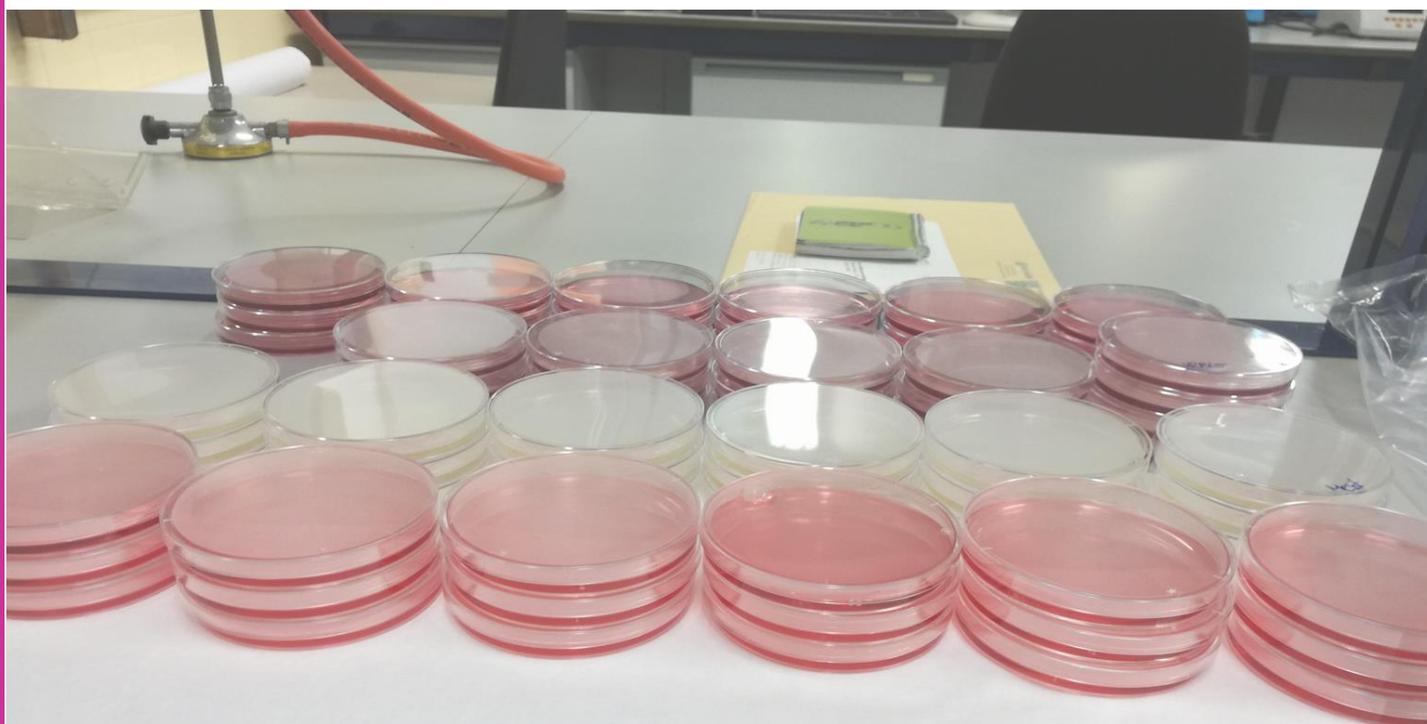


Grado en Biología



Memoria de Trabajo de Fin de Grado

**Análisis de la calidad microbiológica de los alimentos
procedentes de cadenas de comida rápida**

Cristina González Rodríguez
Septiembre, 2018

Director Académico: Enrique Torres Vaamonde

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

D. Enrique Torres Vaamonde, autoriza a la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Análisis de la calidad microbiológica de los alimentos procedentes de cadenas de comida rápida”, presentado por Cristina González Rodríguez para su defensa ante el tribunal cualificado.

En a Coruña a 11 de septiembre de 2018

Fdo.: Enrique Torres Vaamonde

INDICE

RESUMEN	1
CONTROL MICROBIOLÓGICO DE COMIDAS RÁPIDAS.....	2
Introducción.....	2
Objetivos.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS	4
RESULTADOS	8
DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES.....	15
BIBLIOGRAFÍA.....	16
APÉNDICE 1: preparación de los medios de cultivo	18
APÉNDICE 2: figuras.....	21
APENDICE 3: legislación aplicable	25

RESUMEN

La cantidad de usuarios de restaurantes de comida rápida crece cada año. Este factor puede estar favoreciendo la transmisión de enfermedades por este tipo de alimentos, generalizado como un problema a nivel mundial.

El presente trabajo de investigación pretende profundizar en la presencia de carga microbiana, indicadora (mesófilos aerobios totales, enterobacterias y coliformes fecales) y patógena (*Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*) en platos preparados en restaurantes de comida rápida en la ciudad de A Coruña. Los platos preparados correspondieron a hamburguesas de cadenas populares de comida rápida, kebab, wok chino, sushi, ensalada preparada, salmón marinado, rollitos de primavera y pizza, los cuales fueron obtenidos durante el año 2017. Se realizaron ensayos microbiológicos donde un 33% de las muestras analizadas quedaron fuera de la legalidad para el control microbiológico.

La presencia de coliformes fecales en varios de estos platos, y del patógeno *Staphylococcus aureus* pone de manifiesto el evidente riesgo microbiológico de los platos de comida rápida.

Palabras clave: comida rápida, análisis microbiológico, aerobios mesófilos totales, enterobacterias, coliformes fecales, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*

SUMMARY

The number of users of fast food restaurants is growing every year. This fact may be favoring the transmission of diseases by this type of food, widespread as a problem worldwide.

The present investigation intends to deepen in the presence of microbial load, marker (total aerobic mesophiles, enterobacteria and fecal coliforms) and pathogenic (*Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.*) in food prepared in fast food restaurants in the city of A Coruña. The prepared meals corresponded to hamburgers of popular fast food chains, kebab, Chinese wok, sushi, prepared salad, marinated salmon, spring rolls and pizza, which were obtained during the year 2017. Microbiological tests were performed where 33% of the analyzed samples were out of legality for microbiological control.

The presence of fecal coliforms in several of this type of food, and the pathogenic *Staphylococcus aureus* highlights the evident microbiological risk of fast food dishes.

Key words: fast food, microbiological analysis, total mesophilic aerobes, enterobacteria, fecal coliforms, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE COMIDAS RÁPIDAS

Introducción

El significado de comida rápida (Levenstein, 2003) es aquella que se dispone de forma industrializada y normalizada para su consumo inmediato. Dentro de ésta, podemos designar comida basura a aquella con un alto contenido de grasas, azúcares y calorías, además poseen aditivos para potenciar el sabor y un alto contenido en conservantes para mantener el producto fresco. Este tipo de comida es muy popular entre la población por lo fácil que es obtenerla, su precio es relativamente barato, tiene una amplia distribución comercial y una gran presión de la publicidad. No suele requerir ningún tipo de preparación por parte del consumidor final o ésta es escasa y tiene una gran diversidad de sabores.

Según Gimferrer, 2014, *prevenir la presencia de patógenos es primordial para asegurar la calidad y la seguridad de los alimentos. En la gran mayoría de ocasiones, el motivo de una infección alimentaria es una mala praxis en la manipulación de los alimentos. Vegetales que no se lavan de forma adecuada, comida elaborada con manos sucias o una mala higiene de los utensilios de cocina son los factores más destacados. Las bacterias son los patógenos más conocidos en la contaminación alimentaria, son los más habituales y los más estudiados.*

Respecto a la calidad de un alimento (Andino y Castillo, 2010) se debe considerar el aspecto microbiológico, que resulta elemental ya que afecta a la conservación y la vida útil del producto, además los microorganismos pueden ser causantes de enfermedades conocidas como enfermedades transmitidas por los alimentos FBI (Foodborne illness). De tal manera que, para garantizar la inocuidad del alimento, se requiere la determinación de criterios para los microorganismos patógenos y/o toxinas y en algunos casos la utilización de microorganismos indicadores (relacionados con la presencia de un patógeno). Por eso, su detección en los alimentos es de vital importancia.

