **Coque.**

En el medio TSA han crecido tres tipos de colonias: blancas, amarillas y blancas grandes. Por otra parte, como podemos ver en la tabla 11, en el medio VJ han crecido colonias blancas con las mismas características que las que han aparecido en el TSA, siendo colonias cuyas bacterias tienen forma de cocos Gram positivos catalasa positiva. Con estos datos podríamos intuir que se trata de bacterias del género *Staphylococcus*. En VJ también han crecido otras colonias que son amarillas/transparentes que presentan otras características y que no podríamos identificar con esta información. Las colonias amarillas que han crecido en el TSA tienen las mismas

características que las colonias oscuras con un halo transparente que han aparecido en el medio EMB, siendo bacterias con forma de cocobacilos Gram negativos catalasa positiva. Atendiendo a esto, se podría intuir que se trata de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. La otra colonia que ha crecido en este medio tiene características propias de las levaduras. En TSA ha crecido un tercer tipo de colonias, que al observarlas al microscopio se observarían bacilos Gram positivos catalasa positiva. Este tipo de colonia no podríamos identificarla con los datos que tenemos.

En el KAA no se ha registrado ningún tipo de crecimiento por lo que se podría descartar la presencia de bacterias del género *Enterococcus*.

En el MRS han aparecido colonias blancas que al observarlas al microscopio se observa que los microorganismos tienen forma de huso, morfología típica de levaduras.

COQUE						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Blanca	Cocos	+	Racimo	+	Bacteria
	Amarilla	Bacilo/cocobacilo	-	Sin agrupación	+	Bacteria
	Blanca grande	Bacilo	+	Cadenas	+	Bacteria
EMB	Oscura*	Cocobacilo	-	Racimo	+	Bacteria
	Blanca, rugosa	Huso		Sin agrupación		Levadura
KAA	No hay crecimiento					
MRS	Blanca	Huso		Sin agrupación		Levadura
VJ	Blanca	Cocos	+	Racimo	+	Bacteria
	Amarilla/transparente	Cocobacilo	+	Sin agrupación	+	Bacteria

Tabla 11: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en el coque. *Las colonias oscuras que han aparecido en el EMB presentan un halo transparente.

- **Pera.**

Tan solo se aprecia crecimiento bacteriano en el medio VJ. Son colonias transparentes cuyas bacterias son cocos Gram positivos catalasa negativa, como se puede ver en la tabla 12. Con estos datos no podríamos hacer una identificación de dichas bacterias.

En el MRS han aparecido colonias que por sus características se intuye que son levaduras.

En el resto de medios no se ha producido crecimiento por lo que se descarta la presencia de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Staphylococcus*.

PERA						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	No hay crecimiento					
EMB	No hay crecimiento					
KAA	No hay crecimiento					
MRS	Blanca pequeña	Huso		Sin agrupación		Levadura
VJ	Transparente	Cocos/Cocobacilo	+	Parejas	-	Bacteria
	Amarilla/transparente	Bacilos	+	Cadenas	+	Bacteria

Tabla 12: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en la pera

- **Nectarina.**

Como aparece en la tabla 13, solo hay crecimiento bacteriano en el medio TSA, siendo colonias cuyas bacterias son cocos Gram positivos catalasa negativa. Con la información que se recoge no podemos identificar a que género pertenece.

En el medio MRS han aparecido colonias cuyas características son típicas de levaduras.

Al no haber crecimiento en los medio EMB, KAA y VJ se descarta la presencia de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, a los géneros Enterococcus y Staphylococcus respectivamente.

NECTARINA						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Blanca	Cocos	+	Sin agrupación	-	Bacteria
EMB	No hay crecimiento					
KAA	No hay crecimiento					
MRS	Blanca	Huso		Sin agrupación		Levadura
VJ	No hay crecimiento					

Tabla 13: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en la nectarina.

