



XIV CONGRESO  
de **microBIOLOGÍA**  
de los **ALIMENTOS**  
Girona, 19-22 septiembre 2004

**PROGRAMA FINAL**  
**LIBRO DE RESÚMENES**





Bienvenida / Comités	Pág. 5
Patrocinadores / Expositores	Pág. 6
Información general	Pág. 7
Programa social / Visitas turísticas	Pág. 8
Cuadro horario	Pág. 9
Programa	Pág. 10
Resúmenes ponentes invitados	Pág. 15
Resúmenes sesiones orales	Pág. 53
Resúmenes pósters	Pág. 63
Mapa de localización	Pág. 119

## SECRETARÍA DEL CONGRESO



AOPC - Microbiología  
Av. Drassanes 6-8, 1º 5ª  
08001 Barcelona  
Tel. 933 027 541 Fax 933 011 255  
congress@aopc.es  
www.irta.es/SEM2004



## BIENVENIDA

Estimado/a colega,

En nombre del Comité Organizador y del "Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries" (IRTA), bienvenidos al XIV Congreso de Microbiología de los Alimentos que, patrocinado por la Sociedad Española de Microbiología se celebrará en Girona del 19 al 22 de septiembre de 2004.

Se han diseñado unas jornadas articuladas en torno a una Conferencia Inaugural, una Conferencia de Clausura y cuatro Mesas Redondas en las que se presentarán comunicaciones y ponencias del máximo interés sobre cuestiones de vanguardia relacionadas con la Microbiología de Alimentos.

Estamos muy contentos de la oportunidad que nos brinda la Sociedad Española de Microbiología para reunirnos unos días en Girona y así conocer los avances científicos en la seguridad microbiológica de los alimentos, de interés tanto para la comunidad científica como para el sector agroalimentario. El marco incomparable de la ciudad de Girona será el telón de fondo para el intercambio personal entre científicos y profesionales del sector que tanto facilitan nuestro trabajo diario.



Marta Hugas  
Presidenta del Comité Organizador

## COMITÉS

### Comité de Honor

Molt Honorable Sr. Pasqual Maragall i Mira  
President de la Generalitat de Catalunya

Il·lustríssima Sra. Anna Pagans i Gruartmoner  
Alcalde de Girona

Honorable Sra. Marina Geli i Fàbrega  
Consellera de Sanitat i Seguretat Social

Honorable Sr. Antoni Siurana i Zaragoza  
Conseller d'Agricultura, Ramaderia i Pesca

Honorable Sr. Carles Solà i Ferrando  
Conseller d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació

Il·lustríssim Sr. Carles Pàramo i Ponsetí  
President de la Diputació de Girona

Excel·lentíssim i Magnífic Sr. Joan Batlle i Grabulosa  
Rector de la Universitat de Girona

Sr. Josep Tarragó i Colominas  
Director General de l'IRTA

### Comité Organizador

Marta Hugas IRTA/EFSA	Presidenta
Margarita Garriga IRTA	Vicepresidenta
Teresa Aymerich IRTA	Tesorera
Jacint Arnau IRTA	Vocal
Yolanda Beltrán IRTA	Vocal
Anna Jofré IRTA	Vocal
Begoña Marcos IRTA	Vocal
Belén Martín IRTA	Vocal
Joana Pardos DT SANIDAD	Vocal
David Tibau IRTA	Vocal

### Comité Científico

Carlos Hardisson (Presidente de la SEM)  
Miguel Ángel Asensio (Universidad de Extremadura)  
Josep M<sup>a</sup> Monfort (IRTA)  
Juan Antonio Ordóñez (Universidad Complutense)  
Josep Vives-Rego (Universidad de Barcelona)  
Manuel Núñez (INIA)  
Begoña Pérez-Villarreal (AZTI)  
Ricard Guerrero (Universidad de Barcelona)  
Maria Pla (Universidad de Girona)

## PATROCINADORES



AGÈNCIA DE SALUT PÚBLICA DE BARCELONA  
APPLIED BIOSYSTEMS  
FRANCISCO SORIA MELGUIZO, S.A.  
HIJOS DE JOSÉ BASSOLS, S.A. (Aigua de Sant Aniol)  
LABORATORIOS AMEREX, S.A.  
AFORA, S.A.

## EXPOSITORES

AES LABORATORIO, S.A.	Stand nº 6
ATOM, S.A.	Stand nº 2
BIO MÉRIEUX INDUSTRY	Stand nº 1
BIOSER, S.A.	Stand nº 7
INSTRUMENTOS TESTO, S.A.	Stand nº 9
LABORATORIOS CONDA, S.A.	Stand nº 4
OXOID S.A.	Stand nº 8
PANREAC QUIMICA, S.A.	Stand nº 11
SCHARLAB, S.L.	Stand nº 10
VITALTECH	Stand nº 5
VWR INTERNATIONAL EUROLAB, S.L.	Stand nº 3

## INFORMACIÓN GENERAL

**Fechas:** Del 19 al 22 de septiembre de 2004

**Sede:** Centre Cultural La Mercè  
Pujada de la Mercè s/n  
17004 Girona

**Secretaría:** Para cualquier información referente al programa, inscripciones, reservas de hotel, actos sociales y exposición comercial, dirigirse a :

AOPC - Microbiología  
Av. Drassanes 6-8, 1º 5º  
08001 Barcelona  
Tel. 933 027 541 Fax 933 011 255  
congress@aopc.es

Durante la celebración del congreso, la Secretaría estará ubicada en la sede, donde se realizará la entrega de documentación a los participantes.

Horario de Secretaría:

Domingo, 19 de septiembre	15:00 a 20:00 h.
Lunes, 20 de septiembre	09:00 a 18:30 h.
Martes, 21 de septiembre	09:00 a 18:30 h.
Miércoles, 22 de septiembre	09:00 a 14:00 h.

**Idioma:** El idioma del congreso será el castellano. Habrá traducción simultánea del inglés al castellano durante las ponencias de los ponentes extranjeros.

**Web:** Para disponer de información actualizada sobre el congreso visite la web: [www.irta.es/SEM2004](http://www.irta.es/SEM2004)

**Exposición:** Durante el desarrollo del congreso se celebrará una exposición comercial, con la presencia de las empresas más importantes en el campo de la microbiología.

### Inscripciones

Miembro de la SEM	400 €
No miembro	450 €
Estudiante*	250 €

IVA vigente incluido.

\*Deberá justificarse mediante certificado o carnet de estudiante.

La cuota de inscripción incluye:

- Acceso a las sesiones, área de pósters y exposición comercial
- Programa final / libro de resúmenes
- Certificado de asistencia
- Recepción de bienvenida
- Cafés: las mañanas de los días 20, 21 y 22 de septiembre
- Almuerzos: los días 20 y 21 de septiembre
- Visita guiada de Girona el día 20 de septiembre
- Visita al IRTA-Centro de Tecnología de la Carne el día 21 de septiembre

**Actividades:** Las siguientes actividades no están incluidas en la cuota de inscripción. Los participantes y/o acompañantes deberán abonar los importes correspondientes a aquellos actos a los que deseen asistir.

- Visita Museo Dalí de Figueres ( 19 de septiembre ) 30 €
- Cena del congreso ( 21 de septiembre ) 65 €

## PROGRAMA SOCIAL

### DOMINGO 19 DE SEPTIEMBRE

20.00 h. Copa de bienvenida en el Centre Cultural la Mercè.  
Incluido en la cuota de inscripción.

### MARTES 21 DE SEPTIEMBRE

21.30 h. - Cena del congreso.  
No incluido en la cuota de inscripción.  
Precio : 65 € por persona.

## VISITAS TURÍSTICAS

Aquellas personas interesadas en realizar las visitas turísticas previstas deberán hacerlo constar en el Formulario de inscripción. La organización se reserva el derecho a cancelar las visitas si no se reúne el número mínimo de participantes.

### DOMINGO 19 DE SEPTIEMBRE

15.30-19.30 h. Visita Museo Dalí de Figueres.  
Punto de encuentro: Puerta principal del Centre Cultural la Mercè a las 15.15 horas.  
El Teatro-Museo Dalí, inaugurado en 1974, fue construido sobre los restos del antiguo teatro de Figueres y contiene el más amplio abanico de obras que describen la trayectoria artística de Salvador Dalí (1904-1989), desde sus primeras experiencias artísticas y sus creaciones dentro del surrealismo hasta las obras de los últimos años de su vida.  
Regreso en autocar al lugar de salida.  
Precio : 30 € por persona.

### LUNES 20 DE SEPTIEMBRE

19.15-21.00 h. Visita guiada a Girona.  
Punto de encuentro: Puerta principal del Centre Cultural la Mercè a las 19.15 horas.  
Realizaremos una visita a pie por el casco antiguo de la ciudad, aproximadamente de una hora de duración, finalizando con un tentempié en el claustro de la Universidad.  
Incluido en la cuota de inscripción.

### MARTES 21 DE SEPTIEMBRE

16.00-20.00 h. Visita al IRTA-Centro de Tecnología de la Carne  
Punto de encuentro: Puerta principal del Centre Cultural la Mercè a las 15.45 horas.  
Regreso en autocar al lugar de salida.  
Incluido en la cuota de inscripción.

Cancelaciones de actos sociales y visitas turísticas :

Los reembolsos solamente se realizarán en el caso de cancelaciones notificadas por escrito a la Secretaría del congreso antes del 1 de agosto de 2004. A partir de esa fecha no habrá reembolso.

## CUADRO HORARIO

	DOMINGO 19 SEP 2004	LUNES 20 SEP 2004	MARTES 21 SEP 2004	MIÉRCOLES 22 SEP 2004
09.30-11.00		Conferencia Inaugural Inauguración oficial	Mesa redonda III	Mesa redonda IV
11.00-11.30		Pausa-café	Pausa-café	Pausa-café
11.30-13.00		Mesa redonda I	Sesión oral II	Sesión oral III
13.00-14.00		Sesión de posters I	Sesión de posters II	Conferencia final, entrega de premios y clausura
14.00-16.00		Almuerzo	Almuerzo	
16.00-17.30	Inscripciones 15.00-20.00	Mesa redonda II	Sesión de posters III	
17.30-19.00	Museo Dalí 15.30-19.30	Sesión oral I	o Visita al IRTA	
	Copa de bienvenida 20.00	Visita Girona 19.15-21.00	Cena 21.30	

## PROGRAMA

### DOMINGO 19 DE SEPTIEMBRE

- 15.00-20.00                   Inscripciones / Horario de la secretaría
- 15.30-19.30                   *Visita Museo Dalí* ( Punto de encuentro : Puerta principal del Centre Cultural la Mercè a las 15.15 h )
- 20.00-21.30                   *Copa de bienvenida en el Centre Cultural la Mercè*

### LUNES 20 DE SEPTIEMBRE

- 09.00-18.30                   Inscripciones / Horario de la secretaría
- 09.30-10.30                   **Conferencia inaugural**  
Introducción: Marta Hugas. IRTA-EFSA

#### **New aspects in microbiological risk assessment**

Servé Notermans TNO. The Netherlands

- 10.30-11.00                   Inauguración  
Ilma. Sra. Anna Pagans, Alcaldesa de Girona
- 11.00-11.30                   *Pausa-café*
- 11.30-13.00                   **Mesa redonda I**  
**Alimentos fermentados tradicionales**  
Moderador: Manuel Núñez. INIA

#### **Traditionally fermented meat products: new microbiological aspects**

Régine Talon. INRA Centre Clermont-Theix. France

#### **Quesos artesanales: desde la fermentación espontánea a los fermentos autóctonos**

Ana Rodríguez. CSIC Instituto de Productos Lácteos de Asturias

#### **Aceitunas verdes estilo español o sevillano: de la fermentación tradicional a la utilización de cultivos iniciadores**

Rufino Jiménez-Díaz. CSIC Instituto de la Grasa

- 13.00-14.00                   **Sesión de posters I**
- 14.00-16.00                   *Almuerzo*
- 16.00-17.30                   **Mesa redonda II**  
**Nuevas tecnologías de conservación de los alimentos**  
Moderador: Josep M<sup>a</sup> Monfort. IRTA

#### **Aplicaciones industriales de las altas presiones en los alimentos: aspectos microbiológicos**

Narcís Grèbol. IRTA Centro de Tecnología de la Carne

#### **Microbiología del procesado mínimo de frutas y derivados por pulsos eléctricos de alta intensidad de campo y métodos combinados**

Olga Martín. Universidad de Lleida

#### **Bacterial responses to stress: pressure, pH and salt**

Colin Hill. University College Cork. Ireland

17.30-19.00

**Sesión oral I**

Moderador: Juan Antonio Ordóñez. Universidad Complutense

**1. Bacterias lácticas iniciadoras de la fermentación maloláctica en vinos y producción de aminas biógenas**

Fernanda Ruiz-Larrea<sup>1</sup>, Isabel López<sup>1</sup>, Victoria Moreno-Arribas<sup>2</sup>, Carmen Polo<sup>2</sup>, María L. Vaderrama<sup>1</sup>, Beatriz Rojo<sup>1</sup>, Carmen Tenorio<sup>1</sup>, Myriam Zarazaga<sup>1</sup>, Carmen Torres<sup>1</sup>

1-Departamento de Agricultura y Alimentación, Univ. de La Rioja, Logroño

2-Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid

**2. Generación de compuestos volátiles por *Debaryomyces hansenii* y *Penicillium chrysogenum* en diferentes medios de cultivo y en carne madurada**

Mercedes Alonso, Miguel A. Asensio, Elena Bermúdez, María J. Sosa, Félix Núñez

Higiene de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Univ. de Extremadura, Cáceres

**3. Valoración del uso de cultivos iniciadores y alta presión hidrostática como obstáculos combinados para mejorar la seguridad de embutidos poco ácidos**

Begonya Marcos<sup>1</sup>, Teresa Aymerich<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>, Margarita Garriga<sup>1</sup>

1-Microbiología y Biotecnología Alimentaria, IRTA-Centro de Tecnología de la Carne, Monells

2-EFSA, Bruselas, Bélgica

**4. Influencia de las condiciones de conservación sobre la microbiota de jamón cocido loncheado sometido a altas presiones**

Claudia Ruiz-Capillas, Virginia Díaz Barcos, José Carballo, Francisco Jiménez Colmenero

Instituto del Frío, CSIC, Madrid

**5. Inactivación de *S. senftenberg* en huevos íntegros mediante la acción combinada de ultrasonidos y calor**

María Concepción Cabeza, María Luisa García, Lorenzo de la Hoz, Isabel Cambero, Juan Antonio Ordóñez