Es necesario conocer las normas microbiológicas en materia de alimentos, las cuales establecen la calidad microbiológica en términos de ciertos microorganismos que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación en alimentos. Los microorganismos relacionados con los alimentos se agrupan en tres clases dependiendo del riesgo que implique. El grupo 1 corresponde a microorganismos que no implican riesgo para la salud pero sí para la vida útil del producto. El grupo 2 incluye microorganismos de riesgo indirecto bajo (indicadores) y finalmente el grupo 3 incorpora a microorganismos de riesgo directo para la salud (patógenos).

A continuación, se señalan algunas características de los microorganismos que se han usado en el marco de este trabajo.

1. Microorganismos mesófilos aerobios totales.

Son todas aquellas bacterias aerobias (dependientes del oxígeno), afines a temperaturas medias, entre 30°C y 37°C y se desarrollan en cualquier medio de agar nutritivo. Este tipo de microorganismos no siempre son patógenos, ya que reconoce la totalidad de microbios presentes en el alimento. Por ello, lo usamos como un indicador de las características higiénicas del alimento. Cuanta mayor presencia de microorganismos aerobios totales se perjudicará la calidad del alimento.

2. Enterobacterias totales.

Pertencen al grupo de las *Enterobacteriaceae* que incluye las bacterias coliformes fermentadoras de lactosa, cepas de *E. coli* no fermentadoras de lactosa, y especies no fermentadoras de lactosa tales como *Salmonella* y *Shigella*. Las enterobacterias totales son también microorganismos indicadores, ya que estas bacterias (la mayoría de las veces de origen fecal) son destruidas en los tratamientos de pasteurización. Por ello su presencia en un número considerable es indicador de la mala higiene de los alimentos.

3. Presencia de Coliformes fecales.

Este grupo de bacterias también pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, se diferencian porque fermentan la lactosa con producción de gas a 44 °C en 24 horas. La mayoría de las veces el género que predomina en las contaminaciones por coliformes fecales es *Escherichia*, pero otros géneros de coliformes termotolerantes son *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. *Escherichia coli* se puede distinguir de los demás coliformes termotolerantes por su capacidad para producir indol a partir de triptófano.

Estos organismos se eliminan fácilmente por tratamiento térmico, por lo cual son particularmente útiles como componentes de criterios microbiológicos para indicar contaminación postproceso térmico.

4. *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son cocos gram positivos que necesitan una fuente de nitrógeno orgánico para poder crecer. Se encuentran en las fosas nasales, la piel y las lesiones de humanos y otros mamíferos y se utilizan como componentes de criterios microbiológicos para alimentos cocidos, para productos que son sometidos a manipulación excesiva durante su preparación y para aquellos que son sometidos a manipulación después del proceso térmico. Generalmente, los estafilococos se eliminan durante la cocción, por lo que su presencia en alimentos sometidos a procesos térmicos se debe a contaminación posterior a este tratamiento. La presencia de *S. aureus* puede indicar un riesgo potencial para la salud, un número elevado de estafilococos puede indicar la presencia de toxinas termoestables (enterotoxinas en los alimentos).

5. *Salmonella spp.*

La fuente inicial de la bacteria es el tracto intestinal de aves y otros animales. Los seres humanos adquieren la bacteria a través de alimentos contaminados como carne de vaca, aves de corral, huevos y sus derivados, o incluso el agua. En Estados Unidos se notifican unos 45 000 casos anuales, pero de hecho pueden llegar hasta 2 ó 3 millones de casos. La enfermedad se produce como consecuencia de una verdadera infección transmitida por los alimentos. La prevención depende de prácticas correctas de manipulación de alimentos, refrigeración y cocinado adecuados.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es el análisis microbiológico de comida rápida. Conocer la carga microbiana de las comidas que se da en ciertos restaurantes, con microorganismos que implican riesgo para la vida útil y calidad del producto (aerobios mesófilos totales), microorganismos indicadores (enterobacterias totales y coliformes fecales) y, por último, microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus* y *Salmonella*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo el experimento lo más fiable posible, se debe tomar una parte representativa del alimento, con todas las características que posea. Para poder realizar los análisis con las muestras lo más frescas posible, éstas son obtenidas el mismo día o bien 12 horas antes, en este último caso son guardadas en la nevera. Una vez se llega al laboratorio es indispensable desinfectar el área de trabajo, y una vez tenemos todo el material disponible ya se puede desenvolver la muestra de comida siempre trabajando bajo la llama.

Las 9 muestras de comida fueron:

1. Menú de hamburguesa y patatas de una cadena de comidas rápidas.
2. Kebab turco.
3. Wok chino.
4. Hamburguesa de una famosa cadena de comidas rápidas.
5. Sushi
6. Ensalada preparada
7. Salmón marinado preparado
8. Rollitos de primavera
9. Pizza

De manera aséptica, se depositan entre 30-50 gramos de muestra, como se observa en la figura 1, junto con 100 ml de agua de peptona estéril (ver apéndice 1) en una bolsa de plástico estéril y ésta a su vez se deposita en un homogeneizador de paletas *Stomacher*, diseñado para maximizar la extracción de microorganismos de muestras de alimentos, durante 1-2 minutos, tal y como se observa en la figura 2.



Figura 1. Bolsa de plástico estéril con muestra de comida



Figura 2. Stomacher

De esta forma se prepara una suspensión homogénea de alimento y microorganismos en un diluyente (dilución madre), lo que permite una preparación subsiguiente de las siguientes diluciones decimales que posteriormente serán cultivadas. Las diluciones empleadas fueron hasta la 1/10000. La figura 3 representa la dilución madre en una botella de 100 ml y alguna de sus consiguientes diluciones seriadas en tubos de 10 ml.

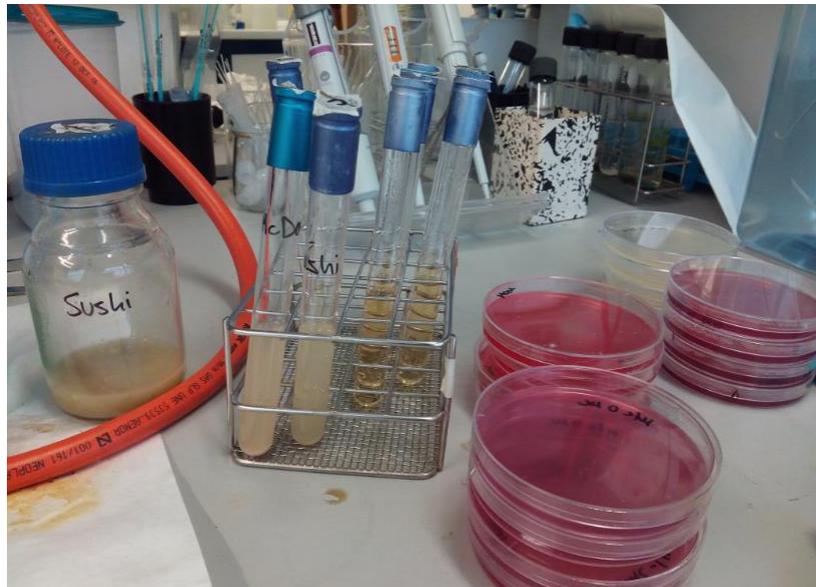


Figura 3. Dilución madre y alguna de sus respectivas diluciones seriadas.

Una vez que se tienen las diluciones de las muestras que se han tomado, se procede a la siembra en los medios de cultivos que se han preparado días antes (apéndice 1).

Para las características de los microorganismos que queremos cuantificar el método de siembra en superficie es ideal. Se pipetea 100 μ l de la muestra de manera aséptica sobre un medio de cultivo. Se esteriliza el asa de Digiralsky introduciéndolo en alcohol, flameando y enfriando. El asa estéril se usa para esparcir la suspensión sobre la superficie del medio.



Figura 4. Técnica de siembra en placa para el recuento de colonias viables. Figura tomada de López y Torres, 2006

El método de siembra en placa se realizó por triplicado y tras un período de incubación diferente para cada tipo de microorganismo, se procede al recuento de unidades formadoras de colonias y como se ha comentado en la Introducción, vamos a detectar diferentes tipos de microorganismos.

1. Microorganismos mesófilos aerobios totales.

Se siembra en el medio de cultivo PCA por triplicado con el método de siembra en placa anteriormente descrito. Las placas sembradas con la dilución madre y sus consiguientes diluciones seriadas se incuban a 30°C durante 72 horas, y se van observando cada 24 horas las colonias formadas.