- **Cereza.**

En el medio TSA han crecido dos tipos de colonias: amarillas y transparentes. Al realizar la tinción de Gram de la colonia amarilla y al observarla al microscopio se distinguen bacterias con forma de cocobacilo Gram negativo catalasa positiva. Al mirar el crecimiento que se ha producido en el medio EMB se aprecian colonias que al observarlas al microscopio presentan las mismas características que las colonias descritas anteriormente y es por esto por lo que podríamos decir que probablemente se trate de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. El otro tipo de colonia que se distingue en el TSA no coincide con ninguna colonia hallada en el resto de medios selectivos por lo que no podríamos hacer ninguna identificación.

En el medio VJ han crecido colonias transparentes cuyas bacterias presentan una morfología bacilar Gram positiva catalasa positiva. Con estos datos no podemos hacer una identificación de la bacteria observada.

En los medios KAA y MRS no se ha detectado crecimiento bacteriano por lo que se descartaría la presencia de bacterias de los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus* respectivamente (Tabla 14).

CEREZA						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Amarilla	Bacilo/ Cocobacilo	-	Sin agrupación	+	Bacteria
	transparente	Bacilos	-	Sin agrupación	-	Bacteria
EMB	Oscura*	Bacilos	-	Sin agrupación	+	Bacteria
KA	No hay crecimiento					
MRS	No hay crecimiento					
VJ	transparente	Bacilos	+	Parejas/ cadenas cortas	+	Bacteria

*Tabla 14: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en la cereza. *Las colonias oscuras que han aparecido en el EMB presentan un halo transparente.*

- **Breva.**

En la breva no se ha producido ningún tipo de crecimiento microbiano de interés en los medios selectivos, tan solo en el TSA que es el medio general (Tabla 15). Son colonias blancas con bacterias en forma de coco Gram positivas y catalasa negativa, colonias grandes con brillo cuyas bacterias son bacilos Gram positivos catalasa positiva y colonias pequeñas con brillo cuyas bacterias son bacilos Gram negativos catalasa positiva. Como solo han aparecido colonias en el TSA, con los datos que tenemos no podemos identificar estas bacterias puesto que no hay ninguna referencia en los otros medios.

En el medio MRS han aparecido colonias que tienen características típicas de levaduras.

BREVA						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Blanca	Cocos	+	Racimos	-	Bacteria
	Grande sin brillo	Bacillos	+	Cadena	+	Bacteria
	Pequeña con brillo	Bacilo	-	Parejas	+	Bacteria
EMB	No hay crecimiento					
KAA	No hay crecimiento					
MRS	Blanca	Huso		Sin agrupación		Levadura
VJ	No hay crecimiento					

Tabla 15: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en la breva.

- **Fresa.**

En el medio TSA han aparecido tres tipos de colonias, colonias amarillas, blancas y blancas rugosas, como se puede observar en la tabla 16. Las bacterias que se han observado en las colonias amarillas son cocobacilos Gram positivos catalasa positiva, los microorganismos de las colonias blancas son cocos Gram positivos catalasa positiva que se agrupa en racimos y por último, los microorganismos observados en las colonias blancas rugosas presentan una morfología de huso, típica de levaduras.

En el medio VJ han aparecido colonias transparentes cuyas bacterias son cocobacilos Gram positivos catalasa negativa.

Con los datos que se conocen no se puede hacer una identificación aproximada del género al que pertenecen las bacterias que han crecido en ambos medios.

Al no haber crecimiento en los medios EMB, KAA y MRS, se descarta la presencia de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y a los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus* respectivamente.

FRESA						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Amarilla	Cocobacilo	+	Sin agrupación	+	Bacteria
	Blanca	Cocos	+	Racimos	+	Bacteria
	Blanca rugosa	Huso		Sin agrupación		Levadura
EMB	No hay crecimiento					
KAA	No hay crecimiento					
MRS	No hay crecimiento					
VJ	Transparente pequeña	Cocobacilo	+	Sin agrupación	-	Bacteria

Tabla 16: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en la fresa.

- **Ciruela.**

En la ciruela tan solo han aparecido dos tipos de colonias en el medio EMB, colonias blancas pequeñas y medianas con bacilos Gram positivos catalasa negativa (Tabla 17). Estas colonias indican que las bacterias que hay pueden pertenecer al género *Lactobacillus*.