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Univ. Complutense, Madrid

19.15-21.00

Visita guiada a Girona ( Punto de encuentro : Puerta principal del Centre Cultural la Mercè a las 19.15 h )

**MARTES 21 DE SEPTIEMBRE**

09.30-11.00

**Mesa redonda III**

**Herramientas moleculares de aplicación en microbiología de alimentos**

Moderadora: Rosa Aznar. Universidad de Valencia

**La PCR ¿Complemento o alternativa a las técnicas clásicas de microbiología?**

Teresa Aymerich. IRTA Centro de Tecnología de la Carne

**Aplicación de métodos basados en las técnicas de PCR y NASBA a tiempo real en distintas matrices alimentarias**

David Rodríguez-Lázaro. INTEA. Universidad de Girona

**Técnicas de ácidos nucleicos para la detección y selección de mohos y levaduras de interés en alimentos**

Juan José Córdoba. Universidad de Extremadura

11.00-11.30

*Pausa-café*

11.30-13.00

**Sesión oral II**

Moderadora: María Pla. Universidad de Girona

**6. PCR a tiempo real-SYBR Green I para detección de *Bacillus cereus* toxigénicos**

Juan Fco. Martínez-Blanch<sup>1,4</sup>, Beatriz Pinto<sup>4</sup>, M<sup>a</sup> José Ocio<sup>2,4</sup>, Esperanza Garay<sup>1,3</sup>, Rosa Aznar<sup>3,4</sup>

1-Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Univ. de Valencia, Edif. de Investigación Jeroni Muñoz, Campus de Burjassot, Valencia

2-Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Universidad de Valencia

3-Departamento de Microbiología y Ecología, Univ. de Valencia

4-Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC, Valencia

**7. Epidemiología molecular de un tipo emergente de *Salmonella* serotipo *typhimurium* que porta un plásmido híbrido de virulencia–resistencia a antimicrobianos (pUO-stVR2)**

Ana Herrero<sup>1</sup>, María Rosario Rodicio<sup>1</sup>, Noelia Martínez<sup>1</sup>, Irene Rodríguez<sup>1</sup>, María Cruz Martín<sup>1</sup>, María Ángeles González-Hevia<sup>2</sup>, María Carmen Mendoza<sup>1</sup>

1-Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Univ. de Oviedo

2-Laboratorio de Salud Pública, Principado de Asturias, Oviedo

**8. Detección de rotavirus en aguas mediante RT-PCR a tiempo real vs RT-PCR convencional**

Alejandro Rodrigo<sup>1</sup>, José Luís Monzó<sup>1</sup>, Javier Buesa<sup>2</sup>, David Tomás<sup>1</sup>

1-Laboratorio de Bioensayos, AINIA, Paterna, Valencia

2-Dpt. Microbiología. Fac. Medicina y Hospital Clínico Universitario, Univ. de Valencia

**9. Análisis transcripcional de los genes implicados en la síntesis de tiramina en *Lactococcus lactis* IPLA 655**

Daniel M. Linares, María Fernández, Miguel A. Álvarez

Instituto de Productos Lácteos de Asturias

**10. Análisis molecular por PCR-DGGE del contenido fecal de individuos sanos con dietas suplementadas con yogures tradicionales y yogures tradicionales pasteurizados**

Raimundo García-Albiach<sup>1</sup>, Rosa Del Campo<sup>2</sup>, Daniel Bravo<sup>2</sup>, Alejandra Montesi-Libois<sup>1</sup>, María José Pozuelo<sup>1</sup>, Fernando Baquero<sup>2</sup>

1-Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Univ. San Pablo CEU, Madrid

2-Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

13.00-13.45 **Sesión de posters II**

13.45-14.30 **Asamblea de socios de la SEM**

14.30-16.00 *Almuerzo*

16.00 **Sesión de posters III**

o

*Visita al IRTA Centro de Tecnología de la Carne en Monells*

21.30 *Cena del congreso*

**MIÉRCOLES 22 DE SEPTIEMBRE**

09.30-11.00 **Mesa redonda IV**

**Riesgos microbiológicos bióticos y abióticos**

Moderadora: Margarita Garriga. IRTA

**La seguridad vírica de los alimentos**

Albert Bosch. Universidad de Barcelona

**Marco legal para garantizar la calidad sanitaria de los moluscos destinados a consumo humano**

Dolors Furones. IRTA Centro de Acuicultura

**Aminas biógenas en cárnicos fermentados: de un problema de seguridad a una cuestión de confianza**

Sara Bover-Cid. Universidad de Barcelona

11.00-11.30 *Pausa-café*

11.30-13.00 **Sesión oral III**

Moderador: Jacint Arnau. IRTA

**11. Comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 durante el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L, variedad romana) en suelo fertilizado con estiércol de bovino**

Ma. Refugio Torres, Elisa Cabrera, Rosa del Carmen Olivares, Raúl Montaña, Edgar Vinicio Villalpando

Univ. de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Laboratorio de Microbiología Sanitaria, México

**12. Valoración cuantitativa del riesgo del riesgo de listeriosis en Navarra**

V. Garrido, A. I. Vitas, B. Sesma, M. L. Verbo, E. Alonso, I. García-Jalón

Departamento Interfacultativo de Microbiología y Parasitología, Univ. de Navarra, Pamplona

**13. Efecto de la evisceración en la acumulación de aminas biógenas durante el almacenamiento en hielo de merluza del Mediterráneo (*Merluccius merluccius*)**

Sonia Baixas-Nogueras, Tommaso Lavizzari, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou

Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmacia, Univ. de Barcelona

**14. Efecto de ácidos orgánicos, grasa de leche hidrolizada y emulsionantes de uso alimentario en la supervivencia de biofilms de *Pseudomonas***

Belén Orgaz, Juliana Kives, Carmen San José

Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos, UCM, Madrid

**15. Selección de *Penicillium* spp. productores de péptidos antifúngicos de interés en productos cárnicos madurados y obtención de fracciones activas**

Raquel Acosta<sup>1</sup>, Laureano Frizzo<sup>2</sup>, Elena Bermúdez<sup>1</sup>, Félix Núñez<sup>1</sup>, Miguel Angel Asensio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Higiene de los Alimentos, Univ. de Extremadura, Cáceres

<sup>2</sup>-Univ. Nacional del Litoral, Argentina

13.00-14.00

Conferencia final

**The new European Structure for Risk Assessment: Biological Hazards Area**

Bart Goossens. European Food Safety Authority (EFSA)

14.00-14.30

Entrega del premio al mejor poster

Entrega del premio del concurso de fotografía "Federico Uruburu"

Clausura



## RESÚMENES PONENTES INVITADOS

Conferencia inaugural	Pág. 17
Mesa redonda I	Pág. 21
Mesa redonda II	Pág. 29
Mesa redonda III	Pág. 36
Mesa redonda IV	Pág. 44
Conferencia final	Pág. 51



## New aspects in microbiological risk assessment

Servé Notermans and Erik Hooijstra  
TNO Nutrition and Food Research, AJ Zeist, The Netherlands

### Summary

Microbiological risk assessment is part of risk analysis and aims to assess the risk of adverse health effects after eating a portion of food that might be contaminated with a pathogenic organism. The use of risk assessment also allows deriving process performance criteria from end product criteria or Food Safety Objectives (FSO). In addition, to the use of probability distribution functions is useful to verify whether the process performance is within the critical limits of the HACCP-system.

### Introduction

The production of safe food is being increasingly based on the use of risk analysis. Risk analysis comprises three main components: (i) risk assessment, (ii) risk management and (iii) risk communication. Risk assessment is the scientific process in which the hazards and risk factors are identified, and the risk estimate is determined. Risk assessment is in many countries mandatory in the process of developing food safety legislation. It is also being used more frequently by food companies during process optimization and hygiene improvements and in setting critical limits at the critical control points in the HACCP-plan.

New aspects in microbiological risk assessment are among others:

- 1) The introduction of the so called Food Safety Objectives (FSO), which are currently being developed by the Committee on Food Hygiene of the Codex Alimentarius Commission;
- 2) Assessing the process performance of food production processes.

Both aspects will be discussed in detail. First, a short introduction in risk assessment is presented using a practical example.

### An example of risk assessment

The example is about a food company which produces a pasteurized meat product. The company target is to achieve a 5 log<sub>10</sub> reduction of the numbers of *Escherichia coli* O157:H7. To achieve this target a pasteurization treatment (temperature/time combination) is used of 20 seconds at 70 °C. The company wants to know whether a 5 log<sub>10</sub> reduction is really achieved under expected variation and in addition the company wants to know the probability that a sample of 25 gram is positive for *E. coli* O157:H7.

**5 log<sub>10</sub> reduction.** To start the risk assessment the numbers of *E. coli* O157:H7 needs to be assessed as well as the variation in numbers present (transferred into probability distributions). It is known that the occurrence of the pathogen is very variable. Examinations reveal that ~ 1% of 25 g samples are positive for *E. coli* O157:H7. Positive samples contain in average 10 cfu (1 log<sub>10</sub>) *E. coli* O157:H7/g with a minimum of 1 cfu (0 log<sub>10</sub>) /g and a maximum of 10.000 cfu (4 log<sub>10</sub>) /g. From literature data (Doyle and Schoeni, 1984; Juneja *et al.*, 1997) the heat inactivation characteristics are assessed. This is indicated as the D<sub>70</sub>-value that is the time necessary to reduce the number of bacteria present by 1 log<sub>10</sub> unit at a temperature of 70°C. The average D-value at 70°C is 4 s. Due to experimental and strain variations the minimal D<sub>70</sub>-value is 1 s and maximal 12 s. The pasteurization time/temperature the company should use to obtain a 5 log<sub>10</sub> reduction is equivalent to 20 s at 70°C. In practice, there is a variation in time of the pasteurization treatment that results in a variation in effective pasteurization value. The pasteurization value is minimally 18 s and maximal 24 s with a mode value of 20 s.

The probability distribution functions are presented in figure 1 and concerns the number of bacteria present, the variation in heating time and the variations in D-values. The first two probability distributions are based on measurements. The probability distribution for D<sub>70</sub>-values is a so called triangle distribution and is only based on the minimal D<sub>70</sub>-value (1s), the average D<sub>70</sub>-value (4s) and the maximum D<sub>70</sub>-value (12s).

Based on these distributions the number of *E. coli* O157:H7 after heat treatment can be assessed based on the general formula:

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 - (P / D_{70}\text{-value})$$

With:

N is the number of *E. coli* O157:H7 present after heat treatment

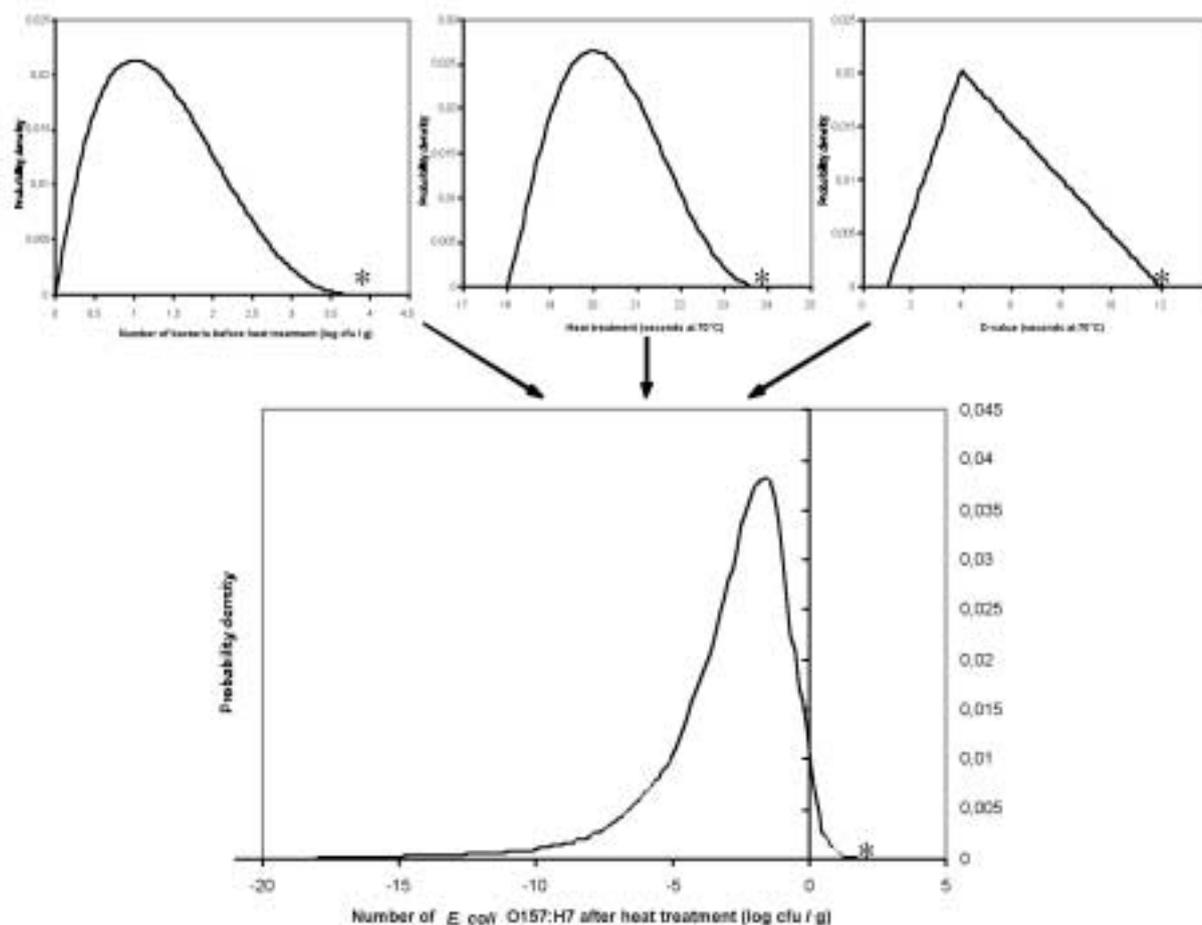
P is the pasteurization time (at reference temperature of 70°C) in seconds

D<sub>70</sub>-value the time in seconds for obtaining a decimal reduction

For calculating with probability distribution functions, a statistical software program is necessary (e.g. @Risk). Such a program uses Monte Carlo (totally random) sampling to be able to calculate with the total probability distribution function. In this example the initial contamination N<sub>0</sub>, time of heat treatment (P) and D<sub>70</sub>-value are cumulated into an estimate of the numbers of *E. coli* O157:H7

present after heat treatment. The outcome is presented in figure 1 as well. It is clear that an average 5 log<sub>10</sub> reduction of *E. coli* O157:H7 still results in a certain fraction of the meat positive for *E. coli* O157:H7.