2. Enterobacterias totales.

Se siembra en placa por triplicado en el medio VRBG, la dilución madre y sus consiguientes diluciones seriadas. Las condiciones de incubación son de 48 horas a 37°C.

3. Presencia de Coliformes fecales.

Siguiendo los procedimientos descritos hasta ahora, es decir, un sembrado en placa de la dilución madre y de las consiguientes diluciones seriadas, se realiza la enumeración por recuento en placa sobre agar m-FC. Se incuban a 44°C durante 24 horas.

4. *Stapylococcus aureus*.

Para su detección y recuento, se siembra en superficie sobre el medio Agar Sal y manitol, empleado para su aislamiento selectivo. Se incuban las placas a 37°C durante 24 horas observando la presencia de colonias amarillas rodeadas de un halo amarillento.

5. *Salmonella spp.*

El aislamiento e identificación de la salmonela se realiza en 4 etapas:

- i. Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo.
- ii. Enriquecimiento en medio líquido selectivo.
- iii. Aislamiento diferencial sobre medio sólido selectivo.
- iv. Confirmación serológica de las colonias sospechosas.

El pre-enriquecimiento no selectivo sirve para que si en el alimento existiesen estos patógenos, las células se multiplicasen para poder aislarse más fácilmente a posteriori, incluso pudiendo repararse las células dañadas. Para ello se siembra en medio de cultivo líquido no selectivo, como es el caso del agua de peptona tamponada, a temperaturas óptimas para el microorganismo, 37°C durante 20 horas. La misma dilución madre utilizada para cada muestra de comida, será incubada para pre-enriquecer a las posibles células de salmonella.

En la etapa 2, se restringe el crecimiento de la flora competitiva. Para ello se utilizan medios con agentes selectivos, ya que no existe ningún medio totalmente selectivo para salmonela.

Se agita el cultivo de pre-enriquecimiento y se siembra 1 ml de cultivo en 10 ml de caldo de tetrionato (figura 5). Se incuba a 37°C durante 24 horas. En la fase del aislamiento diferencial en medio sólido, se utilizan medios de cultivo diferencial. Se siembra sobre agar *Salmonella-Shigella* a partir del cultivo anterior. Las bacterias no fermentadoras de lactosa como *Salmonella spp.* y *Shigella* dan colonias incoloras. A mayores, las fermentadoras de SH₂ dan colonias con un precipitado negro en el centro. Se incuba a

37°C durante 24 horas. Por lo que las colonias sospechosas en este caso serán incoloras y/o con un precipitado negro.

Estas colonias sospechosas son sembradas sobre caldo nutritivo genérico durante 24 horas a 37°C, y a continuación se realizará la prueba serológica confirmativa.

La identificación serológica, se realiza con el Kit set para salmonela, una prueba de aglutinación de látex rápida y simple. Su fundamento es la preparación de antisueros polivalentes contra una amplia gama de antígenos flagelares de salmonela para recubrir las partículas de látex. Una solución que contenga salmonella con estos antígenos será aglutinada rápidamente por el látex formando un aglomerado visible.



Figura 5. Caldo de tetracionato

RESULTADOS

1. Menú de hamburguesa y patatas de una cadena popular de comida rápida.

Tal y como se indica en la tabla 1, los valores más altos de carga microbiana se encuentran en los microorganismos mesófilos aerobios totales, un indicador de las condiciones higiénicas del alimento, dando como resultado 200 ufc para la dilución 1/10 (figura 7, apéndice 2). También en esta dilución se dan resultados para enterobacterias, que actúa también de marcador, dando un resultado de 2 ufc en la dilución 1/10. Presenta ausencia de colonias para el resto de microorganismos.

Tabla 1. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aereus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/10	200 ± 1,4	2 ± 0,58	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Dilución 1/100	11 ± 1,1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

2. Kebab turco.

Como se observa en la tabla 2, los valores para las bacterias mesófilas aerobias totales son bastante altas, siendo posible su conteo en la dilución 1/10000 (ya que en las anteriores diluciones eran incontables), dando un resultado de 202 ufc. En cambio, el resultado para las enterobacterias es de 220 ufc en la dilución 1/10 (figura 8, ap. 2) y presenta ausencia de colonias para el resto de microorganismos. La carga microbiana para esta muestra es bastante alta.

Tabla 2. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aereus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/10	Incontable	220 ± 1,54	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Dilución 1/10000	202 ± 2,42	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

3. Wok chino

La tabla 3, expone los resultados de esta muestra de comida, siendo positivos en mesófilos aerobios totales. El resultado es de 178 ufc para la dilución 1/10, presentando ausencia de colonias para el resto de microorganismos (figura 9, ap. 2).

Tabla 3. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/10	178 ± 1,63	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

4. Hamburguesa de una cadena popular de comida rápida

La muestra sembrada muestra microorganismos mesófilos aerobios totales, presentando ausencia de colonias para el resto de microorganismos. El resultado es de 36 ufc para la dilución 1/10, lo que se considera una carga microbiana baja.

Tabla 4. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/10	36 ± 5,32	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

5. Sushi

Este tipo de comida cruda presenta una alta cantidad de microorganismos, incontables en las primeras diluciones para los mesófilos aerobios totales (figura 10, ap. 2) y las enterobacterias (figura 11, ap. 2) en la dilución 1/10. En esta dilución, en cambio, si es posible el recuento de coliformes fecales (figura 12, ap. 2), siendo el resultado 13 ufc y el recuento de *Staphylococcus aureus* (figura 13, ap. 2), dando un valor de 3 ufc.

En la siguiente dilución 1/100, es posible el conteo de enterobacterias, dando como efecto 43 ufc. Para el recuento de los microorganismos mesófilos aerobios totales es necesario continuar en la dilución 1/1000, mostrando 50 ufc.

Las posibles colonias de *Staphylococcus aureus* fueron observadas al microscopio tras una tinción simple de safranina (figura 14, ap. 2) y se observó que las colonias eran bacilos y no cocos. Descartando así la posible presencia de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 5. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/10	Incontable	Incontable	13 ± 2,47	3 ± 0,57	Ausencia
Dilución 1/100	Incontable	43 ± 2,45	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Dilución 1/1000	50 ± 1,3	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

6. Ensalada preparada

La ensalada produce un incontable número de unidades formadoras de colonias tanto para mesófilos aerobios totales como para enterobacterias, como, tal y como se demuestra en las figuras 15 y 16 (ap. 2). Para poder tener un recuento aceptable de enterobacterias debemos dirigirnos a la dilución 1/100 donde nos encontramos 162 ufc, en cambio, para los mesófilos aerobios totales, es la dilución 1/10000 la que da un resultado contable, produciendo 248 ufc. El resto de medios presenta ausencia de colonias.

En casos así, donde existen grandes cantidades de ufc en un medio, la placa Petri es dividida en 4 sectores, uno de ellos se recuenta y el resultado es multiplicado por 4.

Tabla 6. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/100	Incontable	162 ± 1,62	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Dilución 1/10000	248 ± 1,74	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

7. Plato preparado de salmón marinado

Lo más llamativo de los resultados de esta muestra es la presencia de coliformes fecales, como se observa en la figura 18 (ap. 2), para la dilución 1/10. También existe una presencia incontable de mesófilos aerobios totales en la dilución 1/10 y 22 ufc para enterobacterias, figura 17 (ap. 2). En la siguiente dilución (1/100) el recuento de mesófilos aerobios es posible, dando un resultado de 215 ufc. Respecto al resto de microorganismos, estos se presentan ausentes.

Tabla 7. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/10	Incontable	22 ± 0,81	2 ± 0	Ausencia	Ausencia
Dilución 1/100	215 ± 2,37	3 ± 0,57	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Dilución 1/1000	35 ± 0,56	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

8. Rollitos de primavera

Esta muestra de comida presenta una gran cantidad de microorganismos. Incontables mesófilos aerobios (figura 19, ap. 2), 150 ufc de enterobacterias, también presenta 74 ufc de coliformes fecales (figura 20, ap. 2) y muestra 10 ufc para *Staphylococcus aureus*

(figura 21, ap. 2), todo ello en la dilución 1/10. Es en la siguiente dilución 1/100 donde se pueden apreciar mejor las colonias, dando un resultado de 134 ufc de mesófilos, 27 ufc de enterobacterias y 10 ufc de coliformes fecales.