La ausencia de colonias en los medios EMB, KAA y VJ descarta la presencia de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y a los géneros *Enterococcus* y *Staphylococcus* respectivamente.

CIRUELA						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Blanca pequeña	Huso		Sin agrupación		Levadura
EMB	No hay crecimiento					
KAA	No hay crecimiento					
MRS	Blanca mediana	Bacilos	+	Sin agrupación	-	Bacteria
	Blanca pequeña	Bacilos	+	Sin agrupación	-	Bacteria
VJ	No hay crecimiento					

Tabla 17: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en la ciruela.

- **Níspero.**

En el níspero se han aparecido colonias en todos los medios, datos que aparecen en la tabla 18.

En el TSA han aparecido tres tipos de colonias, transparentes grandes con cocobacilos Gram positivos catalasa negativos, otras amarillas en las que se observan bacilos Gram negativos catalasa negativa y por último, colonias blancas en las que se observan bacilos cortos Gram negativos catalasa negativa. En el medio EMB también han aparecido colonias oscuras con un halo transparente cuyas bacterias tienen las mismas características que las colonias amarillas presentes en el TSA, por esto podríamos asumir la presencia de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. El resto de colonias que han crecido en el TSA no podríamos identificarlas con los datos que tenemos.

En el medio KAA han aparecido colonias blancas pequeñas cuyas bacterias son cocos Gram positivos catalasa negativa. Estas colonias no presentan el halo oscuro que caracteriza a este medio por lo que no podríamos decir que se trata de bacterias del género *Enterococcus*.

En el medio MRS han crecido colonias blancas pequeñas a las cuales se les ha realizado la tinción de Gram y posteriormente, al observarlas al microscopio se han

observado bacilos Gram positivos catalasa negativa. Atendiendo a las características mencionadas, podríamos suponer que se trata de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*.

En último lugar, en el medio VJ han aparecido tres tipos de colonias: transparentes, amarillas y blancas. Las bacterias de las colonias transparentes son cocobacilos Gram negativos catalasa positiva. Este tipo de colonias no podríamos identificarlas con la información que tenemos. Las bacterias de las colonias amarillas y blancas son cocos Gram positivos catalasa positiva y atendiendo a estas características podríamos decir que probablemente se trate de bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus*.

NÍSPERO						
Medio	Colonia	Morfología	Gram	Agrupación	Catalasa	Microorganismo
TSA	Transparentes grandes	Cocobacilo	+	sin agrupación	-	Bacteria
	Amarilla	Bacilos	-	Sin agrupación	-	Bacteria
	Blanca	Bacilos cortos	-	Sin agrupación	-	Bacteria
EMB	Oscura*	Bacilos	-	Sin agrupación	-	Bacteria
KAA	Blanca pequeña	Cocos	+	Sin agrupación	-	Bacteria
MRS	Blanca pequeña	Bacilos	+	Sin agrupación	-	Bacteria
VJ	Transparente	Cocobacilo	-	Sin agrupación	+	Bacteria
	Amarilla	Cocos	+	Racimo	+	Bacteria
	Blanca	Cocos	+	Racimo	+	Bacteria

Tabla 18: Características macroscópicas y microscópicas de las colonias halladas en el níspero. * Las colonias oscuras que han aparecido en el EMB presentan un halo transparente.

5.3. Análisis estadístico de la carga microbiana de los alimentos estudiados.

Con los datos que se han ido recopilando se han realizado tres gráficos en los que se compara la carga microbiana presente en cada alimento y que ha crecido en cada medio.

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 centímetro cuadrado (UFC/cm²) y en el eje de la X aparecen las distintas frutas. Se puede observar como la mayor carga microbiana se encuentra en el paraguay, en el coque y en la cereza mientras la menor carga microbiana se ha registrado en la pera y en la nectarina, siendo la carga microbiana en pera inexistente. En el resto de frutas (melocotón, breva, ciruela, fresa y níspero) la carga microbiana que se ha registrado es del orden de 10² y 10 UFC/cm².