Figure 1. Monte Carlo sampling; cumulating three risk factors (initial number of *E. coli* O157:H7; heat treatment (P-value) and D-value) to estimate the number of *E. coli* O157:H7 present in the end product.



A further step in the risk assessment is to calculate the probability that a person becomes ill after consumption of a certain portion of the heat processed meat. For that calculation the probability distribution function of the number of *E. coli* O157:H7 in the end product is one factor and the dose-response relationship of *E. coli* O157:H7 is the other. The dose-response relationship is the relation between the numbers of *E. coli* O157:H7 ingested and the probability to become diseased. This calculation is carried out in an identical way as described for the heat treatment of the meat product.

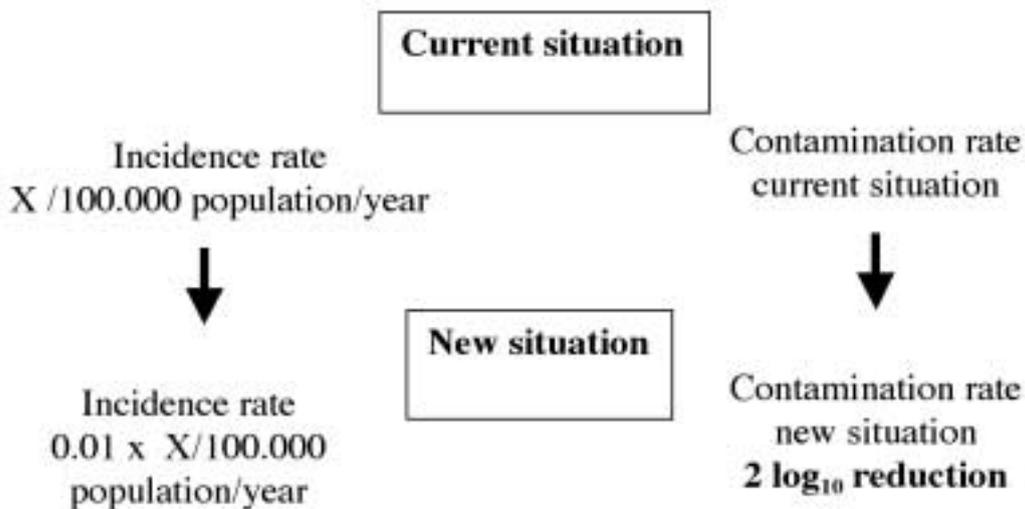
### The use of Food Safety Objectives (FSO)

An FSO is defined as the maximum frequency and/or concentration of a (microbiological) hazard in a food at the point of consumption that provides or contributes to an appropriate level of protection (CAC, 2004). An FSO needs to be established by regulatory authorities on the basis of (microbiological) risk analysis. FSO's need to be translated into process performance criteria for those food products for which an end product criterion does not make sense. For example the criterion for absence of *Clostridium botulinum* in canned foods can not be tested for. Another example concerns the absence of pathogenic organisms (e.g. *Salmonella*) on fresh produce like cut salads. This type of products is eaten raw and is at best minimally processed by a washing step.

To meet the FSO for absence of *C. botulinum* in canned foods it is necessary to derive process performance criteria. This is currently achieved by using a heating process that inactivates the most heat resistant spores of *C. botulinum* by a factor 10<sup>12</sup> (or 12D). This process, which is called 'botulinum cook' is actually a worst-case scenario approach.

An appropriate objective for fresh produce might be a reduction of foodborne diseases caused by these products by a factor 100. This objective needs to be translated in a quantitative reduction of pathogens currently present on fresh produce by using risk assessment procedures. In figure 2 the principles of the calculations are presented.

Figure 2. How to meet a Food Safety Objective to decrease the frequency of foodborne diseases caused by fresh cut vegetables. Even if the incidence rate of foodborne diseases caused by vegetables is unknown it is possible to assess the necessary reduction of pathogens using risk assessment tools.

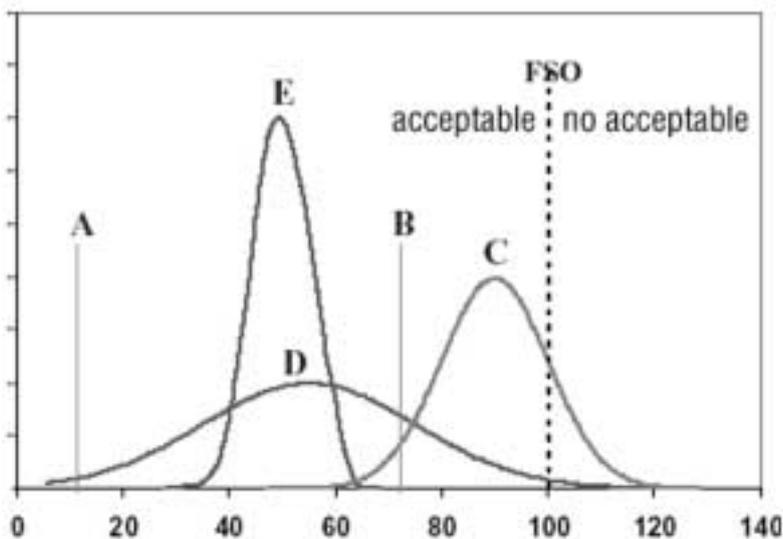


If we assume that the disease incidence rate related to consumption of fresh produce are  $X$  persons per 100.000 population per year. This needs to be reduced by a factor 100 to meet the target. That means that in the new situation the incidence rate is  $0.001 X$  per 100.000 population per year. Some information about the contamination rate of currently consumed fresh vegetables is available in literature. From this it can be concluded that if pathogens are present, the numbers are low. The dose-response relation for low numbers of pathogens ingested is often assumed to be linear. Therefore, the necessary reduction on fresh produce is also a factor 100.

#### Assessing of the process performance

In the new Food Hygiene regulation of the EU which will come into force first of January 2006, a more clear verification of the effect of the HACCP is necessary. In principle, an assessment of the process performance would be the best way for verification. An example is presented in figure 3. The method of risk assessment, including probability distribution functions, is considered to be a useful tool for this.

Figure 3. HACCP-verification. The FSO is set as criterion to meet that separates between 'acceptable' and 'not acceptable'



Values at the left side of the FSO are considered to be acceptable and values at the right are considered not to be acceptable. A and B are so called single points estimates that result from a certain process performance. In this example it can be seen that these scenarios both meet the criterion. However, single point estimates do not provide information about the probability of exceeding the FSO. The curves C, D and E are so called probability distribution curves that are built on three process performances. It can now be seen that the FSO in some cases is exceeded. The process performance expressed in curve C and D is not acceptable since a substantial proportion of the product is beyond the FSO. Scenario D shows that the average is far within the target but due to large variation a part of the process will result in exceeding the FSO. Curve E is an example of an acceptable curve: The product meets the FSO set and the relative small standard deviation of the curve indicated that the process is under control.

#### References

CAC (2004) Report of the 36th session of the Codex Committee on Food Hygiene, Washington D.C., USA, 29 March – 03 April 2004.

Doyle, M. P. and Schoeni, J. L., 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl. Environm. Microbiol. 48, 845-856

Juneja, V. K., Snyder, O.P. and Marmer, B.S. 1997. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. Int. J. Food Microbiol. 35, 231 -237

## Traditionally fermented meat products : new microbiological aspects

Talon<sup>1</sup> R., Giammarinaro<sup>1</sup> G., Leroy<sup>1</sup> S., Corbière Morot-Bizot<sup>1</sup> S., Bover-Cid<sup>2</sup> S., Vidal-Carou<sup>2</sup> C.

<sup>1</sup>-INRA, Centre Clermont-Theix, Equipe Microbiologie, Unité Recherches sur la Viande, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

<sup>2</sup>-University of Barcelona, Department of Nutrition and Food Sciences, Avinguda Joan XXIII s/n Barcelona, Spain.

### Introduction

In the meat sector, different crisis, but also the recurring food poisoning cases, have undermined public confidence on intensive or industrial meat producing systems. Consumers are, therefore, turning to "traditional" products and the growth of the market of organic foods and farm products is a clear sign of that. Traditional fermented dry sausages account for a significant part in such a domain.

Traditional dry sausages rely on natural contamination by environmental flora. This contamination occurs during slaughtering and increases during manufacturing. Each workshop has a specific house flora, composed of useful microorganisms for the fermentation and flavour of sausages, but also spoilage and pathogenic flora. Few sporadic studies have been conducted on traditional meat products and have shown that hygienic shortcomings can lead up to 25% of product loss with high economic consequences and may undermine consumer confidence for traditional products.

Few studies are available on the contamination during production, from raw materials to final products. The characterisation of typical house flora, therefore, is crucial because safety (pathogenic flora), acceptability (spoilage flora) and sensorial quality (technological flora) of the products depend totally on it. In this context, the objective of the European project Tradisausage (QLK1-CT-2002-02240) was to evaluate and improve safety of traditional dry sausages from the producers to the consumers while preserving their typical quality. To reach this objective we characterize the flora on the environment of traditional workshops and on the corresponding sausages. The study has been carried out in five Mediterranean and one East countries. Here, we reported only results from traditional French workshops.

### Methodology

#### Samples

The house flora and the flora contaminating the sausages were studied in 10 traditional workshops manufacturing dry fermented sausages. These 10 workshops were selected as representative of the 108 workshops studied for their typicality. Six environmental samples were collected per workshops: three for the machines: mincing (Mc), mixing (Mx), stuffing (St); one for the cutting table (T), one from the wall of cold room of storage (Cr) and one from deboning knife (K). Four meat samples per workshop were collected: casings (Ca), stuffed batter (Z), after fermentation (M) and finish product (F).

#### Analysis of flora

The flora was numerated on selective media: *Enterobacteriaceae* on VRBG, incubated at 37°C for 24 h; *Pseudomonas* spp. on CFC at 25°C for 48 h; lactic acid bacteria on MRS at 30°C for 48-72 h under anaerobic conditions; coagulase negative *Staphylococcus* and *Kocuria* on MSA at 30°C, 48 h; *Enterococcus* on M-*Enterococcus* selective agar at 37°C for 48 h; Yeasts and Moulds on YGC, at 25°C for 3 to 5 days.

*S. aureus* and coagulase positive staphylococci were numerated on Baird Parker agar supplemented with tellurite egg yolk, incubated at 37°C for 24 h to 48 h. *L. monocytogenes* was numerated on ALOA incubated at 37°C for 24 to 48 h.

For *Salmonella*, and STEC, PCR analysis were made either on colonies isolated from agar plates or from enriched suspension.

#### Identification of Gram positive cocci

A collection has been constituted from two selected workshops among the ten. The isolates of staphylococci were identified by two methods : a multiplex PCR and a reverse line blot hybridisation developed in our laboratory.

For multiplex PCR, one colony was used as template. The multiplex PCR allowed the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species : *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. xylosus* (Corbière Morot-Bizot et al. submitted in J. Appl. Microbiol.).

The other tool, called "Staph. Array", is based on reverse line blot hybridisation techniques. We designed oligonucleotide probes from the partial sequences of the *SodA* genes of 33 staphylococci species done by Poyart C. et al. (2001, J. Clin. Mic. 39: 4296). These probes were fixed covalently on membranes. Colonies or lysates from isolated colonies were used as templates for a PCR using *SodA* primers. The PCR products were hybridised with the immobilised probes.

#### Biogenic amines

Biogenic amines (tyramine, histamine, putrescine and cadaverine) were analysed on the meat samples, by ion-pair reverse phase high performance liquid chromatography. Briefly, the method involved the extraction of biogenic amines with 0.6N perchloric acid from a homogenised aliquot (5-10 g). Then a chromatographic gradient allowed the separation of ion-pairs formed between biogenic amines and the octanesulphonic acid of the mobile phase. A post-column derivatization of separated amines with o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol was followed by spectrofluorometric detection.

## Results and discussion

### Statement of the flora in meat and environmental samples

The products (40 samples) were not contaminated by *Salmonella*. 12.5% of the samples were contaminated by *L. monocytogenes* but only 2.5% of the final products had a level slightly superior to 2 log/g. 5% of the samples were contaminated by *S. aureus* with 2.5% of final product having a level superior to 2.7 log/g. The spoilage flora, *Pseudomonas* and *Enterobacteria*, was detected in most of the products. In the final products their level varied greatly from very low to high level with an average of 3 to 4 log/g for both flora. The technological flora, lactic acid bacteria and staphylococci, was present in all products. As a general rule, their population increased during the process and reached in the final products levels varying from 7 to 8 log/g.

For the environment, a total of 60 samples has been studied. *Salmonella* and *S. aureus* were not detected in all the samples. *L. monocytogenes* was found in 3% of samples. The technological and spoilage flora colonised the environment of the workshops and their level varied greatly.

Enterococci colonised the environment of all the workshops and were numerated in all meat samples. In sausages, their level varied from 3 to 7 log /g.

To our knowledge, no data concerned the environmental flora of traditional workshops manufacturing sausages. But many studies concerned traditional meat fermented products. In naturally fermented Italian sausages, the technological flora grew during the process and reached similar values we mentioned above. In these products *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus* could reach high level during fermentation and decreased during ripening. *Salmonella* and *S. aureus* were not found (Cocolin *et al.* 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5113). In Greek salami, *L. monocytogenes* was detected in the batter but not in the final products (Samelis *et al.* 1998. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 69).

### Identification of enterococci

A total of 45 strains were identified from all the samples. It appears that 44 strains were identified as *E. faecium* and 1 as *E. faecalis* (Laukova A., 2004 personal communication).

Enterococci form part of the lactic acid bacteria of importance in foods. They seem to be important for ripening and aroma development of traditional sausages. Many enterococci have the ability to produce enterocins harbouring antimicrobial activity against pathogens such as *L. monocytogenes* (Hugas *et al.* 2003. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 223). But in other hand, they are important nosocomial pathogens and some strains are resistant to many antibiotics. Some strains also produced biogenic amines. It appears that *E. faecium*, the dominant species of our study, harbours fewer virulence traits than *E. faecalis* (Franz *et al.* 2003. *Int. J. Food Microbiol.* 88 : 105).