En el caso de las colonias positivas en el medio de sal y manitol para *Staphylococcus aureus*, uno de las placas se encuentra totalmente recubierta por un halo amarillo. Estas colonias posibles positivas para la bacterias se observan al microscopio con ayuda de la tinción simple de safranina, dando como resultado un agregado de cocos (figura 22, ap. 2). Estos podrían ser *Staphylo* o *Micrococcus*.

Tabla 8. Recuentos obtenidos en las placas (UFC) a partir de la dilución más representativa.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1/10	Incontable	150 ± 3,6	74 ± 1,63	10 ± 0,58	Ausencia
Dilución 1/100	134 ± 3,22	27 ± 0,57	10 ± 0,58	Ausencia	Ausencia
Dilución 1/1000	64 ± 3,71	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

9. Pizza

Los resultados de esta muestra de comida son de bajo recuento microbiano. Para la dilución 1/10 presenta 4 ufc de enterobacterias y 125 ufc de mesófilos aerobios totales. Los demás microorganismos se presentan ausentes en todas las diluciones.

	Mesófilos aerobios	Enterobacterias	Coliformes fecales	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Dilución 1:10	125 ± 3,25	4 ± 0,56	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Dilución 1:100	20 ± 2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Para poder realizar los contajes correctamente se toman en cuenta únicamente aquellas placas Petri que tengan entre 30 y 300 colonias. Las placas que contengan más de 300 ufc se denominan incontables.

Terminado el contaje, se debe aplicar la siguiente fórmula para obtener el número de ufc/g:

$$\frac{ufc}{g} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias por placa}}{ml \text{ muestra sembrada}} \times \frac{100 \text{ ml agua de peptona}}{\text{gramos muestra}} \times \text{factor dilución}$$

Tabla 10.

Resultados de ufc/g de las muestras de alimentos.

Muestras de comida	Mesófilos aerobios (ufc/g)	Enterobacterias (ufc/g)	Coliformes f. (ufc/g)	<i>S. aureus</i> (ufc/g)	<i>Salmonella</i> (ufc/g)
Menú hamburguesa y patatas fritas	$5 \cdot 10^4 \pm 4 \cdot 10^5$	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Kebab	$6 \cdot 10^7 \pm 6,46 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^4 \pm 1,8 \cdot 10^4$	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Wok chino	$2 \cdot 10^4 \pm 4,1 \cdot 10^6$	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Hamburguesa	$8 \cdot 10^3 \pm 1,32 \cdot 10^5$	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Sushi	$1 \cdot 10^6 \pm 2,9 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^4 \pm 5,98 \cdot 10^5$	Presencia	Ausencia	Ausencia
Ensalada preparada	$5 \cdot 10^7 \pm 4,46 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^5 \pm 4,2 \cdot 10^6$	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmón marinado	$7 \cdot 10^5 \pm 7,1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^3 \pm 7,39 \cdot 10^7$	Presencia	Ausencia	Ausencia
Rollitos de primavera	$2 \cdot 10^5 \pm 8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^4 \pm 9 \cdot 10^5$	Presencia	$2 \cdot 10^3 \pm 1,45 \cdot 10^4$	Ausencia
Pizza	$2 \cdot 10^4 \pm 8,5 \cdot 10^5$	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

DISCUSIÓN

Tal y como se aplica en la legislación nacional, apéndice 3, varias muestras de alimentos de nuestro trabajo se encuentran fuera de los parámetros de calidad microbiológica, lo cual es preocupante. Estas muestras son el kebab, la ensalada preparada y los rollitos de primavera.

El kebab, perteneciente al grupo A, comida preparada con tratamiento térmico que lleva ingredientes no sometidos a tratamiento térmico, se encuentra fuera del límite de aceptación microbiológica, ya que supera la cantidad permitida de microorganismos mesófilos aerobios totales y enterobacterias.

En el caso de los rollitos de primavera, éstos se encuentran en el grupo B, comida preparada con tratamiento térmico. Los mesófilos aerobios totales se encuentran en el límite, mientras que las enterobacterias superan la cantidad permitida. Estos rollitos también presentan colonias de coliformes fecales, que como se comentó anteriormente en la mayor parte de las veces son colonias de *E. coli*, superando el límite legal establecido que otorga la ausencia de esta bacteria en este tipo de comidas. Además, hay un posible positivo para *Staphylococcus aureus*, dando un resultado superior al permitido en la legislación vigente.

Dentro del grupo A y B, se encuentran el menú de hamburguesa y patatas de una popular cadena de comida rápida, el wok chino, la hamburguesa de una conocida cadena de comida rápida, y la pizza; siendo tan sólo de kebab y los rollitos de primavera excluyentes de la aceptabilidad microbiológica relativa a los criterios aplicables a los productos alimenticios.

Estos dos platos de comida preparada tienen en común la presencia de abundantes salsas, lo cual es un punto bastante importante a tener en cuenta. Las salsas son un medio ideal para la formación de colonias de microorganismos y suelen ser el factor de riesgo en este tipo de comidas preparadas. Lo más posible es que con este tipo de salsas que se realizan de manera casera no se estén adoptando las buenas prácticas de higiene y manipulación basadas en los principios de un Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC). La seguridad de los productos alimenticios se garantiza principalmente mediante un enfoque preventivo, prestando especial atención a su manipulación y conservación.

Son numerosos los estudios acerca de microorganismos en salsas, estudiando la formación de colonias de bacterias según el tipo de pH, estudiando la inhibición de bacterias según los componentes de las salsas (Rodarte et al, 2015) o planes para mejorar el proceso de elaboración de salsas (Perugachi y Karina, 2012).

Lo más alarmante es la presencia de *Staphylococcus aureus* fuera del límite legal, que usualmente causa infecciones de la piel y en ocasiones neumonía, endocarditis y osteomielitis. Algunas cepas conforman toxinas que causan gastroenteritis, síndrome de la piel escaldada y síndrome de shock tóxico. Esto es debido a que este patógeno soporta bien condiciones extremas aunque se inactiva a temperatura de congelación y puede eliminarse con una cocción correcta. Una vez que el microorganismo llega al alimento el control es sencillo, ya que si la temperatura de refrigeración es adecuada y no se rompe la cadena del frío, el microorganismo no será capaz de formar toxina.

Por otro lado, es de destacar la presencia de coliformes fecales en los alimentos cocinados, ya que este microorganismo es eliminado tras un proceso térmico. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias como el brote de *E. coli* en Alemania en 2011, donde fallecieron 33 personas y se trataron más de 3.000 casos. Para prevenir la infección hay que aplicar medidas de control en todas las etapas de la cadena alimentaria, desde la producción en la granja hasta la elaboración, fabricación y preparación de los alimentos en las cocinas tanto de establecimientos comerciales como de los hogares. La presencia de coliformes fecales deja de manifiesto la pésima desinfección de los alimentos, bien sea por ebullición, por tratamiento con luz UV, o con un tratamiento por hipocloritos. Siendo positiva para los rollitos de primavera, y para las muestras de comida cruda.

Respecto a ensalada preparada, perteneciente al grupo D, comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos se encuentra fuera del límite para mesófilos aerobios totales, siendo no necesario el análisis para enterobacterias. El resultado de las bacterias mesófilas es bastante coherente, ya que la tasa de enfermedades transmitidas por alimentos como frutas y hortalizas sigue siendo alta tanto en la Unión Europea como en EE.UU., lo que supone un importante problema de salud, según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.

Los alimentos crudos presentan un riesgo añadido al resto de alimentos que se cocinan. Debe tenerse en cuenta que el calor es una fuente importante de destrucción de patógenos, así que, puesto que los vegetales están en contacto con bacterias a través del suelo o el agua, para eliminarlas debe mantenerse una escrupulosa higiene. Se suele señalar, sobre todo, a las lechugas embolsadas para ensalada, ya que producen en torno al 25% de los casos de intoxicación. Después de que se conocieran casos de intoxicación por un brote de contagio de *E. coli*, aumentaron las alarmas (Choksi, 2018).

Por otro lado, Koukkidis, 2016 publicó un estudio en que afirma que las bolsas de ensalada son un caldo de cultivo para bacterias como la salmonela.