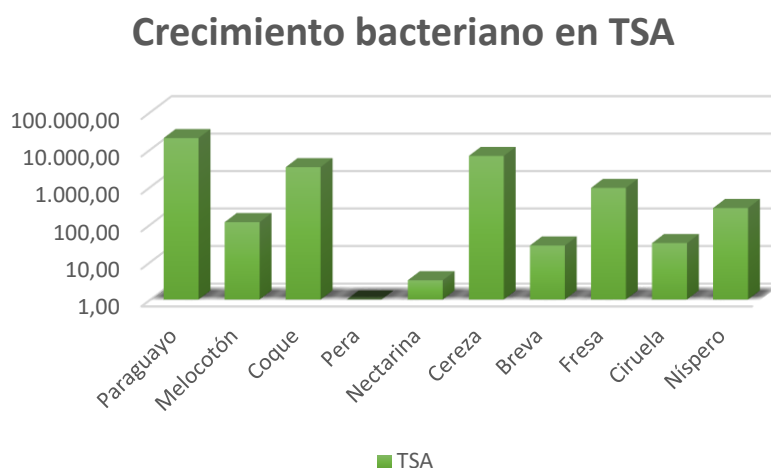


Gráfico 1: Crecimiento bacteriano en TSA.

A continuación, para la representación del gráfico 2 se han utilizado los datos de la 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/cm² y en el eje de la X las frutas y los medios. En primer lugar, si observamos el medio EMB, se puede ver como la mayor tasa de crecimiento se ha obtenido en el paraguay, también se ha registrado crecimiento microbiano, aunque más bajo en el melocotón, coque, cereza y níspero. Sin embargo, no ha habido ningún crecimiento en pera, nectarina, breva, fresa y ciruela.

En el siguiente medio, KAA, solo se ha aparecido carga microbiana en el níspero, con un recuento bajo UFC/cm². En el resto de alimentos no se ha detectado ningún tipo de crecimiento.

En el MRS, las mayores cargas microbianas se han observado en el paraguay y en el melocotón, después, con una carga más baja estarían ciruela y níspero. Ha aparecido una carga microbiana muy baja la pera, coque, nectarina y breva, incluso inexistente en algunas frutas como en el coque, cereza y fresa.

Por último, en el medio VJ la mayor carga microbiana se encuentra en paraguay y la más baja, en este caso nula, en nectarina, fresa y ciruela. En melocotón, coque, pera, cereza, breva y níspero la carga microbiana que se ha observado es muy baja.

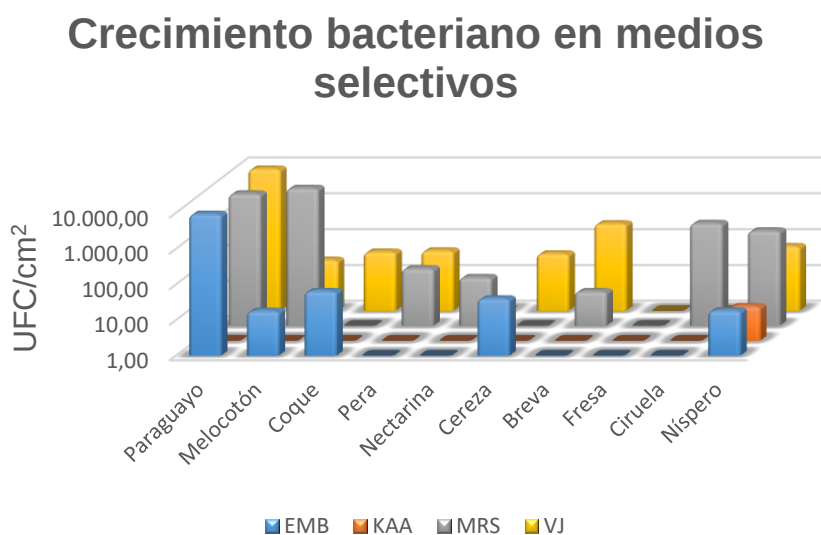


Gráfico 2: Representación de la carga microbiana en los medios selectivos.

En el gráfico 3 se ha comparado la media obtenida en el recuento microbiano en TSA con las medias obtenidas en los recuentos microbianos de los medios selectivos. Cada porción del gráfico representa la carga microbiana media de cada uno de los medios con los que se ha trabajado.