### Identification of staphylococci

The screening of a collection of 334 strains by multiplex PCR showed that 300 strains belonged to the genus *Staphylococcus* and 34 could belong to the genus *Kocuria*. Among the 300 strains of *Staphylococcus*, 43 were identified as *S. xylosus*, 25 as *S. saprophyticus*, 2 as *S. epidermidis* and 230 were not identified to the 4 species that can be identified by this PCR.

This is why we developed the other method "Staph. Array". We first design specific oligonucleotidic probes for 34 species of staphylococci. We check that all probes hybridised with their target but a few hybridised also with the partial *SodA* gene from close species. Even with these cross-hybridisations we were able to identify the 34 species since we obtained a unique pattern for each species. We have tested this tool on a set of 67 *Staphylococcus* spp strains and 65 strains were identified to *S. equorum* and 2 to *S. succinus*.

Staphylococci are isolated from a wide range of foodstuff such as meat, cheese or milk and from environmental sources such as soil, sand, dust, air or natural water. In fermented meat products, *S. xylosus* and *S. saprophyticus* are frequently isolated (Blaiotta *et al.* 2003. *System. Appl. Microbiol.* 26: 423) but *S. equorum* we found as dominant species is not listed as dominant in other fermented meat products.

### Biogenic amines

The biogenic amine levels of initial meat samples were very low or not detected in all workshops, except one. Tyramine was the only amine found in all the samples and with the lowest variability. Cadaverine showed much more variability, from not detected to 278 mg/kg. Putrescine was the third amine showing a similar profile than that of cadaverine but with lower levels. Histamine was the biogenic amine that appeared less frequently, its occurrence being accompanied by high amounts of tyramine and diamines.

Taking into account the biogenic amine contents of the final products, three groups of sausages could be made: those with extremely low contents (2 workshops), those with moderate amounts of amines (below 200 mg/kg) and mainly showing tyramine (5 workshops), and finally those sausages showing high contents of amines (higher than 200 mg/kg) in which cadaverine was the major amine (3 workshops). These groups were in concordance with the hygienic conditions of the workshops, but especially with the counts of spoilage microorganisms in the samples. As a general rule, *Enterobacteria* were not detected in samples showing the lowest cadaverine contents; on the contrary the highest accumulation of cadaverine was associated with the highest counts of *Enterobacteria*.

Biogenic amines are produced from amino acids by microbial decarboxylation. Some biogenic amines can be hazardous for health due to their vasoactive and/or psychoactive properties (Bover-Cid *et al.* 1999. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 95). Biogenic amines have repetitively been shown to be present in meat products (Montel *et al.* 1999. *Sci. Aliments.* 19: 247). Spoilage flora

such as *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* frequently isolated from raw materials but also from sausages, can produce biogenic amines, especially during the first days of fermentation. The hygienic quality of raw materials appears to be one of the main factors affecting biogenic amine formation in dry fermented sausages (Bover-Cid *et al.* 2001. *J. Food Protect.* 64: 367). Some strains of lactic acid bacteria, staphylococci and *Kocuria* are also able to produce amines.

### **Conclusion**

The traditional workshops and the sausages did not present sanitary risk as no pathogens or sporadic pathogens were found. The contamination by spoilage flora was sometimes high and could generate flavour defaults in sausages and thus be responsible of economic losses. This spoilage flora could also synthesise biogenic amines which can be hazardous for health. The presence of technological flora both in the environment and in products could constitute a barrier flora.

### **Acknowledgement**

This work was financially supported by EU program QLKI-CT2002-02240.

## Quesos Artesanales: desde la fermentación espontánea a los fermentos autóctonos

Ana Rodríguez González

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CSIC, Villaviciosa, Asturias, España

El queso forma parte de la dieta del hombre desde hace más de 8.000 años. Se cree que su producción se inició en la antigua Mesopotamia (en el valle situado entre los ríos Tigris y Eufrates) inmediatamente después de la domesticación de animales productores de leche. La transformación de leche en queso probablemente ocurrió de forma accidental, favorecida por el clima cálido de la zona. El crecimiento de la microbiota láctica, contaminante natural de la leche, con la consecuente producción de ácido, habría provocado la coagulación (Fox, 1993). Estos quesos ácidos primitivos siguen elaborándose en Oriente Medio sin apenas innovaciones tecnológicas, mientras que numerosas variedades de coagulación ácida (Cottage, Quarg, Formais Frais, Queso Blanco, etc.), con procesos de elaboración altamente mecanizados, son muy populares en Occidente. Paralelamente, la coagulación enzimática de la leche surgió a partir de la utilización de bolsas fabricadas con el estómago de animales para almacenar la leche, las cuales aportarían enzimas coagulantes. Las cuajadas así formadas, estarían contaminadas con bacterias y sufrirían un proceso de maduración durante el almacenamiento, lo que provocaría un cambio en el aroma, sabor y textura de las mismas, transformándose en un producto mucho más apreciado desde el punto de vista sensorial.

Las ventajas derivadas del descubrimiento accidental de la capacidad de transformar la leche en queso son evidentes: estabilidad durante el almacenamiento, facilidad de transporte y diversificación de la dieta. Por ello, la elaboración de queso se extendió rápidamente desde Oriente Medio hacia otras áreas geográficas (Egipto, Grecia y Roma). La expansión del Imperio Romano introdujo el queso en todo el mundo conocido entonces, y tras su caída del imperio, las grandes migraciones provocadas por el hambre, los conflictos y las invasiones, llevaron el queso a toda Europa (Fox et al., 2000).

Posteriormente, desde la Edad Media hasta finales del siglo XVIII, los monasterios y los estados feudales contribuyeron de manera fundamental al desarrollo de la tecnología quesera y a la evolución de las distintas variedades de queso. La elaboración de queso se convirtió en un "arte" que se transmitía de generación en generación, al que se iban incorporando modificaciones tecnológicas a medida que se observaba que alteraciones no intencionadas ocurridas durante la elaboración, proporcionaban cambios deseables en las características del queso (Fox et al. 2000).

Los avances en los conocimientos sobre la química y microbiología de la leche y del queso permitieron controlar mejor el proceso de elaboración de queso y estandarizar su producción en la segunda mitad del siglo XIX, creándose entonces las primeras fábricas de queso en Estados Unidos y en Gran Bretaña, lo que supuso el comienzo de la producción industrial (Cogan y Accolas, 1995). Sin embargo, en los países del sur de Europa continúan elaborándose quesos como antaño, en pequeñas granjas, que son un reflejo de la gran diversidad de tradiciones y de métodos de elaboración, y cuya producción se restringe a áreas geográficas muy localizadas. Cada variedad posee características propias y diferenciadas, vinculadas a la zona de producción, en la que el tipo de leche, los pastos, el clima y método de elaboración, tienen una gran influencia. Son los denominados quesos artesanales. La creciente demanda de este tipo de quesos está influyendo notablemente en el desarrollo y potenciación. Actualmente son 152 los quesos protegidos por los indicadores geográficos de calidad establecidos por la Unión Europea (Denominación de Origen Protegida (DOP) y Indicación Geográfica Protegida (IGP)) (Reglamento CEE Nº 2081/92).

### Los quesos tradicionales en España

El sector quesero se halla ampliamente extendido por todas las regiones españolas, generando una importante actividad ganadera en aquellas comarcas carentes de otros recursos económicos. Las diferentes civilizaciones, junto con las diferentes orografías y climas, han favorecido la coexistencia de una amplia variedad de quesos tradicionales, cada uno de ellos con unas características particulares determinadas por el tipo de leche, el tipo de cuajo, la tecnología de elaboración, las condiciones de maduración, etc.

La producción de un amplio número de quesos tradicionales es *artesanal* porque cumple una serie de requisitos: elaboración a partir de leche de una única explotación o adquirida a ganaderos del mismo municipio o municipios limítrofes, procedente de ganaderías saneadas; utilización de leche cruda preferentemente; la cantidad de leche transformada diariamente será de 500 litros en las queserías unifamiliares, o de 1500 litros diarios en el caso de cooperativas.

En el conjunto de quesos tradicionales de España, 19 disponen de indicador de calidad DOP y 1 el IGP. La producción anual de las variedades de queso protegidas por el sello de calidad fue de 15.782 Tm en el año 2002, lo que supone un 4.9% de la producción total de queso (MAPA, 2002).

Los estudios llevados a cabo en una buena parte de los quesos con DOP permiten tener un conocimiento muy preciso de sus características físico-químicas y microbiológicas. Entre otros, cabe citar los trabajos realizados sobre el queso Manchego (Núñez & Martínez-Moreno, 1976; Ordóñez et al., 1978); Majorero (Fontecha et al., 1990); Idiazábal (Pérez-Elortondo et al., 1998; 1999), Mahón (Ramos et al., 1982; Alcalá et al., 1982), Tetilla (Menéndez et al., 2001); Roncal (Ordóñez et al., 1980), La Serena (Fernández del Pozo et al., 1988a, 1988b), La Torta del Casar (Ruiz-Iñiguez et al., 1984; Poulet et al., 1993).

## Los quesos tradicionales en Asturias

Los quesos asturianos toman su nombre de la zona de elaboración (municipio, valle, zona de montaña, etc.) y su gran diversidad es un reflejo de la variedad de tradiciones y métodos de elaboración (SADEI, 1985) (Rodríguez et al., 2000).

La importancia de sector lácteo en la región favorece la producción de queso. Es destacable la producción de leche de vaca (665, 2 millones de litros), que representa el 10,76% de la producción nacional, a la que hay que añadir una pequeña cantidad de leche de oveja (145.000 litros) y de cabra (550.000 litros) (SADEI, 2002). Sin embargo, la producción de queso artesanal es pequeña (970.000 Kgs), a pesar de que Asturias es la Comunidad Autónoma con mayor número de quesos artesanales (40). Sólo un queso, el Cabrales, posee Denominación de Origen Protegida (1990), mientras que los quesos Afuega'l Pitu, y Gamonedo poseen Denominación de Origen Provisional (BOPA nº 195, 2003).

Los quesos asturianos también son objeto de estudio, habiéndose tipificado hasta el momento los quesos Cabrales (Núñez, 1978; Núñez & Medina, 1979; Alonso, 1985); Gamonedo (González de Llano, 1989; González de Llano et al., 1992), Afuega'l Pitu (Cuesta, 1996; Cuesta et al., 1996) y Peñamellera (Estepar et al. 1999).

## Fermentación espontánea versus fermentos autóctonos

La producción de queso a partir de leche cruda depende de la fermentación espontánea de la leche provocada por el desarrollo de la microbiota presente de forma natural en la misma. Por lo tanto, la calidad del producto final depende enormemente de la carga microbiana y de la variedad de microorganismos presentes en la leche. De ahí que, con frecuencia, las características organolépticas de los quesos artesanales varíen notablemente entre lotes. Una forma de optimizar el proceso consiste en utilizar una pequeña porción de una fermentación previa y exitosa para inocular la materia prima, lo que favorece la dominancia de las cepas mejor adaptadas al proceso (Cogan et al., 1997; Wouters et al., 2002; Leroy y De Vuyst, 2004).

La utilización de fermentos comerciales en la elaboración de los quesos tradicionales trae consigo una cierta pérdida de las características organolépticas típicas del queso que le proporcionan su "singularidad", debido a la escasa biodiversidad de los mismos. (Caplice & Fitzgerald, 1999; Weerkamp et al., 1996). Un modo de solucionar este problema es el diseño de *fermentos autóctonos*, constituidos por cepas silvestres aisladas de la microbiota del queso elaborado con leche cruda, y cuyas características metabólicas proporcionarán a los quesos (de leche cruda o pasteurizada) el sabor y aroma diferenciales que les confiere su particular identidad.

## Afuega'l Pitu: un queso con fermento autóctono

El queso *Afuega'l Pitu* es un queso de coagulación ácida, que se elabora en Asturias con leche de vaca. Existen dos variedades: *atroncao* (forma troncocónica) y *de trapu* (forma de pera achatada). La coagulación se lleva a cabo a baja temperatura (22-25°C), y al final del proceso la acidez alcanza valores del 0.8-0.9% y un pH de 4.42±0.28. Se consume tras un breve período de maduración (entre 3 días y 2-3 semanas).

La pasterización de la leche junto con la utilización de fermentos comerciales han influido negativamente en el sabor y aroma del queso, ya que han perdido intensidad. Para devolver al queso sus características organolépticas tradicionales, en el IPLA (CSIC) se ha desarrollado un fermento autóctono a partir de la microbiota láctica del (Cuesta, 1996; Cuesta et al., 1996). Asimismo, se ha optimizado su producción en formato concentrado-liofilizado, de inoculación directa (Cárcoba, 2000; Cárcoba y Rodríguez, 2004; Cárcoba et al., 2004).

## Referencias

- Alcalá, M., Beltrán de Heredia, F. H., Estebán, M.A., Marcos, A. (1982). Archivos de Zootecnia 31: 131-139.
- Alonso, L. (1985). Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid, España.
- Caplice, F., Fitzgerald, G.F. (1999). International J. Food Microbiol. 50: 131-149.
- Cárcoba, R., (2000). Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Asturias. España.
- Cárcoba, R., Rodríguez, A. (2004). ILE 331: 55-60.
- Cárcoba, R., Pin, C., Rodríguez, A. (2004). EurFood Res. and Technol. (aceptado).
- Cogan, T.M. and Accolas, J.P. (1995). En Dairy Starter Cultures. VCH Publishers, Inc. pp. 1-20.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuquier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Rodríguez, E. (1997). J. Dairy Res. 64: 409-421.
- Cuesta, P. (1996). Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Asturias. España.
- Cuesta P, Fernández-García E, González de Llano D, Montilla A, Rodríguez A (1996).. J Dairy Sci. 79: 1693-1698.
- Estepar, J., Sánchez, M. M., Alonso, L., y Mayo, B. (1999). Int-Dairy J.; 9 (10) 737-746.
- Fernández-del-Pozo, B; Gay, P; Medina, M; Rodríguez-Marín, M.A. Núñez, M. (1988). J. Dairy Res.; 55 (3) 457-464.
- Fernández-del-Pozo, B., Gaya, P; Medina, M; Rodríguez-Marín, M.A., Núñez, M. (1988). J. Dairy Res.; 55 (3) 449-455.
- Fontecha, J., Peláez, C., Martín-Hernández, C. (1990). J. Dairy Sci. 73: 1150-1157.
- Fox, P.F. (1993). En Cheese: Chemistry, physics and microbiology (2nd e., Vol.1). London: Chapman & Hall. pp. 1-36.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000). En Fundamentals of Cheese Science. AN Aspen Publication. pp. 1-9.
- González de Llano, D. (1989). Tesis Doctoral Universidad. Complutense. Madrid, España.
- González de Llano, D., Ramos, M., Rodríguez, A., Montilla, A., Juárez, M. (1992). Int. Dairy J. 2 (2) 121-125.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004).. Trends in Food Sci. Technol. 15: 67-78.