Respecto al sushi y al salmón marinado, ambos dan una cantidad de ufc que a simple vista parece alarmante, ambos platos se tratan de productos de pescado fresco, cuyo límite legal para el control microbiológico es más amplio, siendo ambos platos aptos para el consumo humano según la normativa española. Posiblemente, aún presentando aceptabilidad microbiológica relativa a los criterios aplicables, muchos consumidores al conocer la carga de ufc presentes en estos platos no los consumirían.

No sólo la presencia del anisakis en los platos de pescado crudo, tan popular en estos momentos amenazan la salud de los consumidores. La carne cruda de pescado mantiene la carga microbiana, por ello se deben cumplir siempre las medidas básicas de higiene.

CONCLUSIONES

Por un lado, la abundante presencia de microorganismos marcadores como mesófilos aerobios totales y enterobacterias nos indica las pésimas características higiénicas de los alimentos, que así mismo también perjudica la calidad de los mismos. Por otro lado, la presencia de coliformes fecales en algunas de las muestras deja de manifiesto la mala desinfección de los alimentos. Por último, la aparición de *Staphylococcus aureus*, un patógeno de riesgo directo para la salud humana en un plato de comida nos indica una mala praxis en la cadena de frío, cocción y manipulación del alimento.

Esto tan sólo pone aún más de manifiesto la poca higiene que se da en ciertos restaurantes, siendo algo básico en la alimentación. Las medidas preventivas para evitar que se deterioren las propiedades de los alimentos, además de evitar posibles intoxicaciones alimentarias son fundamentales.

CONCLUSIONS

On one hand, the abundant presence of marker microorganisms such as total aerobic mesophiles and enterobacteria indicates the terrible hygienic characteristics of the food, which also harms the quality of the those. On the other hand, the presence of fecal coliforms in some of the samples shows the bad disinfection of the food. Finally, the appearance of *Staphylococcus aureus*, a pathogen of direct risk to human health in a food dish, indicates malpractice in the cold chain, cooking and handling of food.

This work shows the poor hygiene that occurs in certain restaurants. Preventive measures to prevent the deterioration of the properties of food, in addition to avoiding possible food poisoning are essential.

BIBLIOGRAFÍA

LEVENSTEIN, H. *Paradox of Plenty: a Social History of Eating in Modern America*. Berkeley: University of California, 2003, p. 228-229.

GIMFERRER, N. Las siete bacterias más comunes en alimentos. *Revista Consumer* [en línea], 26 de abril de 2014. [Consulta: 1 agosto 2018].

<<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2013/02/04/215614.php>>

ANDINO, F y CASTILLO, Y. *Curso microbiología de los alimentos: un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria* [en línea]. Curso universitario. Universidad Nacional de Ingeniería UNI – Norte, 2010. [Consulta: 30 julio 2018].

<<https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>>

LOPEZ, L y TORRES, C. *Estudio cuantitativo de bacterias* [en línea]. Trabajo práctico. Universidad nacional del nordeste, 2006. [Consulta: 30 julio 2018].

<<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>>

RODARTE, L. et al. Comportamiento de microorganismos patogenos en salsa de xoconostle (*Opuntia oligacantha* f. C. Först). *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 2015, vol.1, nº 2.

PERUGACHI, F. y KARINA, M. *Plan de mejora en el proceso de elaboración de salsas de tomate y mayonesas de una planta de alimentos* [en línea]. Tesis doctoral. Universidad de las Américas, 2012. [Consulta: 5 agosto 2018].

<<http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/721/1/UDLA-EC-TIAG-2012-21.pdf>>

CHOKSI, N. E. Coli Outbreak Tied to Romaine Lettuce Expands to 16 States. *The New York Times* [en línea], 19 de abril de 2018. [Consulta: 12 agosto 2018].

<<https://www.nytimes.com/2018/04/19/us/e-coli-romaine-lettuce.html>>

KOUKKIDIS, G. et al. Salad Leaf Juices Enhance Salmonella Growth, Colonization of Fresh Produce, and Virulence. *American society for microbiology* [en línea], 15 de diciembre de 2016. [Consulta: 12 agosto 2018]. DOI 10.1128/AEM.02416-16.

<<https://aem.asm.org/content/83/1/e02416-16.full>>

Centro para el control y la prevención de enfermedades USA [en línea] [consulta 18 agosto de 2018].

<<https://www.cdc.gov>>

TOLEDO, S. et al. *Salmonella spp.* en manipuladores de alimentos en los comedores de una universidad venezolana. *Kasmera* [en línea], julio-diciembre 2011, vol. 38, nº 2. [Consulta 18 agosto 2018].

<<http://www.scielo.org.ve/pdf/km/v39n2/art03.pdf>>

FIDALGO, P. Técnicas de análisis microbiológico de alimentos. *Técnicas en microbiología*. Universidad de A Coruña, 2014.

PASCUAL, M. R. y Calderón, V. *Microbiología alimentaria. Metodología alimentaria para alimentos y bebidas*. Madrid: Díaz de Santos, 1999.

PRADO J, V. et al. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Período 1999-2000. *Revista Médica de Chile* [en línea], mayo 2002, vol. 130, n° 5 [consulta 18 agosto 2018].

<https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872002000500003&lng=es&nrm=iso>

LABORATORIOS BRITANIA: *ficha técnica para el medio de cultivo recuento en placa agar* [en línea]. 11/2015- REV 01. [Consulta 20 julio 2018].

<http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed7368764a.pdf>

LABORATORIOS BRITANIA: *ficha técnica para el medio de cultivo VRBG* [en línea]. 11/2015- REV 01. [Consulta 20 julio 2018].

<http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a298e9b51b44.pdf>

PRONADISA: *ficha técnica para fecal coliforms agar base (m-FC)* [en línea]. [Consulta 20 julio 2018].

<<https://www.condalab.com/pdf/1127.pdf>>

LABORATORIOS BRITANIA: *ficha técnica para el medio de cultivo manitol salado agar* [en línea]. 11/2015- REV 01. [Consulta 20 julio 2018].

<http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed6c53aed1.pdf>

LABORATORIOS BRITANIA: *ficha técnica para el medio de cultivo Salmonela Shigella agar* [en línea]. 11/2015- REV 01. [Consulta 20 julio 2018].

<http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed7669fc8e.pdf>

Seguridad alimentaria. Legislación [en línea]. *Adiveter* [consulta 31 julio 2018], 2003.

<http://www.adiveter.com/ftp_public/legislacion260.pdf>

APÉNDICE 1: preparación de los medios de cultivo

▪ Agua de peptona

Su composición es peptona de carne 10 g/l y cloruro de sodio 5 g/l con un pH final alrededor de 7.2. Se resuspende 15 gramos de polvo en 1 litro de agua destilada. La mezcla es llevada a ebullición y esterilizado en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

▪ Agar para conteo en placa

Contiene peptona de caseína, extracto de levadura, dextrosa y agar, con un pH neutro. En el PCA (Plate Count Agar), la caseína y el extracto de levadura suministran las fuentes de nitrógeno y de vitaminas que requieren para el crecimiento una basta variedad de microorganismos, la dextrosa actúa como fuente de energía y el agar suministra solidez a la mezcla. Está compuesto por 5 g/l de peptona de caseína, 2.5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de dextrosa y 9 g/l de agar. Obteniendo un pH de 7. Se resuspenden 4.4 g en 250 ml de agua destilada. Se calienta hasta llegar al punto de ebullición y se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.



Figura 6. Se muestra como se preparan las placas Petri a partir del medio seleccionado

▪ Agar VRBG

Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa es un medio selectivo y diferencial. El digerido enzimático de gelatina provee nitrógeno, aminoácidos y carbono en el Agar VRBG. El extracto de levadura suministra vitaminas esenciales para el crecimiento de los organismos. Las sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el crecimiento de los cocos Gram-positivos y permiten el crecimiento de organismos Gram-negativos, debido a que la lactosa es el único hidrato de carbono, las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias con diversos tonos de rojo-púrpura en la presencia del rojo neutro, un indicador de pH, mientras que las no fermentadoras de lactosa producen colonias incoloras.

Está compuesto por 3 g/l de extracto de levadura, 7 g/l de peptona, 1.5 g/l de sales biliares, 10 g/l de glucosa, 5 g/l de cloruro de sodio, 0.03 g/l de rojo neutro, 0.002 g/l de cristal violeta y 12 g/l de agar. Con un pH final alrededor de 7.4 en 25°C. Se resuspende 9.6 g en 250 ml de agua destilada. Se lleva a ebullición.