Como se puede observar, el 50% de la carga microbiana observada recae en el TSA, medio general en el que crecen todo tipo de microorganismos. Si enfrentamos cada medio selectivo con el TSA vemos como el recuento microbiano en TSA es mayor que en el resto de los medios. Al analizar el crecimiento medio en cada medio selectivo se puede ver como el medio en el que más crecimiento se ha producido ha

sido el MRS (21%), a continuación iría el VJ (15%), después el EMB (14%) y por último el KAA ($\approx 0\%$) en el que prácticamente no se aprecia crecimiento alguno.

Crecimiento bacteriano medio

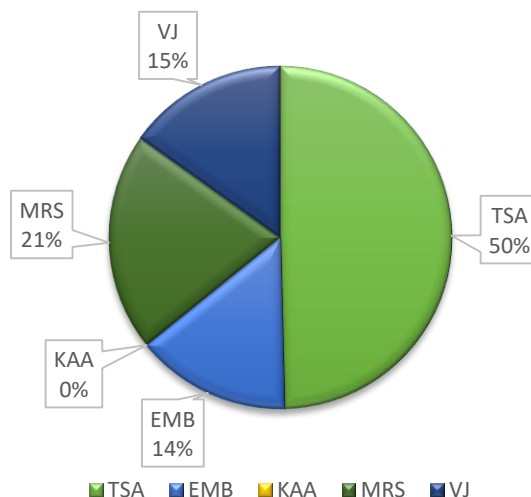


Gráfico 3: Representación del promedio del crecimiento bacteriano en el medio general y en los selectivos.

6. DISCUSIÓN

La microbiota que puede aparecer en la superficie de alimentos vegetales es muy diversa y va a depender de factores externos como son el entorno, el tipo de agua de riego, la maquinaria con la que se procesan o la manipulación humana. Algunos de los microorganismos que pueden aparecer en la superficie de estos productos causan algunas patologías en los seres humanos cuando su ingesta supera determinados valores. En la última década han aparecido diversos brotes de gastroenteritis vinculados con cepas de *Salmonella* no tifoidea y *E. coli* se han relacionado con el consumo de frutas y verduras.

De todas las muestras que se han analizado, tan solo se han obtenido recuentos ligeramente elevados en el medio general del melocotón y recuentos algo más bajos en el resto de medios selectivos para este producto. En el resto de alimentos el crecimiento, en conjunto, es bajo e incluso nulo en algunos casos. En general, con los datos que se ha recopilado se puede observar como los recuentos bacterianos no son significativos. Además, no han aparecido bacterias como *Escherichia coli*,

relacionadas con brotes gastrointestinales causados por el consumo de ciertos alimentos contaminados. La carga microbiana que ha aparecido puede ser a consecuencia de una mala manipulación o un mal uso de los recursos de los que se dispone.

Cuando un producto está contaminado por bacterias de los géneros *E. coli*, *Lactobacillus* o *Staphylococcus* y su carga supera los valores de 10^6 - 10^7 UFC/cm², su consumo es perjudicial para la salud (Gómez *et al*, 2008). Estudios realizados en Finlandia mostraban que el 80% de las frutas procedentes de grandes supermercados presentaban una carga microbiana muy próxima al orden de 10^7 UFC/cm² (Graça *et al*, 2017). Sin embargo, hay otras bacterias que producen la intoxicación a partir de concentraciones mucho más bajas, como por ejemplo el género *Salmonella*, que solo necesita concentraciones del orden de 10 UFC/cm² o el género *Listeria* con concentraciones del orden de 10^2 UFC/cm². Si analizamos nuestros resultados podemos ver que las cargas microbianas que hemos obtenido no superan en ningún caso concentraciones que puedan ser perjudiciales para la salud, puesto que la carga microbiana más alta que hemos obtenido es del orden de 10^4 UFC/cm².

En las muestras que se han analizado, se encuentran bacterias del género *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Todas estas bacterias se encuentran en concentraciones bajas por lo que el consumo de estos productos no sería perjudicial para la salud.