- MAPA. (2002). Datos de Denominaciones de origen protegidas e identificación geográfica protegida de productos alimentarios. Madrid.
- Menéndez, S. Godínez, R; Centeno, J.A. Rodríguez-Otero, J.L. (2001). *Alimentaria*, nº. 320: 77-83.
- Núñez, M. (1978). "Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation". *J. Dairy Res.*, 45, 501-508.
- Núñez, M., Martínez-Moreno, J.L. (1976). *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias; Serie General No. 4: 11-31.*
- Núñez, M., y Medina, M. (1979). *Le Lait*, 588, 497-513.
- Ordóñez, J.A., Masso, J.A. Mármol, M. P., Ramos, M. (1980). *Lait* 60: 283-294.
- Ordóñez, J.A; Barneto, R., Mármol, M.P. (1978).. *Anales de Bromatología* 30 (3/4) 361-373.
- Pérez-Elortondo, F.J; Albisu, M; Barcina, Y. (1999). *Lait*; 79 (3) 281-290.
- Pérez-Elortondo, F.J; Aldamiz-Echobarria, P; Albisu, M; Barcina, Y. (1998).. *Int. Dairy J.* 8 (8) 725-732.
- Poulet, B; Huertas, M; Sánchez, A; Cáceres, P; Larriba, G. (1993). *J. Dairy Res.* 60 (1) 123-127.
- Ramos, M., Barneto, R., Suárez, J.A., Iñigo, B. (1982). *Chem, Mikrobiol. Lebens* 7: 167-172.
- Rodríguez, A., Alonso, L., González de Llano, D., G. de los Reyes-Gavilán, C., Mayo, B. 2000. *Alimentaria*: Vol. Junio, pp: 111-124.
- Ruiz-Iniguez, J; Fernández-Salguero, J; Esteban, M.A., Marcos, A. (1984). *Archivos de Zootecnia*; 33 (127) 301-312.
- SADEI (Sociedad Asturiana de Estudios Económicos e Industriales) (1985). "Los Quesos Artesanales Asturianos". Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias.
- SADEI. (2002). Cuentas económicas de la agricultura asturiana.
- Weerkamp, A.H., Klijn, N., Neeter, R., Smit, G. (1996). *Nether. Milk Dairy J.* 50: 319-332.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002) *Int. Dairy J.* 12: 91-109.

## **Aceitunas verdes estilo español o sevillano: de la fermentación tradicional a la utilización de cultivos iniciadores**

José Luis Ruiz Barba y Rufino Jiménez Díaz

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla

Los frutos del olivo (*Olea europaea sativa*), cosechados en un estado apropiado de madurez y procesados de una manera adecuada, se convierten en un producto comestible con unas características organolépticas muy apreciadas. La industria de la aceituna de mesa constituye una actividad económica muy importante en España. Prueba de ello es que de las 1,1-1,3 millones de toneladas de aceituna de mesa que se producen anualmente en el mundo, el 25% de ellas proceden de nuestro país. Además, España exporta el 50% del total mundial anual de aceitunas de mesa, de las que el 35% han sido elaboradas en la provincia de Sevilla.

Existen muchos métodos de procesado pero todos ellos están orientados a eliminar el amargor natural de los frutos provocado por la presencia de compuestos fenólicos, principalmente oleuropeína. Entre estos métodos, el más importante por el volumen de frutos procesados, los recursos económicos que genera y su complejidad microbiológica es el denominado de obtención de aceitunas verdes estilo español o sevillano, al cual nos vamos a referir a lo largo de esta comunicación. Este procedimiento, tradicional y empírico hasta hace poco, ha necesitado de un gran esfuerzo de investigación tecnológica a fin de mejorar la obtención del producto final. El Instituto de la Grasa ha tenido un papel relevante en el desarrollo de buena parte de esas investigaciones desde el primer momento de su fundación, a principios de los años 40 del siglo pasado. Más recientemente, nuestro grupo de investigación ha tenido la fortuna de contribuir de manera eficiente a la mejora de dicho procedimiento, ya que hemos dedicado todo nuestro esfuerzo investigador a la biotecnología de las bacterias lácticas en relación con la fermentación de vegetales. Ello nos ha permitido desarrollar cultivos iniciadores, cuyo uso no se ciñe exclusivamente a la fermentación de aceitunas sino de otros muchos productos vegetales con destino al consumo humano.

### **¿En qué consiste el proceso de fermentación de aceitunas verdes estilo español?**

Básicamente, en procesar los frutos de forma tal que la flora epifítica ocasional (formada principalmente por levaduras y bacterias lácticas) comience a desarrollarse en las salmueras de fermentación, metabolice los azúcares que contiene el fruto produciendo ácido láctico y, como consecuencia, se produzca una importante bajada del pH. Esta bajada de pH, junto al propio ácido láctico y otros metabolitos secundarios producidos por las bacterias lácticas (pertenecientes esencialmente a la especie *Lactobacillus pentosus*) permite una conservación adecuada del producto final, preservando las aceitunas de posibles deterioros debido al desarrollo de microorganismos alterantes.

El procesamiento de los frutos es relativamente simple y en la industria del sector siempre obedece a criterios subjetivos de la persona que lo lleva a cabo: tratamiento de los frutos con una solución de NaOH, lavado con agua y posterior colocación de los mismos en una salmuera.

El procedimiento descrito, aunque simple, tiene el efecto deseado: propiciar que al cabo de unos días -y pese a que las bacterias lácticas tan sólo representan aproximadamente entre el 0,01 y el 1,0% del total de la población microbiana de las salmueras en los estadios iniciales del proceso- se desarrolle de forma vigorosa una microbiota compuesta de levaduras y *L. pentosus* que persistirá hasta el final de la fermentación (entre 4 y 5 meses). Un balance adecuado de ambas poblaciones proporciona un producto final con unas características organolépticas precisas.

Sin embargo, en numerosas ocasiones las aceitunas sufren alteraciones debido a un desarrollo inadecuado de los microorganismos que llevan a cabo el proceso, lo que es aprovechado por otros microorganismos oportunistas que colonizan las salmueras de fermentación y deterioran el producto final, privándole así de las características organolépticas que lo hacen tan apreciado.

### **Hacia un proceso fermentativo más racional: diseño de cultivos iniciadores**

Como en la producción por fermentación de otros muchos alimentos, controlar el proceso desde el punto de vista microbiológico se convierte ahora en objetivo prioritario. Ello se consigue añadiendo a las salmueras de fermentación un cultivo iniciador consistente en una o varias cepas de bacterias lácticas, previamente seleccionadas por poseer una serie de características biotecnológicas adecuadas al proceso fermentativo en cuestión. Puesto que la fermentación de aceitunas verdes al estilo español o sevillano es un proceso abierto, en el que no se puede esterilizar el material de partida, es necesario seleccionar cuidadosamente aquellas características que hacen a una cepa de *L. pentosus* más competitiva frente a otras bacterias que se desarrollan en el mismo nicho ecológico, es decir, las salmueras de fermentación.

La selección de cepas de *L. pentosus* como posibles candidatas a formar parte de un cultivo iniciador se basa en diferentes criterios. En general, las bacterias lácticas son auxotrofas para muchos de los aminoácidos esenciales y para un gran número de vitaminas del grupo B. Con objeto, pues, de favorecer su desarrollo en los estadios iniciales de la fermentación (donde hay un desarrollo escaso de levaduras que suponen su principal aporte de este tipo de compuestos) es preciso seleccionar cepas prototrofas a dichas vitaminas y aminoácidos. Además, sería deseable que su tasa de crecimiento en las salmueras fuera lo

más alta posible a temperaturas por debajo de su óptimo de crecimiento, ya que la mayoría de los fermentadores están emplazados en patios de fábricas al aire libre y general aún no cuentan con sistemas de calefacción de las salmueras.

Por otro lado, aunque el contenido en polifenoles con actividad inhibidora del crecimiento bacteriano en las aceitunas sometidas a este tipo de elaboración es bajo, sería deseable que las cepas seleccionadas presentaran un grado de resistencia moderada a los mismos. También sería conveniente que las cepas se seleccionaran en función de su tolerancia a la sal, ya que las salmueras de fermentación contienen entre el 6 y el 8% de NaCl. Finalmente, y de capital importancia, que las cepas seleccionadas posean armas de competitividad efectiva y eficiente, como es la capacidad de producir bacteriocinas. Con ello se aseguran el dominio pleno de las salmueras de fermentación.

Teniendo en cuenta estas características, hemos diseñado dos cultivos iniciadores. Uno de ellos, constituido por una única cepa de *L. pentosus* cuya característica más sobresaliente es la de producir plantaricina S. El segundo es un cultivo iniciador mixto formado por dos cepas de *L. pentosus*. Entre sus características biotecnológicas más destacadas figuran la producción de plantaricina S en un caso y una alta tasa de crecimiento en salmueras en el otro.

### **Comprobar la idoneidad de los cultivos iniciadores en condiciones reales de fermentación**

Aunque para diseñar los cultivos iniciadores atendimos siempre a criterios biotecnológicos que los dotaran de la capacidad de competitividad suficiente para dominar las salmueras de fermentación a lo largo del proceso fermentativo era necesario comprobar su idoneidad en condiciones reales. A nivel de planta piloto e industrial, tanto el cultivo iniciador de cepa única como el mixto demostraron una alta capacidad de colonización de las salmueras en fermentadores de diferentes capacidades, desde los 5 kg de frutos a los 15.000 kg, pasando por los de 50 kg y 300 kg. En todos estos casos se demostró que una de las características que dotaban a los cultivos iniciadores de mayor potencial competitivo frente a otras bacterias que se desarrollan en ese mismo nicho ecológico era la capacidad de producir plantaricina S. De esta forma, el cultivo iniciador predomina sobre otras poblaciones bacterianas a lo largo del proceso fermentativo completo. Con ello se consigue no alterar la esencia del proceso tradicional pero se controla cualquier posible variación microbiológica que pudiera repercutir negativamente en la obtención de un producto final de alta calidad organoléptica, acortando además de manera drástica el tiempo de obtención de éste.

El desarrollo y aplicación de técnicas moleculares tales como PCR, RT-PCR y comparación de perfiles plasmídicos nos permitió el seguimiento de la dinámica de poblaciones no sólo de nuestros cultivos iniciadores sino el de otras bacterias lácticas que colonizan a la vez las salmueras de fermentación de aceitunas verdes estilo español o sevillano.

### **Optimizando las condiciones de fermentación**

Las condiciones físico-químicas iniciales de las salmueras de fermentación constituyen un conjunto de variables muy importante a tener en cuenta para una implantación correcta del cultivo iniciador. Para averiguar cuáles eran los parámetros óptimos de cada una de estas variables en la fermentación de aceitunas verdes estilo español o sevillano se procedió a aplicar un diseño matemático factorial en el que se tuvieron en cuenta el pH inicial de las salmueras, el ácido utilizado para corregirlo, la concentración de NaCl de las mismas, el tamaño del inóculo, el *carrier* del inóculo, la homogeneización de las salmueras después de la inoculación y el tiempo transcurrido desde la colocación de las aceitunas en salmuera hasta su inoculación. El análisis matemático del desarrollo del cultivo iniciador de cepa única en las fermentaciones llevadas a cabo en las condiciones señaladas nos indicó que se podría mejorar de forma apreciable su implantación si se inoculaban aproximadamente  $10^7$  UFC por ml de salmuera, con una corrección del pH inicial con ácido acético (hasta valores entre 4,5 y 6,5) y con un contenido en sal de las salmueras menor del 4%.

Sin bien éstas son las condiciones óptimas para una implantación adecuada de los cultivos iniciadores, la versatilidad de éstos hace que puedan desarrollarse también en condiciones menos favorables. Así, pudimos comprobar que a nivel industrial el cultivo iniciador mixto se desarrollaba de manera adecuada sin necesidad de una bajada previa de pH, con un contenido en sal de las salmueras del 6% y con inóculos iniciales en el rango entre  $10^6$  y  $10^5$  UFC/ml. Otra prueba más de la versatilidad de dichos inóculos es que se pueden utilizar para fermentar productos afines, por ejemplo zanahorias.

### **Conclusiones**

El desarrollo de cultivos iniciadores para la fermentación de vegetales es una excelente herramienta tecnológica de incalculable valor. Gracias a ellos se mejora de manera ostensible la producción de estos alimentos con destino al consumo humano, conservando a la vez el sabor tradicional del producto. Al utilizar y potenciar medios naturales de fermentación se evita el uso excesivo de productos químicos en forma de aditivos que alteran sustancialmente dicho sabor. En resumen, su uso implica volver al sabor del pasado evitando sus inconvenientes.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a todos aquellos colaboradores dentro y fuera del Instituto de la Grasa, así como a las industrias del aderezo de aceitunas, que han contribuido a que estas investigaciones hayan tenido el éxito deseado. Estas investigaciones han sido subvencionadas por la CICYT, el MCYT y la D.G. XII de la UE.

### Aplicaciones industriales de las altas presiones hidrostáticas en alimentos: aspectos microbiológicos

Narcís Grèbol

IRTA-Centro de Tecnología de la Carne

Las altas presiones hidrostáticas han generado desde 1990 una cantidad creciente de aplicaciones industriales para el tratamiento de alimentos y han demostrado ser una tecnología con capacidad para inactivar algunos enzimas y microorganismos afectando tan solo mínimamente a la composición y propiedades nutricionales de los alimentos.

Las primeras aplicaciones aparecieron en Japón para alimentos de origen vegetal, con la finalidad de reducir el impacto de los procedimientos tradicionales de conservación sobre el sabor, color y contenido en vitaminas, o incluso para reducir la alergenicidad del arroz. Es precisamente en el sector de los productos de origen vegetal donde ha habido un mayor crecimiento de las aplicaciones industriales de las altas presiones. La aparición en 1996 en el mercado de Estados Unidos de salsa guacamole y de productos de aguacate tratados por alta presión, tuvo un éxito comercial importante. La pequeña empresa pionera que los elabora tiene actualmente el 70 % del importante mercado americano, y ahora, sus principales competidores ya utilizan también esta tecnología para conseguir un sabor más fresco que es apreciado por los consumidores. El principal fabricante de equipos de alta presión para alimentos en Estados Unidos tiene por lema publicitario "más fresco bajo presión".