▪ **Agar M-FC**

Los coliformes fecales, por su actividad fermentadora de lactosa, acidifican el medio generando colonias azules, mientras que los no fermentadores darán colonias grises. Las proteínas del hidrolizado de carne aportan la fuente de nitrógeno, la lactosa es el sustrato de fermentación diferenciador, las sales biliares inhiben a las bacterias gram positivas. El cloruro sódico consigue la concentración osmótica adecuada. Por lo que también es un medio selectivo y diferencial.

Está compuesto por 10 g/l de tryptosa, 3 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, 1.5 g/l de sales biliares, 5 g/l de cloruro de sodio, 12.5 g/l de lactosa, 0.1 g/l de azul de anilina y 15 g/l de agar. Obteniendo un pH de 7.4 a 25°C. Se resuspende 13 g en 250 ml de agua destilada y se lleva a punto de ebullición, a mayores se la añade ácido rosólico como complemento.

▪ **Agar SAL Y MANITOL**

Empleado para el aislamiento selectivo. El efecto inhibitor se debe a la alta concentración de cloruro sódico en el medio, también contiene azúcar manitol y rojo fenol como indicador de pH. Si un microorganismo puede llegar a fermentar el manitol, se forma un subproducto ácido que hará que el rojo de fenol en el agar se vuelva amarillo. Especialmente recomendable para *Staphylococcus aureus*.

En caso de un positivo en las placas de agar Sal y manitol, debe confirmarse mediante microscopía que se trata efectivamente de *Staphylococcus aureus*, ya que existen otros microorganismos que pueden crecer en este medio, como *Micrococcus*.

Está compuesto por 5 g/l de caseína, 5 g/l de digestión péptica de tejido de animal, 1 g/l de extracto de carne, 75 g/l de cloruro de sodio, 10 g/l de manitol, 0.025 g/l de rojo de fenol y 15 g/l de agar. Se resuspende 27.8 g en 250 ml de agua destilada. Se lleva a ebullición una vez esté bien mezclado y se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

▪ **Caldo de tetrionato**

La peptona proporciona nitrógeno, carbono, vitaminas y aminoácidos. Se logra selectividad mediante la combinación de tiosulfato sódico y tetrionato. Las sales biliares, como agente selectivo, suprimen las bacterias coliformes e inhiben los organismos gram+. El carbonato de calcio neutraliza y absorbe los metabolitos tóxicos, actuando de tampón para evitar el descenso del pH por la reducción del tetrionato dando un valor de pH estable. Está compuesto por 5 g/l de peptona, 1 g/l de sales biliares, 30 g/l de tiosulfato sódico y 10 g/l de carbonato de calcio. Se resuspende 112 g/l. Además, a este medio se le añade solución yodo-yodurada, verde brillante y novobiocina.

▪ **Agar SALMONELLA-SHIGELLA**

En el medio de cultivo la pluripectona y el extracto de carne aportan los nutrientes para el desarrollo microbiano. Las sales biliares y el verde brillante inhiben el desarrollo de una amplia variedad de bacterias gram+. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable. El tiosulfato de sodio permite la formación de SH_2 que se evidencia por la formación de sulfuro de hierro. El rojo neutro es el indicador de pH y el agar el agente solidificante.

Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. *Salmonella spp.*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen adecuadamente en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes. La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro.

Se compone de 5 g/l de pluripectona, 5 g/l de extracto de carne, 10 g/l de lactosa, 8.5 g/l de sales biliares, 8.5 g/l de citrato de sodio, 8.5 g/l de citrato férrico, 0.00033 g/l de verde brillante, 0.025 g/l de rojo neutro y 13.5 g/l de agar, obteniéndose un pH de 7. Se resuspenden 15.8 g en 250 ml de agua destilada y se lleva a ebullición. Se debe mantener la ebullición durante 2 minutos y a posteriori debe autoclavarse a 121°C durante 15 minutos.

APÉNDICE 2: figuras



Figura 7. Colonias de mesófilos aerobios totales para la dilución 1/10. Menú hamburguesa y patatas fritas

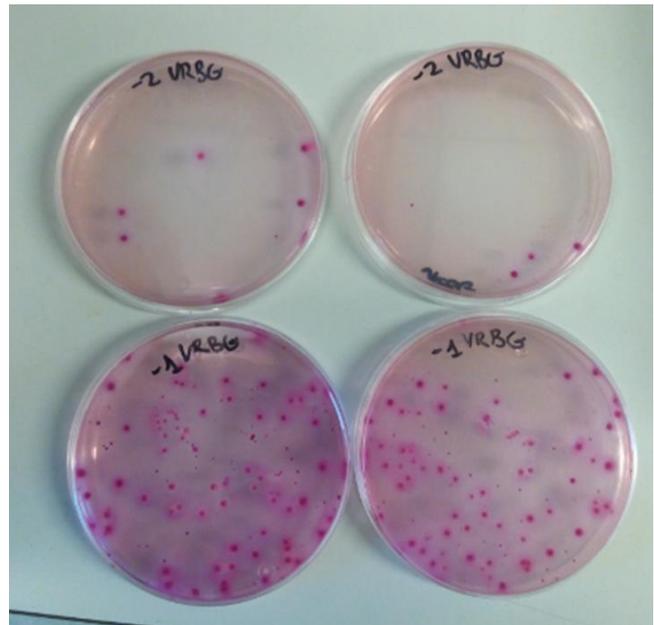


Figura 8. Colonias de enterobacterias en la dilución 1/10 y dilución 1/100 para el kebab

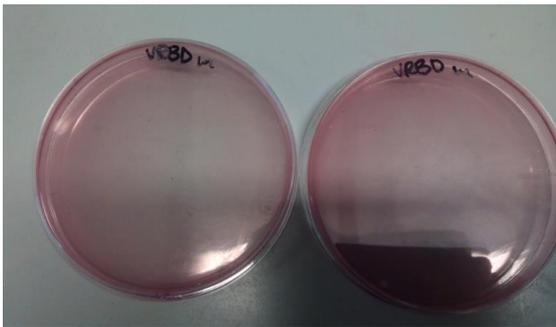


Figura 9. Placas Petri que presenta ausencia total de colonias para la muestra de comida Wok chino



Figura 11. Enterobacterias en el sushi



Figura 10. Incontables ufc de mesófilos aerobios totales en la dilución 1/10 del sushi.

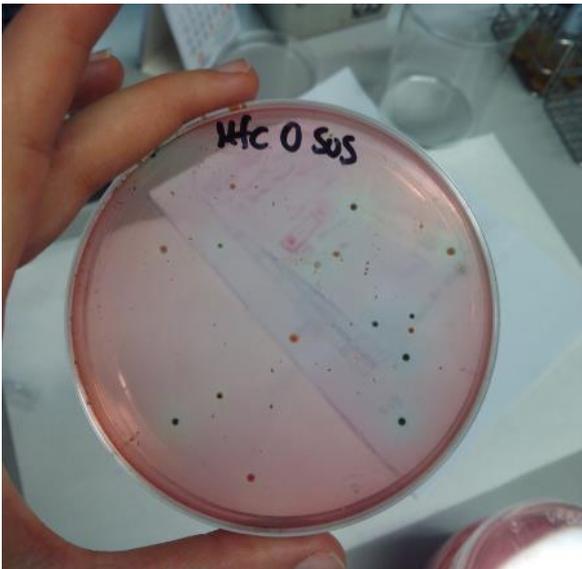


Figura 12. Colonias de coliformes fecales de color azul en el medio m-Fc en la dilución 1/10, para la muestra Sushi