7. CONCLUSIONES

1. 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 las características de las bacterias que se esperaba que crecieran en cada medio.
2. Los mayores recuentos bacterianos que se han encontrado ha sido en paraguayo, tanto en el medio general como en algunos medios selectivos, mientras que en cereza y coque han tenido también recuentos significativos en el medio general y en melocotón en el medio selectivo MRS.

3. Los crecimientos bacterianos más bajos se han registrado en la fresa y en la pera. Esto pensamos que puede ser a consecuencia de que tienen un pH bastante ácido, que dificulta la supervivencia de los microorganismos.
4. El resto de muestras analizadas presentan una carga microbiana poco significativa y en algunos casos nula.
5. En base a las características de crecimiento y a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias, se observa que las bacterias que han aparecido no comparten las mismas características que las bacterias que se esperaba que creciesen en el medio selectivo KAA. Por este motivo no podemos afirmar que se trate de bacterias pertenecientes al género *Enterococcus*. En consecuencia, no habría crecimiento de *Enterococcus* en el medio selectivo KAA en ninguna de las muestras analizadas.
6. En base a las similitudes en las características morfológicas, tinción de Gram y prueba de la catalasa, se observa que gran parte de los microorganismos que han crecido en los medios selectivos también lo han hecho en el medio general.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Barak, J.D. y Schroeder, B.K. (2012). Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. *Annual Review Phytopathology*, 50(2), 241–266.
- Beaudry, R. (2000). Responses of horticultural commodities to low oxygen: Limits to the expanded use of modified atmosphere packaging. *HortTechnology*, 10(3), 491-500.
- Bloom, D.E., Cafiero, E.T., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L.R., Fathima, S., Feigl, A.B., Gaziano, T., Mowafi, M., Pandya, A., Prettnner, K., Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A.Z. y Weinstein, C. (2011). The Global Economic Burden of Non-communicable Diseases. Geneva: World Economic Forum.
- Canella, D. S., Louzada, M. L. da C., Claro, R. M., Costa, J. C., Bandoni, D. H., Levy, R. B. y Martins, A. P. B. (2018). Consumption of vegetables and their relation with ultra-processed foods in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 52(50), 1-11.

- Collins, J. E. (1997). Impact of challenging consumer life styles on the emergence and reemergence of food borne pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), 471-479.
- De Lorenzo, D. (2012). Perspectivas presentes y futuras de la Nutrigenómica y la Nutrigenética en la medicina preventiva. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 32(2), 92-105.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. y Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.
- Doyle, M. P. y Erickson, M. C. (2008). Summer meeting 2007- the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 317-330.
- Dubowitz, T., Heron, M. y Bird, C. E. (2008). Estado socioeconómico del vecindario y consumo de frutas y verduras entre blancos, negros y mexicoamericanos en los Estados Unidos. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6), 1883-1891.
- Fan, L. y Truelstrup, L. (2012). Fermentation and biopreservation of plant based foods with lactic-acid bacteria. En Y.H. Hui (Eds.), *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology* (pp. 35–48). Florida: CRC Press.
- Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. (1993). Contaminación de los alimentos. En W.C. Frazier y D.C. Westhoff (Eds.), *Microbiología de los alimentos* (pp. 75-88). Zaragoza: Acribia, S.A.
- Graça, A., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M. y Quintas, C. (2017). Microbiological quality and safety of minimally processed fruits in the market place of southern Portugal. *Food Control*, 73, 775–783.
- Gómez-López, V.M., Ragaert, P., Jeyachandran, V., Debevere, J. y Devlieghere, F. (2008). Shelf-life of minimally processed lettuce and cabbage treated with gaseous chlorine dioxide and cysteine. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 74–83.
- Guesry, P. R. (2005). Impact of 'functional food'. *Forum Nutrition*, 57, 73-83.
- Hernández, F., Chaves, F. y Umaña, M. (2001). Aislamiento de *Clostridium tetani* en la ciudad de Puntarenas, Costa Rica y el fenómeno de "swarming". *Revista Biomédica*, 12(2), 80-84.