El mayor número de aplicaciones industriales se produce en los jugos de frutas, en especial a base de cítricos, o bien de manzana o zanahoria con adición de cítricos para aprovechar el efecto sinérgico de las altas presiones con valores bajos de pH. Siempre el objetivo industrial es el de conseguir un sabor fresco evitando la pasteurización térmica, pero con una vida comercial mucho más larga que el producto fresco sin pasteurizar. Se protegen mejor las vitaminas y se consiguen otros efectos como la reducción del sabor amargo en el pomelo o la conservación de las propiedades anticancerígenas del jugo de brécol. Las altas presiones en jugos vegetales o de frutas se aplican industrialmente, además de en Japón, Estados Unidos, Canadá y México, y en algunos países europeos como Francia, Irlanda, Portugal, Inglaterra, Italia y la República Checa.

El uso de las altas presiones en mariscos en Estados Unidos surgió de la aparición de un brote de *Vibrio parahaemolyticus* en ostras frescas con casos de muerte, que produjo un fuerte impacto negativo en la confianza de los consumidores y que obligó a los industriales del sector a buscar soluciones para garantizar la seguridad del producto afectando mínimamente al aspecto, sabor y textura de la ostra fresca. La baja resistencia de *Vibrio* al tratamiento por altas presiones permitió desarrollar aplicaciones a presiones moderadas de 300 MPa. La difusión de esta tecnología en el sector del marisco se aceleró por el hecho de que a estas presiones se produce una desnaturalización proteica pequeña pero suficiente como para hacer que la ostra se abra sin esfuerzo después del tratamiento, permitiendo reducciones muy importantes de la mano de obra necesaria en las industrias. Esta misma propiedad se utiliza para el facilitar el pelado de langostas frescas, separando mucho más fácilmente el caparazón y con un mayor rendimiento. En 2002 ya se trataron 25000 toneladas de ostras por alta presión en Estados Unidos y actualmente hay al menos 5 industrias que tratan marisco por alta presión en Estados Unidos y Australia. En Japón y en España hay aplicaciones para productos de pescado y en Italia se utiliza para mejorar la conservación del bacalao parcialmente desalado.

En el caso de la carne y de los productos cármicos, el primer jamón cocido loncheado tratado por altas presiones se presentó en Japón en 1994, pero la producción industrial de jamón cocido loncheado tratado por altas presiones la inició España en 1998 seguida de Campofrío en 2002. Las altas presiones en productos cármicos se aplican también en Estados Unidos para productos con carne de ave, de vacuno o de cerdo cocinados o loncheados, en Italia para jamón de Parma, salami y mortadela y en España para tapas y para productos loncheados cocidos a base de carne o de pescado.

A estas aplicaciones conocidas deberíamos añadir seguramente otras realizadas por empresas que se amparan en el secreto industrial para mantener durante más tiempo las ventajas competitivas (sabor fresco, mayor conservación, menor riesgo sanitario) que consiguen con el uso de esta tecnología. La falta de una legislación suficientemente clara sobre la obligación de hacer constar en el etiquetado todos los tratamientos a los que se somete un alimento, hace que algunos de los productos tratados por alta presión no lo indiquen en la etiqueta.

Cinética de inactivación de los microorganismos por las altas presiones: Una de las claves para desarrollar procesos industriales seguros, es conocer el comportamiento de los microorganismos que representan un riesgo sanitario en cada producto, frente a los parámetros de regulación del proceso (presión, temperatura, tiempo), considerando las variaciones posibles en las características del producto a tratar (pH,  $a_{wv}$ , composición).

Una característica del tratamiento por altas presiones es que siempre lleva consigo un calentamiento adiabático tanto del fluido de presurización como del alimento, que es función de su compresibilidad y de la presión aplicada, pero que a temperatura ambiente puede estar en la mayoría de los casos alrededor de los 3 °C cada 100 MPa.

La tendencia a considerar las altas presiones como un proceso atómico, llevó en muchos casos a minimizar la importancia de la temperatura en la inactivación de los microorganismos por las altas presiones, y a que en muchos trabajos, la temperatura mencionada como de tratamiento sea en realidad la temperatura del fluido y del alimento justo antes de iniciar el proceso. Como que además el recipiente de tratamiento tiene una masa con gran inercia térmica que permanece fría cuando se calienta adiabáticamente su contenido, en los tratamientos de larga duración la temperatura efectiva de presurización del producto se va reduciendo durante el proceso por intercambio de calor con la pared del recipiente.

Además, los primeros equipos para investigación en muchas ocasiones no alcanzaban presiones de 600 MPa, provocando tan solo daños subletales en la mayoría de los microorganismos. Por estas razones, se encuentran muchos datos contradictorios en la literatura científica sobre la forma de las curvas de inactivación, que no permiten acumular suficientes evidencias para establecer parámetros generales de proceso que sean seguros y de aplicación inmediata al tratamiento industrial de alimentos. Mientras que muchos autores consideran que el modelo log-lineal aplicado al tratamiento térmico no es válido para el tratamiento por altas presiones, otros autores consideran que si se consigue mantener la temperatura de tratamiento estable durante el proceso, y si las presiones aplicadas son suficientemente letales para aquel microorganismo, las curvas de inactivación resultantes son razonablemente lineales o con un débil efecto de cola.

Estas dificultades han limitado la capacidad de las autoridades sanitarias para decidir sobre la autorización o no de aplicaciones comerciales de las altas presiones en alimentos. Algunos países como Francia e Inglaterra, han autorizado expresamente el tratamiento de jugos de frutas a través de expedientes de solicitud individuales que han podido ser valorados positivamente gracias a la mayor efectividad de las altas presiones a altas actividades de agua con bajo pH, a la fijación razonada de una fecha de consumo preferente y a la mención de la obligación de mantener el producto en refrigeración. En Inglaterra, incluso han llegado a declarar que las altas presiones no eran "per se" un nuevo proceso a efectos de la directiva europea de "novel foods".

En Estados Unidos las recomendaciones de las autoridades sanitarias han mencionado expresamente las altas presiones como un proceso aplicable después del envasado para prevenir la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos "ready to eat", mientras que en España se ha aplicado una tolerancia vigilante a la espera de posturas comunes en la Unión Europea, donde existen solicitudes de uso presentadas en diferentes países. En España están pendientes de resolución como mínimo las dos solicitudes referentes a los dos usuarios actuales en productos cárnicos, avaladas por estudios toxicológicos, de bioequivalencia nutricional y microbiológicos. En el caso de los productos cárnicos debemos pensar en la importancia que el jamón curado tiene en nuestras exportaciones y que la ausencia de *Listeria monocytogenes* en productos que como el jamón curado no puede recibir ningún tratamiento térmico, se puede asegurar con el uso adecuado de altas presiones a niveles de 600 MPa o superiores, que ya están disponibles a nivel de equipos industriales, producidos por la empresa española NC Hyperbaric o por la americana Avure. Es también posible reducir el riesgo de *Escherichia coli* O157:H7 en carnes frescas, picadas o marinadas, aplicando altas presiones, especialmente para su uso seguro en alimentación de colectividades. Presiones relativamente bajas sirven también para eliminar el riesgo asociado a parásitos en el consumo de pescado crudo.

La competitividad industrial en la producción de equipos es clave para conseguir sistemas industriales que reproduzcan con fiabilidad la evolución de la presión y la temperatura a lo largo del tiempo de proceso, lote a lote. En un próximo futuro, como consecuencia de la evolución tecnológica de los equipos industriales, la esterilización térmica asistida por altas presiones permitirá la producción de conservas con una menor alteración de las propiedades sensoriales y con plena garantía sanitaria.

## Microbiología del procesado mínimo de frutas y derivados por pulsos eléctricos de alta intensidad de campo y métodos combinados

Olga Martín Belloso, María Alejandra Rojas Graü, Pedro Elez Martínez  
Departament de Tecnologia d'Aliments, CeRTA-UTPV, Universitat de Lleida

En la actualidad los consumidores demandan, cada vez más, alimentos que posean una apariencia y un valor nutricional semejante al de los productos frescos, sin aditivos químicos, que sean microbiológicamente seguros y de una elevada calidad. En este sentido, la industria alimentaria y el sector científico han desarrollado alimentos Mínimamente Procesados (MP), en los cuales la aplicación de tratamientos más suaves permiten garantizar la estabilidad microbiológica del alimento, modificando muy poco sus características sensoriales y nutricionales.

Para asegurar la estabilidad y seguridad microbiológica de los alimentos MP, puede aplicarse una combinación de varios factores de conservación (obstáculos o barreras), o bien tratar el alimento mediante tecnologías no térmicas de procesado como son los pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (PEAIC) solos o combinados.

### Microbiología del procesado mínimo de frutas por métodos combinados

Las frutas y hortalizas mínimamente procesadas o de IV gama se definen como aquellas frutas y hortalizas frescas que son obtenidas mediante diferentes operaciones unitarias de preparación, tales como lavado, pelado y troceado, y que son sometidas a una combinación de tratamientos parciales de conservación que permiten finalmente obtener un producto similar al fresco, con buenas características nutricionales y sensoriales y microbiológicamente seguros.

A pesar del avance observado en los métodos de conservación y extensión de la vida útil, el papel de los microorganismos en la alteración y seguridad de los productos de IV gama sigue siendo uno de los factores limitantes con más peso en el mantenimiento de la calidad.

Debido a su bajo pH, la flora alterante típica de frutas mínimamente procesadas está mayoritariamente constituida por mohos y levaduras. Se han detectado más de 20 géneros de mohos en estos productos, incluyendo *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Phytophthora*, y *Rhizopus*, aunque el tipo específico de moho causante de alteraciones dependerá de la variedad de fruta con la que se esté trabajando.

Aunado a esto, las frutas y hortalizas pueden servir de vehículo para casi cualquier patógeno causante de intoxicación alimentaria. Entre los patógenos causantes de brotes alimentarios en los que se han visto implicados frutas y hortalizas MP pueden citarse: *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* (O157:H7), *Aeromonas*, *Listeria monocytogenes*, y parásitos como *Entamoeba histolytica* o *Giardia lamblia*.

Las posibilidades de crecimiento, tanto de flora alterante como de microorganismos patógenos en estos productos puede minimizarse de forma importante manteniendo un alto nivel de higiene, tanto en el material como en los equipos empleados para el procesado, siendo también necesaria la aplicación de principios básicos de higiene por parte de los trabajadores y manipuladores.

Actualmente, son varios los obstáculos que actuando de manera sinérgica o aditiva permiten alargar la vida útil de las frutas MP asegurando su estabilidad. En la combinación de métodos, el uso de bajas temperaturas,  $a_w$ , pH, envasado en atmósferas modificadas, ozono, luz ultravioleta, agentes antimicrobianos naturales y recubrimientos comestibles están entre los más empleados en la conservación de los productos de IV gama. Por ejemplo, un estudio realizado en manzana Golden delicioso MP mostró que el uso de una atmósfera de envasado libre de oxígeno (0 kPa de  $O_2$ ) y de plásticos de baja permeabilidad (15 cm<sup>3</sup>/m.24h.bar), aunado a bajas temperaturas de refrigeración (4°C), permitía obtener un producto microbiológicamente estable durante 30 días de almacenamiento. Otros estudios señalan que un envasado en atmósfera modificada (4 kPa  $O_2$  + 10 kPa  $CO_2$ ) combinado con un almacenamiento a 5°C, reduce ligeramente el número de bacterias, mohos y levaduras en melón MP. Se han encontrado resultados similares en trozos de sandía MP.

Compuestos químicos como el ácido sórbico, ácido benzoico, sorbato y benzoato sódico han sido utilizados como agentes antimicrobianos en FMP. Estudios realizados en puré de aguacate mostraron que la adición de 300 mg/kg de ácido sórbico permite mantener el producto microbiológicamente estable durante un período de almacenamiento superior a cuatro meses en refrigeración. La combinación de 1500 mg/kg de benzoato sódico, envasado al vacío y bajas temperaturas permitieron alargar la vida útil de aguacate MP durante 60 días, observándose recuentos de mohos por debajo de 1.3 log UFC/g<sup>-1</sup>.

No obstante, en los últimos años el empleo de estos aditivos provenientes de síntesis químicas se ha visto desplazado por la preferencia del consumidor hacia el uso de sustancias de origen natural, en este caso con propiedades antimicrobianas, las cuales actualmente están siendo muy estudiadas. Mayoritariamente se investigan aceites esenciales como la vainillina, la menta, compuestos carbonílicos o isotiocianatos, que han sido aplicados con éxito en vegetales MP. Sin embargo, su aplicación en frutas es aún limitada, principalmente por los intensos olores que estos compuestos confieren al producto. Se ha observado la inhibición de bacterias mesófilas, mohos, levaduras y una considerable prolongación de la fase logarítmica de bacterias psicrótrofas en rodajas de manzana MP almacenadas a 4°C con 0,15 mmol de hexanal/100g aplicados en la atmósfera de almacenamiento.

Independientemente de los métodos que se empleen para asegurar la estabilidad del alimento, la temperatura es el factor más importante a controlar durante todo el proceso de elaboración, por lo que se hace indispensable el mantenimiento de la cadena de frío desde la recepción de la materia prima hasta la distribución y venta del producto final.

Finalmente, uno de los puntos más débiles en el mantenimiento de la calidad de las frutas MP es el que corresponde al consumidor, cuyas malas prácticas de manipulación del producto puede conllevar en muchos casos a problemas de seguridad alimentaria. No se debe olvidar que se trata de alimentos a los cuales no se les aplica ninguna forma definitiva de destrucción de micro-

organismos, como los tratamientos térmicos, sino que el control de la microflora se consigue mediante una higiene muy estricta durante su manipulación y el almacenamiento bajo una atmósfera modificada en refrigeración.

En España existen ya disposiciones y códigos de buenas prácticas de fabricación concernientes a las condiciones que deben cumplir los productos mínimamente procesados. Dichas normativas están sujetas a lo regulado en el Real Decreto 3484/2000, de 29 de Diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas, estableciéndose en el apartado para comidas del Grupo D (comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos) los límites microbiológicos aceptables que deberían presentar estos productos.