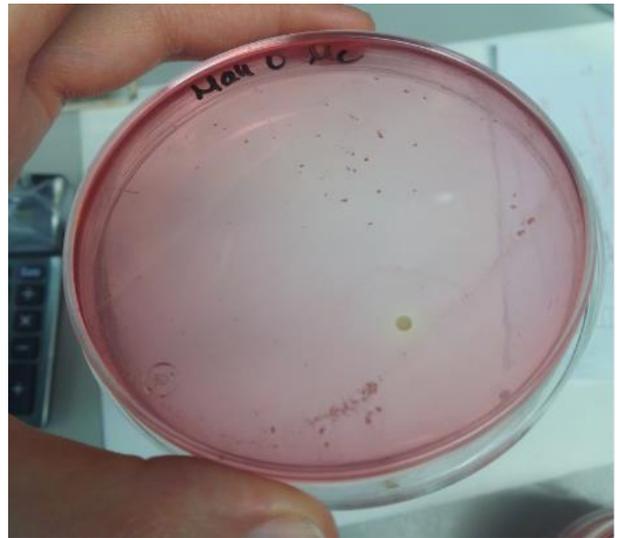


Figura 13. Colonia amarilla envuelta por un halo amarillo. Posible colonia positiva de *Staphylococcus aureus* en el sushi



Figura 14. Tinción de safranina

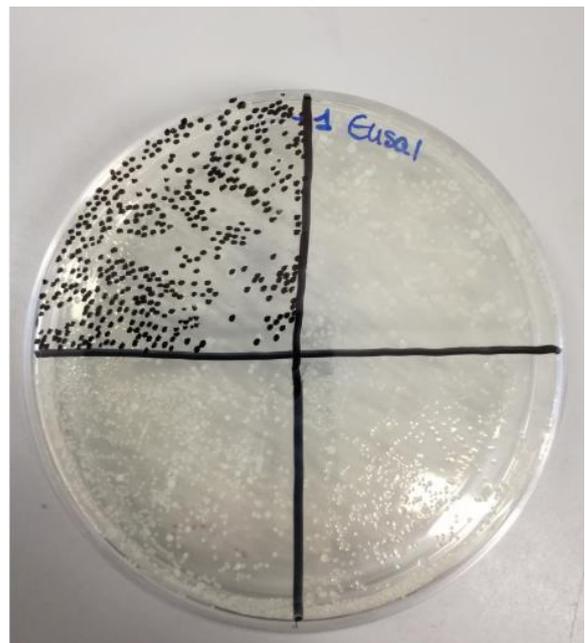


Figura 15. Incontables ufc para mesófilos aerobios totales en la ensalada.

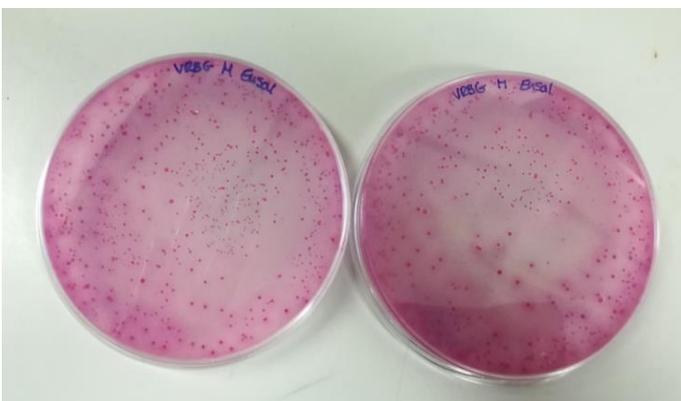


Figura 16. Ufc de enterobacterias para el medio VRBG en la dilución 1/10 para la ensalada

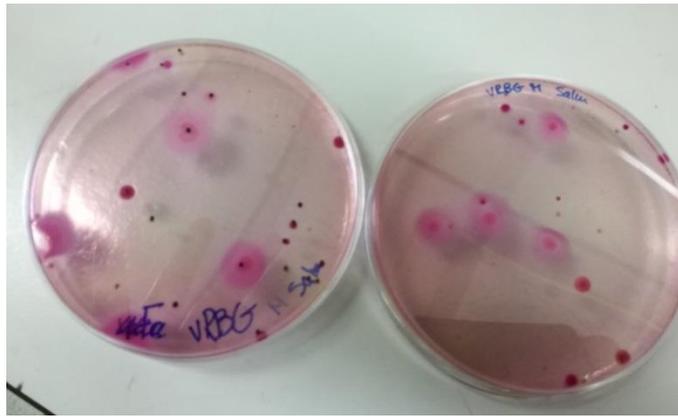


Figura 17. Ufc de enterobacterias para el medio VRBG en la dilución 1/10 del salmón marinado

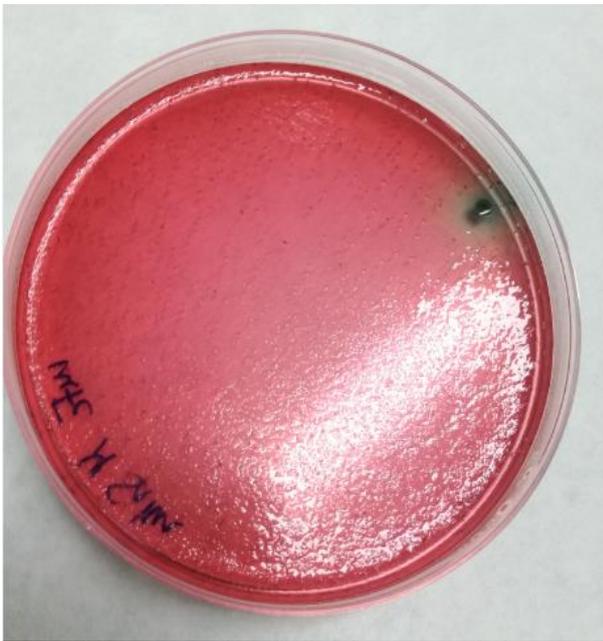


Figura 18. Ufc de coliformes fecales del plato salmón marinado

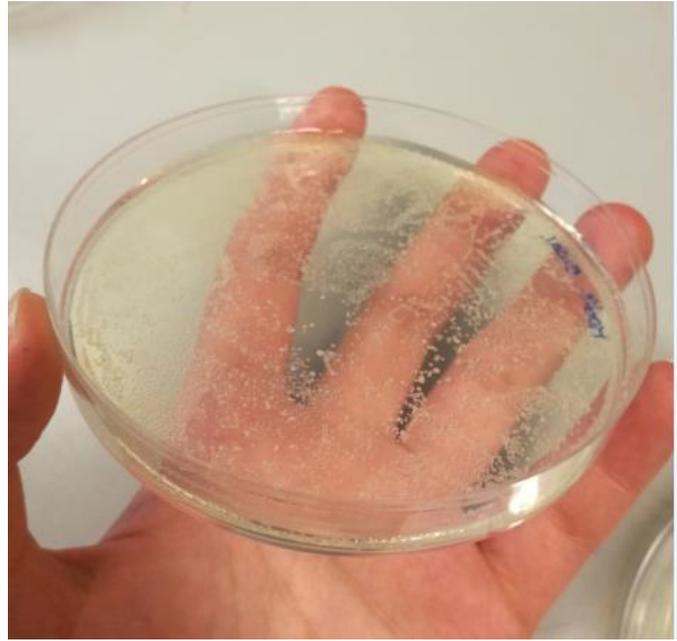


Figura 19. Incontables ufc de mesófilos aerobios totales de rollitos de primavera

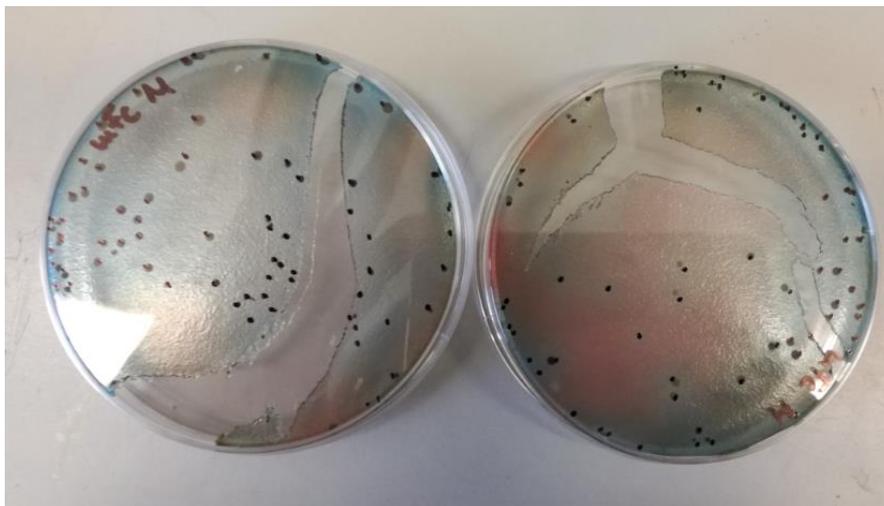


Figura 20. Colonias de coliformes fecales en la dilución 1/10 para la muestra de rollitos de primavera