- Liu, R. H. (2013). Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *American Society for Nutrition*, 4(3), 384–392.
- Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134(12), 3479–3485.
- Lurie, S. (2001). Physical treatments as replacements for post-harvest chemical treatments. *Acta Horticulturae*, 553(124), 533-536.
- Lurie, S. (1998). Post-harvest heat treatments. *Post-harvest Biology and Technology*, 14(3), 257-269.
- Marvasi, M., Hochmuth, G. J., Giurcanu, M. C., George, A. S., Noel, J. T., Bartz, J. y Teplitski, M. (2013). Factors that affect proliferation of Salmonella in tomatoes post-harvest: The roles of seasonal effects, irrigation regime, crop and pathogen genotype. *PLOS ONE*, 8(12), 1-11.
- Miller, M., Anderson, M. y Francis, C. (2016). Necesidades críticas de investigación para una adaptación exitosa de los sistemas alimentarios al cambio climático. *Revista de Agricultura, Sistemas Alimentarios y Desarrollo Comunitario*, 3(4), 161-175.
- Morton, D.R. (2001). Aerobic Plate Count. En F.P. Downes y K. Ito (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 63-68). Washington, DC : American Public Health Association.
- Niyogi, S.K. (2005). Shigellosis. *Journal of Microbiology*, 43(2), 133–143.
- Omran, A.R. (1971). The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. *The Milbank Memorial Fund Quarterly*, 83(4): 731–757.
- Pascual, M.P. y Calderón, P. (2000). Frutas y derivados. En B. Apellido (Eds), *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. (pp. 341-346). Madrid: Díaz de Santos, S.A.
- Pessoa, M. C., Mendes, L. L., Gomes, C. S., Martins, P. A. y Velasquez-Melendez, G. (2015). Food environment and fruit and vegetable intake in an urban population: A multi-level analysis. *BMC Public Health*, 15(1012), 1-8
- Poovaiah, B. W. (1986). Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. *Food Technology*, 40(5), 86-89.
- Puig, Y., Leyva, V., Rodríguez, A., Carrera, J., Molejón, P.L., Pérez, Y. y Dueñas, O. (2014). Microbiological quality of vegetables and factors associated

with contamination in growing areas in Havana. *Revista habanera de Ciencias Médicas*, 13(1), 111-119.

- Rezende, L.F.M., Azeredo C.M., Canella, D.S., Luiz, O.C., Levy, R.B. y Eluf, J. (2016). Neto Coronary heart disease mortality, cardiovascular disease mortality and all-cause mortality attributable to dietary in takeover 20 years in Brazil. *International Journal of Cardiol*, 217, 64–68.
- Rizzello, C. G., Filannino, P., Di Cagno, R., Calasso, M. y Gobbetti, M. (2014). Quorum-Sensing Regulation of Constitutive Plantaricin by *Lactobacillus plantarum* Strains under a Model System for Vegetables and Fruits. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 777–787.
- Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, C. R. y Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of food borne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2342-2353.
- Tortora, G.J. y Berdell, R. (2007). Procarionte: dominios Bacteria y Archea. Introducción a la microbiología (pp. 312-344). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Tuomisto, H. L., Scheelbeek, P. F. D., Chalabi, Z., Green, R., Smith, R. D., Haines, A. y Dangour, A. D. (2017). Effects of environmental change on agriculture, nutrition and health: A frame work with a focus on fruits and vegetables. *Wellcome Open Research*, 2(21) 1-31.
- USDA. (2010). Dietary Guide lines for Americans 2010. Recuperado de <https://www.usda.gov/>
- Watkins, C. y Ekman, J. (2005). Storage Technologies: Temperature interactions and effects on quality of horticultural products. *Acta Horticulturae*, 682, 1527 -1533.
- WHO. (2017). Fomento del consumo mundial de frutas y verduras. Recuperado de <http://www.who.int/es>
- Willett, W.C. (2002). Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*, 296(5568), 695-698.
- Yousef, A.E. y Carlstrom, C. (2006). Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio. Zaragoza: Acribia, S.A.

- Zare, E., Lashani, E. y Davoodabadi, A. (2018). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt and milk against *Shigella* strains. *GMS Hygiene and Infection Control*, 13, 1-5.