### Microbiología del procesado de derivados de frutas mediante PEAIC

La aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (PEAIC) es una tecnología no térmica que se está estudiando para evitar las incidencias negativas que produce el calor en los alimentos. Actualmente, se están realizando investigaciones sobre la aplicación de PEAIC en alimentos reales, siendo los zumos de fruta unos de los más estudiados ya que estos alimentos son aptos para poder ser tratados mediante PEAIC debido a sus características eléctricas. Con estos sistemas se están consiguiendo inactivaciones elevadas de microorganismos, objetivo principal de toda técnica de conservación, con el consiguiente alargamiento la vida útil de los zumos.

La inactivación microbiana mediante PEAIC depende de factores como: la intensidad de campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, el número de pulsos aplicados, la anchura, la frecuencia y el tipo de pulso aplicado. La destrucción de microorganismos también depende del tipo de microorganismo, de la concentración de inóculo inicial, de la fase de crecimiento del mismo y de la concentración iónica del medio en el que se encuentra. Para mejorar la efectividad de la aplicación de los PEAIC se tienen que encontrar las condiciones de tratamiento más adecuadas y también conocer las propiedades eléctricas del alimento que se va a tratar. El mecanismo de inactivación de los microorganismos mediante PEAIC se basa en la electroporación que producen los PEAIC sobre las membranas celulares de los microorganismos. Los PEAIC provocan la aparición de cambios estructurales en los microorganismos. La aplicación de PEAIC produce el colapso de la membrana celular con la consecuente aparición de poros, rugosidades y protuberancias a la vez que la estructura interna se destruye completamente.

Las bacterias que más se han estudiado son *Lactobacillus brevis* y *Escherichia coli* suspendidos en zumos.

Tratando zumo de melocotón inoculado con *L. brevis* a 32,5 kV/cm durante 64  $\mu$ s se consiguieron 2,7 reducciones decimales. La máxima inactivación conseguida de *L. brevis* suspendido en zumo de naranja fue de 5,8 reducciones decimales al someter al zumo a 35 kV/cm durante 1000  $\mu$ s. Zumo de manzana inoculado con *E. coli* se trató con intensidades de campo de 18 a 30 kV/cm y tiempos de tratamiento de 86 a 172  $\mu$ s, siendo la inactivación máxima del orden de 5 reducciones logarítmicas. En zumo de naranja recién exprimido, realizando un tratamiento de hasta 6 pulsos de 2  $\mu$ s a 30 kV/cm, se han conseguido 5-6 reducciones logarítmicas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, mientras la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* se destruyó del orden de 3,5 reducciones logarítmicas.

La levadura más estudiada en zumos es *Saccharomyces cerevisiae*. En zumo de manzana inoculado con *S. cerevisiae* se han conseguido 6 reducciones decimales aplicando 25  $\mu$ s a 35 kV/cm. Un resultado similar se ha observado al aplicar 5 pulsos de 7 kV/cm en zumo de naranja. Sin embargo, en otros estudios se han conseguido 5.1 reducciones logarítmicas con tratamientos de 35 kV/cm y 1000  $\mu$ s. Se han realizado estudios sobre ascosporas de *Zygosaccharomyces bailii* en diferentes zumos de frutas (manzana, naranja, uva, piña y arándanos) aplicando campos de hasta 36,5 kV/cm y se observó que después de 2 pulsos las ascosporas se habían inactivado entre 3,5 y 4 ciclos logarítmicos. También se han realizado estudios en diversos mohos encontrando que las ascosporas de *Byssoschlamys nivea* y de *Neosartorya fischeri* eran resistentes a un tratamiento de 40 pulsos a 51 kV/cm. En cuanto a la destrucción de la microflora total, se han logrado hasta 7 reducciones decimales en el recuento de aerobios totales y de mohos y levaduras en zumo de naranja al aplicar pulsos a 35 kV/cm durante 59  $\mu$ s, consiguiéndose una vida útil de hasta 112 días conservando el zumo en refrigeración. En zumo de manzana, se ha llegado a obtener una vida útil de 21 días con un tratamiento de 16 pulsos a un campo de 50 kV/cm.

Por tanto, se puede asegurar que el procesado mediante PEAIC es efectivo para destruir los microorganismos de los zumos. La aplicación de PEAIC es una técnica cuyo futuro es muy prometedor en la estabilización microbiológica de los zumos de frutas. Se ha podido observar que los PEAIC reducen considerablemente las poblaciones de determinados microorganismos, sin embargo son menos efectivos en el control de esporas.

El establecimiento de las condiciones de procesado a aplicar tanto en la aplicación de métodos no térmicos de conservación, como es el caso de los PEAIC, al igual que en la combinación de técnicas, así como la determinación de los puntos de control críticos del proceso se podrá conseguir una vez que se haya comprobado la efectividad de las técnicas consideradas. Para ello, habrá que ampliar los estudios sobre el efecto de las mismas en un mayor número de microorganismos para poder encontrar el microorganismo de referencia que permita definir los tratamientos por una parte y, por otra, se deberán optimizar los tratamientos de obtención de alimentos MP con la finalidad de alargar al máximo su vida útil tanto desde el punto de vista microbiológico como nutricional y sensorial.

## Bacterial responses to stress: pressure, pH and salt

Colin Hill

Alimentary Pharmabiotic Centre and Microbiology Department, University College Cork.

### Introduction

Food pathogens may encounter a number of processing parameters during food production (heat, pressure, pH, salt, etc.) and will also have to overcome a plethora of body defenses in order to initiate a successful gastrointestinal infection (these include gastric acid, low  $A_w$ , low iron concentrations, bile acids, an active immune system, a competitive flora and anaerobiosis). *Listeria monocytogenes* is the bacterium responsible for listeriosis, a disease which claims 500 lives every year in the USA (second only to *Salmonella* as a cause of food-related deaths). *L. monocytogenes* is able to infect individuals with an underlying immunological weakness, such as the elderly or the very young, the immunocompromised and pregnant. It is particularly adept at surviving under adverse environmental conditions, such as low pH, high salt and low iron. It can also survive within macrophages, and infects macrophages as a vehicle to achieve systemic dissemination through the blood brain and blood placental barriers. The ability to overcome these environmental challenges, allied to its ability to grow at refrigeration temperatures and in high salt makes *Listeria* an attractive model for studying bacterial stress responses.

We have been interested in stress responses in *Listeria* for some time, and in particular the interplay between overlapping microbial stress responses, and their regulation. In total, we have disrupted over 100 different genes in *Listeria monocytogenes* LO28, based on random mutagenesis and bioinformatic approaches (using the genome sequence released in 2001). This has given us some insight into some of the systems involved in stress sensing and stress responses, though we are still some distance from a complete and rational overview. This presentation will focus on a number of the mechanisms we have studied, including the GAD system (glutamate decarboxylase), which plays a role in acid survival and growth, bile resistance (by various mechanisms) and osmotolerance (primarily due to compatible solute accumulation). An interesting link between salt tolerance, cold tolerance and pressure resistance will also be presented.

### Acid tolerance

The GAD system plays a very important role in the acid tolerance of *L. monocytogenes*. In brief the cell takes up a molecule of glutamate and decarboxylates it to gamma aminobutyric acid (GABA), consuming an intracellular proton in the process. The GABA is then exchanged for a fresh molecule of glutamate via a dedicated antiporter. Two GAD systems, *gadT1D1* and *gadT2D2*, have been characterised in strain LO28. Analysis of a number of GAD mutants has demonstrated that elimination of the *GadT2D2* system results in sensitisation to the low pH of the stomach resulting in more rapid killing in this environment. This sensitivity manifests itself as a dramatic 6 log reduction upon exposure to porcine gastric fluid, whereas the parent survives relatively unscathed. It is notable that strains which display reduced GAD activity are more sensitive to gastric fluid. Indeed, the significant strain variation in GAD activity correlates significantly with the observed levels of acid tolerance, suggesting that GAD represents the key mechanism for maintenance of pH homeostasis in *L. monocytogenes* in this environment. The second *GadT1D1* system seems to be important for growth at mildly low pH.

The GAD system is also important in the survival of *L. monocytogenes* in low pH foods such as apple, orange and tomato juices, yoghurts, salad creams and mayonnaise<sup>53</sup>. The greater acid sensitivity of the mutant was apparent even in foods with levels of free glutamate as low as 0.22 mM. It was also found that survival of the wild-type strain, in acidified reconstituted skim milk, diluted to reduce free glutamate levels, improves in response to supplementation with monosodium glutamate. With the exception of the dilute milk model, no correlation was observed between glutamate concentrations and the levels of survival of the wild-type strain, nor the relative difference between the wild-type and  $\Delta$ *gadAB* strains, suggesting that glutamate is present in excess in all instances. It would thus seem that at the mild acidic pHs of the foods tested the glutamate decarboxylase system can function optimally at the amount of free glutamate naturally present in these foodstuffs.

### Bile tolerance

The human gastrointestinal tract is an extremely hostile environment for food-borne pathogens. Variations in pH, low oxygen levels, nutrient limitation and elevated osmolarity constitute potential impediments to survival [Chowdhury *et al.*, 1996]. Given that the liver secretes as much as a litre of bile into the intestinal tract each day, exposure to bile also represents a serious challenge. Bile is a digestive secretion that plays a major role in the emulsification and solubilization of lipids. This detergent property of bile also confers potent antimicrobial activity and is an important part of the body's physicochemical defence against pathogenic microorganisms. Bile has the ability to dissolve the phospholipids and proteins of cell membranes causing cells to lyse. Therefore, the ability of pathogens to tolerate bile is likely to be important for their survival and subsequent colonization of the gastrointestinal tract.

The genome sequence of *L. monocytogenes* EGDe revealed the presence of a *bsh* gene that encodes a bile salt hydrolase enzyme that degrades bile acids and analysed the role of this *locus* in resistance to bile. It was observed that the MICs for porcine bile and purified bile salts are twofold lower than the wild-type when the gene is inactivated (0.08% and 0.15%, respectively). We have recently confirmed their data in *L. monocytogenes* LO28 and have demonstrated that another *bsh* homologue *lmo0447*

which we have designated *pva*, as well as a putative bile acid dehydratase *lmo0754* are essential for full bile tolerance. In addition, we have recently employed a transposon-based approach to identify and characterize loci that contribute to inherent bile tolerance. Disrupted loci in bile sensitive mutants included genes putatively involved in membrane biogenesis (*lmo0516* and *lmo1451*), membrane transport (*btlA*, *lmo0448*, *lmo0605*, *lmo1416* and *lmo1442*), anaerobic metabolism (*pfjB*), macromolecule stability (*lmo1450*) and transcriptional regulation (*lmo1408* and *zurR*). Physiological analyses revealed that growth of bile sensitive mutants was significantly affected under a variety of other stress conditions (acid - pH 5.5, alkaline - pH 9, salt - 7% NaCl, ethanol - 5%, SDS - 0.05%) suggesting that these loci contribute to general stress resistance.

### Osmotolerance

Growth at high salt concentrations is attributed mainly to the accumulation of organic solutes such as glycine betaine and carnitine. We have characterized *L. monocytogenes* LO28 strains with single, double and triple deletions in the osmolyte transport systems BetL, Gbu and OpuC. The highest reduction in growth rate was found for the triple mutant, although it was still capable of growth under these adverse conditions. In addition, we analyzed the growth and survival of the triple mutant in an animal (murine) model and in food substrates. While the triple mutant showed the most significant effects, an OpuC mutant displayed a significant reduction in its ability to cause systemic infection following peroral co-inoculation with the wild type parent, while it was the betaine uptake mutants which were most affected in food models.

### Barotolerance

High pressure (HP) treatment is currently being investigated as a technique for extending the shelf-life of foods through bacterial inactivation. We have investigated the mechanisms by which *L. monocytogenes* LO28 protects itself against high pressure during treatment of oysters. A novel method of bacterial injection was developed to allow reproducible, high numbers ( $10^6$ - $10^8$ ) of bacteria to be introduced into oysters. At pressures > 400 MPa bacteria were considerably more pressure resistant in oysters than in buffered systems. This difference in HP-induced inactivation of bacteria in oysters and PBS increased at higher pressures; culminating in a 5-log difference at 480 - 600 MPa. The influence of salt content, one of the main differences between the oyster system and PBS, on baroresistance of bacteria in tryptone soya yeast extract broth (TSBYE) containing 3.5% salt and 0.5% salt was then investigated. All bacteria were considerably more resistant at the higher salt concentration. Using the same osmolyte uptake mutants described above we were able to make the link between osmolyte uptake and barotolerance.

### Virulence

The role of several of these stress genes/systems in virulence has been analysed using the murine model and tissue cultures. While these models are not particularly good mimics of the human physiology they can, in properly controlled experiments, provide some valuable information as to the role of individual genes and the importance of stress response to this 'modern' food pathogen.

### Conclusion

The ability to tolerate stress plays a very important role in the virulence potential of *Listeria monocytogenes*. Indeed, it is fair to say that a strain incapable of mounting a stress response would be avirulent and harmless to humans, and probably would not survive very long in the environment. These essential factors may provide targets for intervention, either at the level of food processing regimes or clinical strategies for prophylaxis or disease management.

### Selected References

1. Sleator, R., C. Gahan, T. Abee and C. Hill. 1999. Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transporter important in salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2078-2083
2. Gahan, C., and C. Hill. 1999. Acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 50:93-100.
3. Morgan, S. M. R.P. Ross, T. Beresford and C. Hill. 2000. Combination of high pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *J. Appl. Microbiol.* 87:414-420.
4. Cotter, P.D., C. Gahan and C. Hill. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol. Microbiol.* 40:465-75.
5. Sleator, R., C. Gahan and C. Hill. 2001. Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role in salt tolerance and murine infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2571-2577.
6. Sleator, R., C. Gahan, T. Abee, J.A. Wouters and C. Hill. 2001. Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in the salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2692-2698.
7. Cotter, P.D., K. O'Reilly and C. Hill. 2001. Role of the Glutamate Decarboxylase Acid Resistance System in the Survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in Low pH Foods. *J. Food Protection.* 64: 1362-1368.
8. Hill, C., P.D. Cotter, R.D. Sleator and C.G.M. Gahan. 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int. Dairy J.* 12:273-283.
9. Sleator, R. and C. Hill. 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:49-71.
10. Wemekamp-Kamphuis, H.H., J. A. Wouters, R. D. Sleator, C. G. M. Gahan, C. Hill and T. Abee. 2002. Multiple deletion of the osmolyte transporters BetL, Gbu and OpuC of *Listeria monocytogenes* affects virulence and growth at high osmolarity. *Appl.*

Environ. Microbiol. 68:4710-4716.