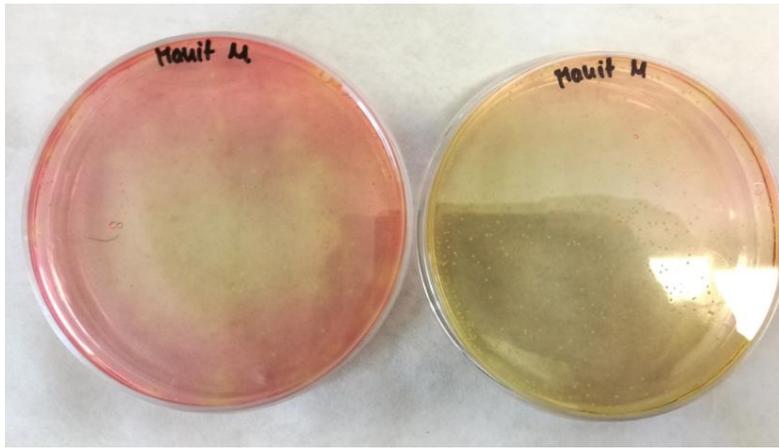


Figura 21. Colonias amarillas rodeadas de un halo amarillento para los rollitos de primavera

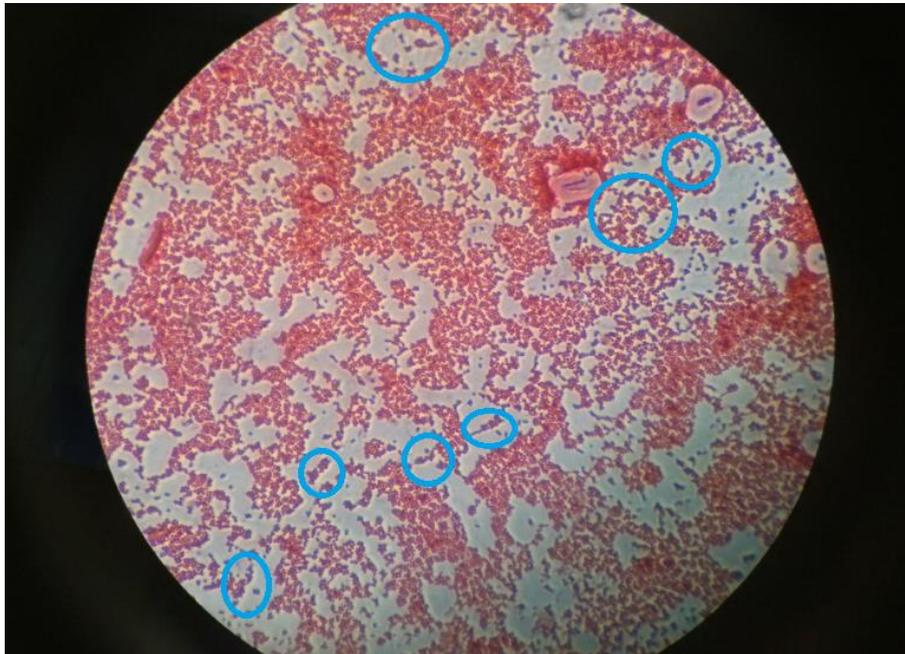


Figura 22. Tinción de safranina. Las células Gram- se tiñen de morado, mientras que las células Gram+ se tiñen de rosa. El *staphylococcus aureus* es una bacteria Gram+, por lo que debemos fijarnos en los agregados en forma de cocos de color morado.

APENDICE 3: legislación aplicable

Grupo A: Comidas preparadas sin tratamiento térmico o con tratamiento térmico que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico (R.D. 3484/2000, B.O.E. 12/01/01)

Aerobios mesófilos (u.f.c./g)*	Aerobios psicrotrofos	Enterobacteriaceas (lactosa positivas) (u.f.c./g)*	Coliformes	<i>E. coli</i> (ufc/g)	<i>Salmonella</i> (en 25 g)	<i>S. aureus</i> (ufc/g)	Estreptococos fecales	Mohos y Levaduras	Otros organismos (u.f.c./g)	Otros límites
n=5, c=2, m=10 ⁵ , M=10 ⁶		n=5, c=2, m=10 ⁵ , M=10 ⁷		n=5, c=2, m=10 ³ , M=10 ⁴	n=5, c=0, Ausencia	n=5, c=2, m=10, M=10 ²			<i>Listeria monocytogenes</i> : n=5, c=2, m=10, M=10 ²	No contendrán ningún otro microorganismo patógeno ni sus toxinas, en una cantidad que afecte a la salud de los consumidores. La toma de muestras se realizará en el producto listo para su comercialización, venta o suministro.
* No se investigarán aerobios mesófilos y enterobacterias en comidas preparadas que lleven como ingredientes productos fermentados o curados.										

Grupo B: Comidas preparadas con tratamiento térmico* (R.D. 3484/2000, B.O.E. 12/01/01)

Aerobios mesófilos (u.f.c./g)	Aerobios psicrotrofos	Enterobacterias (lactosa positivas) (u.f.c./g)	Coliformes	<i>E. coli</i> (ufc/g)	<i>Salmonella</i> (en 25 g)	<i>S. aureus</i> (ufc/g)	Estreptococos fecales	Mohos y Levaduras	Otros organismos (en 25g)	Otros límites
n=5, c=2, m=10 ⁴ , M=10 ⁵		n=5, c=2, m=10, M=10 ²		n=5, c=0, Ausencia	n=5, c=0, Ausencia	n=5, c=1, m=10, M=10 ²			<i>Listeria monocytogenes</i> : n=5, c=0, Ausencia	No contendrán ningún otro microorganismo patógeno ni sus toxinas, en una cantidad que afecte a la salud de los consumidores. La toma de muestras se realizará en el producto listo para su comercialización, venta o suministro.
*La comida preparada con tratamiento térmico es aquella que durante su elaboración ha sido sometida en su conjunto a un proceso térmico para su consumo inmediato o ligero calentamiento.										

Grupo D: Comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos (R.D. 3484/2000, B.O.E. 12/01/01)

	Aerobios mesófilos (u.f.c./g)	Aerobios psicrotrofos	Enterobacterias	Coliformes	<i>E. coli</i> (ufc/g)	<i>Salmonella</i> (en 25 g)	<i>S. aureus</i>	Estreptococos fecales	Mohos y Levaduras	Otros organismos (ufc/g)	Otros limites
Día de fabricación	n=5, c=2, m=10 ⁵ , M=10 ⁶				n=5, c=2, m=10 ³ , M=10 ³	n=5, c=0, Ausencia				<i>Listeria monocytogenes</i> : n=5, c=2, m=10, M=10 ²	No contendrán ningún otro microorganismo patógeno ni sus toxinas, en una cantidad que afecte a la salud de los consumidores. La toma de muestras se realizará en el producto listo para su comercialización, venta o suministro.
Día de caducidad	n=5, c=2, m=10 ⁶ , M=10 ⁷										

Productos de la pesca frescos, salpescados, refrigerados y congelados (O. 2/8/1991, B.O.E 15/8/91; R.D.1437/92, BOE 13/1/93, Decisión 95/149/CE, DOCE L.97 de 29/4/95)

Aerobios mesófilos (u.f.c./g)	Aerobios psicrotrofos	Enterobacterias (ufc/g)	Coliformes	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> (en 25 g)	<i>S. aureus</i>	Estreptococos fecales	Mohos y Levaduras	Otros organismos	Otros limites
10 ⁶		10 ³			Ausencia					Niveles máximos de Histamina: Escombridos y Clupeidos: valor medio inferior a 100ppm tomando 9 muestras y ninguna superior a 200ppm. En productos sometidos a maduración enzimática por salmuera podrán doblar el valor citado. Niveles máximos NBVT: <i>Sebastes sp.</i> y <i>Helicolenus dactylopterus</i> : 25 mg por 100gr. Pleuronectidas excepto fletán: 30mg/100g. <i>Salmo salar</i> , <i>Merluccidae</i> y <i>Gadidae</i> 35mg/100g.