11. Begley, M, C. Hill and CGM Gahan. 2002. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: Adaptation, cross-protection and identification of genetic loci involved in bile resistance. Appl. Environ. Microbiol. 68:6005-6012.
12. Gahan, C., and C. Hill. 2003. Relationship of stress adaptation and virulence in foodborne pathogenic bacteria. In: 'Microbial adaptation to stress and safety of new generation foods' (Yousef, A. E. and V. Juneja; Eds.). CRC Press, Florida, USA.
13. Begley, M, CGM Gahan and C. Hill. 2003. Identification and disruption of *btIA*, a locus involved in bile tolerance and general stress resistance in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 218:31-38.
14. Karatzas, K.A.G., J.A. Wouters, C.G.M. Gahan, C. Hill, T. Abee and M.H.J. Bennik. 2003. A single amino acid deletion in the glycine-rich region of CtsrR affects motility, piezotolerance and virulence of *Listeria monocytogenes* ScottA. Mol. Microbiol. 49:1227-1238.
15. Sleator, R. and C. Hill. 2003. A post-genomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 69:1-9.
16. Sleator, R., G. Francis, D. O'Beirne, C.G.M. Gahan, and C. Hill. 2003. Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. J. Appl. Microbiol. 95:829-845.
17. Cotter, P. and C. Hill. 2003. Surviving the acid test; responses of Gram-positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:429-453.
18. Rea, R., C. Gahan and C. Hill. 2004. Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. Infect. Immunity 72:717-727.
19. Begley, M., C.G.M. Gahan, M. Hintz, A-K. Kollas, C. Hill, H. Jomaa and M. Eberl. 2004. The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gamma-delta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. FEBS Letters 561:99-104.
20. Wemekamp-Kamphuis, H.H., R. D. Sleator, J. A. Wouters, C. Hill, and T. Abee. 2004. Molecular and Physiological Analysis of the Role of Osmolyte Transporters BetL, Gbu, and OpuC in Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2912-2918

### La PCR ¿ Complemento o alternativa a las técnicas clásicas de microbiología?

Teresa Aymerich <sup>1</sup>, Belén Martín <sup>1</sup>, Anna Jofré <sup>1</sup>, Margarita Garriga <sup>1</sup> y Marta Hugas <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>-IRTA.Centro de Tecnología de la Carne.Granja Camps i Armet s/n.17121. Monells.

<sup>2</sup>-Dirección actual. EFSA. Agencia de Seguridad Alimentaria Europea. 10 Rue de Gèneve. B-1140. Bruxelles.

#### Introducción

Los métodos rutinarios para la detección de microorganismos en alimentos se basan en técnicas de microbiología básica que implican el aislamiento y la identificación bioquímica de bacterias de los alimentos a partir de cultivo puro. La metodología utilizada suele ser larga, con una gran carga de trabajo y el coste total del ensayo elevado por la dedicación del personal implicado. En los últimos años, el extraordinario auge de la biología molecular ha conducido al desarrollo de técnicas que permiten la identificación rápida de microorganismos específicos a partir de cultivos puros, en caldos de enriquecimiento o directamente a partir del alimento, sin necesidad de aislarlos y/o potenciar su crecimiento diferencial. Entre estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta imprescindible, muy sensible, rápida y con un enorme potencial.

Mediante un diseño adecuado de cebadores, la PCR nos permite (i) detectar, identificar y cuantificar microorganismos patógenos y estudiar su origen mediante estudios epidemiológicos (Boyapalle, 2001; Johnson y col, 2001) (ii) detectar y cuantificar cultivos iniciadores, bioprotectores y probióticos, así como determinar sus propiedades de interés higiénico-sanitario y su trazabilidad (Vancanneyt y col, 2001; Fujiwara y col, 2001), y (iii) estudiar la biodiversidad microbiana en alimentos (Randazzo y col, 2002; Rantsiou y col, 2004).

#### Detección de microorganismos patógenos

El enriquecimiento, la selección y la identificación de *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *Campylobacter* por microbiología clásica pueden durar más de una semana, un tiempo excesivo cuando se requieren respuestas rápidas a brotes de toxiinfecciones alimentarias o en el análisis de alimentos de corta vida útil. El número de toxiinfecciones alimentarias se considera infravalorado porque la detección del agente etiológico por microbiología clásica no siempre es posible (Bean y col, 1990).

En los últimos años se ha llevado a cabo un importante esfuerzo por parte de la comunidad científica para establecer protocolos rápidos de PCR para la identificación de patógenos alimentarios (Rahn y col, 1992; Simon y col, 1996; Scheu y col, 1998; Nogva 2000 a y b; Hoofar y col, 2000). Se han realizado diversos estudios epidemiológicos mediante técnicas moleculares de PCR en *Campylobacter*, *Salmonella*, *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* (Jersek y col, 1999; Payne y col, 1999; Johnson y col, 2001; Radu y col, 2001).

La eficiencia y rapidez que supone la detección de patógenos y la determinación del foco infeccioso mediante técnicas de PCR en comparación con la microbiología clásica, junto con la preocupación de las autoridades sanitarias para su detección, mejorará considerablemente la detección del agente etiológico, permitirá una mejor valoración de los riesgos y una mejora de la seguridad. La implementación de las técnicas de PCR en los sistemas de análisis y control de puntos críticos mejorará cualitativamente la microbiología de los alimentos.

No obstante, los bajos recuentos de patógenos alimentarios que se encuentran normalmente en las diferentes matrices alimentarias no permiten desvincular la determinación de la presencia y/o ausencia del mismo de los métodos clásicos de cultivo y enriquecimiento. En matrices cármicas, la PCR cuantitativa tiene un límite de cuantificación de  $10^3$  ufc/g (Rodríguez y col, 2004). Sin embargo, cuando se combina con la técnica del número más probable pueden cuantificarse niveles inferiores a 10 ufc/g y con caldos de enriquecimiento pueden determinarse, perfectamente, la ausencia o la presencia del mismo. Es evidente que la integración de las técnicas de PCR a los métodos convencionales, aumentará el poder de resolución de las técnicas de diagnóstico microbiológico agilizando el tiempo dedicado al análisis.

#### Identificación de microorganismos de interés tecnológico, propiedades de interés higiénico-sanitario y trazabilidad.

La identificación de cepas de interés en la industria agroalimentaria considerando sus actividades o propiedades bioquímicas (biotipado) es larga y tediosa.

La identificación a nivel de especie mediante PCR específica es rápida y eficiente (Berthier y Ehrlich, 1998; Aymerich y col, 2003). Las huellas dactilares moleculares generadas por la aplicación de los perfiles de amplificación de fragmentos polimórficos al azar (RAPD) son rápidos, sensibles, eficientes para la identificación de las cepas y no necesitan información molecular previa (Berthier y Ehrlich 1999, Andrighetto y col. 2001). La valoración del potencial tecnológico e higiénico-sanitario (producción de bacteriocinas, capacidad de producción de aminos biógenos) es ágil y eficiente (Vancanneyt y col, 2001; Coton y col, 2004). Acoplada a las técnicas de DGGE, TGGE, secuenciación del 16S rRNA y ribotipado (Randazzo y col 2002; Rantsiou y col., 2004; Massi y col, 2004) es capaz de elucidar la variabilidad entre la microbiota presente.

#### La problemática actual de la aplicación de las técnicas de PCR.

En la actualidad, la PCR no es una técnica de uso general en microbiología de los alimentos por varias razones (i) el número de matrices alimentarias y de potenciales inhibidores de la reacción es muy variado (ii) en general, el número de patógenos suele ser reducido y viene acompañado de un elevado número de microorganismos banales (iii) la validación de los métodos aplicados y (iv) la normativa.

**A. Inhibidores de la reacción.** La composición físico-química del alimento, su estructura, la microbiota endógena y el proceso de extracción del ADN realizado son elementos decisivos y los inhibidores de la reacción de PCR asociados al mismo su mayor obstáculo. Ciertas sustancias que interfieran en la lisis celular; ADN inespecífico, ARNasas o ADNasas que degradan ácidos nucleicos y/o cebadores, sustancias quelantes de magnesio necesario para la reacción de PCR pueden inhibir total o parcialmente la amplificación (Rossen y col., 1992; Akane y col., 1994). Por tanto, la adición de controles internos de la reacción mediante la adición de un estándar de ADN exógeno que amplifique simultáneamente en una reacción de PCR a dos bandas (Cave *et al.*, 1994) es un requisito imprescindible para valorar el efecto de la hipotética presencia de inhibidores en las diferentes matrices alimentarias a estudio, descartando la presencia de falsos negativos. La PCR no puede tener un estatus de técnica de diagnóstico si no incluye, como mínimo, un control interno, un control positivo y uno negativo del proceso y un control de reactivos (blanco).

**B. Validación.** Para la aplicación estándar de la PCR a nivel de diagnóstico es indispensable la disponibilidad de métodos validados a nivel interlaboratorial, que aseguren su aplicabilidad con fiabilidad y sin optimización posterior por los laboratorios de análisis de alimentos. Los métodos alternativos estándar no deberían ser kits comerciales, sino fórmulas abiertas, donde la información de los genes diana y los reactivos fueran completamente asequibles.

En base a estas disposiciones se ha llevado a cabo un proyecto europeo "Validation and standardization of diagnostic polymerase chain reaction for detection of foodborne pathogens (FOOD-PCR, <http://www.pcr.dk>) que actualmente se halla en su segunda edición (FOOD-PCR 2) dentro de la red de excelencia MedVetNet (<http://www.medvetnet.org>). El objetivo principal del proyecto fue la transferencia tecnológica y la implementación de los métodos de PCR para la detección rutinaria de patógenos alimentarios a través de la armonización, estandarización y validación de los métodos a nivel europeo para los cinco microorganismos que originan mayores problemas a nivel alimentario (*Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica*, *Campylobacter spp.*, *L. monocytogenes* y *E. coli* (EHEC)). Las metodologías validadas se llevaron a cabo en un mínimo de 12 laboratorios distintos (entre los que ha colaborado el Centro de Tecnología de la Carne (IRTA)) para cada uno de los patógenos a estudio según los estándares de la norma ISO 16140:2002 y se elaboraron propuestas para la estandarización a nivel europeo con la CEN (Comisión Europea de Normalización).

Varias organizaciones de validación acreditadas, tales como AOAC (<http://www.aoac.org>) y Nordval (<http://www.nmkl.org/NordVal/NordVal.htm>) han certificado en estos últimos años algunos métodos alternativos de detección de patógenos alimentarios mediante PCR tales como (i) BAX system de Qualicon validado para *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* por l'AOAC, y para *Salmonella* en todos los alimentos por Nordval. (ii) Lightcycler de Roche validado para *Salmonella* por l'AOAC.

**C. Normativas.** Alemania dispone de las normas DIN 10134 y DIN 10135 para disposiciones generales de la aplicación de la PCR y detección de *Salmonella*, respectivamente y del método oficial LMBG L07.18-1 para *E. coli* VTEC. Los países nórdicos han dispuesto la norma NMKL 163:1998 para la detección de *Yersinia enterocolitica*. A nivel internacional (ISO), la normativa se encuentra en fase de elaboración y hasta el momento se han elaborado una serie de borradores para especificaciones generales, preparación de la muestra, amplificación y detección de los fragmentos amplificados por PCR convencional (ISO/DIS 22174:2002, ISO/DIS 20837:2004 y ISO/DIS 20838:2004, respectivamente).

El grupo de trabajo de la CEN en PCR (TC275/WG6/TAG3) opina que la técnica podrá ser usada a nivel de diagnóstico en el 2010 con el mismo estatus que los medios de cultivo tradicionales.

## Bibliografía

1. Andrighetto, C., Zampese L., y Lombardi A. 2001. Lett. Appl. Microbiol. 33:26-30.
2. Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S. y Kimura, K. 1994. J. Forensic Sci. 39: 362-372.
3. Aymerich, M.T., B. Martín, M. Garriga, y M. Hugas. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69:4583-4594
4. Bean, N. H., Griffin, P.M., Goulding, J. S. y Ivey, C. B. 1990. Morb. Mortal. Weekly Rep. 39: 15-57.
5. Berthier, F. y Ehrlich S.D. 1998. FEMS Microbiol. Lett. 161: 97-106.
6. Berthier, F. y Ehrlich S.D. 1999. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:997-1007.
7. Boyapalle S., Wesley I.V., Hurd H.S. y Reddy P.G. 2001. J. Food Protect. 64(9): 1352-61.
8. Cave, H., Mariani, P., Grandchamp, B., Elion, J. y Denamur, E. 1994. BioTechniques 16: 809-810.
9. Coton M., Coton E., Lucas P. y Lonvaud A. 2004. Food Microbiol. 21 (2):125-130.
10. Fleet G. H. 1999. Int. J. Food Microbiol. 50:101-117.
11. Fujiwara S., Seto Y., Kimura A., Hashiba H. 2001. J. Appl. Microbiol. 90(3): 343-52.
12. Jersek B., Gilot P., Gubina M., Klun N., Mehle J., Tcher N. y Herman L. 1999. J. Clin. Microbiol. 37(1):103-109.
13. Johnson J.R., Clabots C., Azar M., Boxrud D.J. y Besser J.R. 2001. J. Clin. Microbiol. 39(19): 3452-3460.
14. Hoofar J., Ahrens P y Radström. 2000. J. Clin. Microbiol. 38(9): 3429-3435.
15. Massi M., Vitali B., Federici F., Matteuzzi D. y Brigidi P. 2004. J. Appl. Microbiol. 96(4):777-786.
16. Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A. y Rudi, K. 2000a. Appl. Env. Microbiol. 66, 4029-4036.
17. Nogva, H. K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A. y Lillehaug, D. 2000b. Appl. Env. Microbiol. 66, 4266-4271.
18. Payne R.E., Lee M.D., Dreesen D.W. y Barnhart H.M. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65(1):260-263.
19. Radu S., Ling O.W., Rusul G., Karim M.I., Nishibuchi M. 2001. J. Microbiol. Methods 46(2):131-139.

20. Rahn, K., De Grandis S.S., Clarke R.C., Mc Ewen S.A., Galán J.E., Ginocchio C., Curtiss R. y Gyles C.L. 1992. *Mol. Cell. Probes* 6:271-279.
21. Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. y Vaughan E.E. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1882-1892.
22. Rantsiou K., Comi G y Cocolin L. 2004. *Food Microbiol.* 21(2):481-487.
23. Rodríguez-Lázaro D., Jofré A., Aymerich T., Hugas M. y Pla M. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* Aceptado.
24. Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. & Rasmussen, O. F. 1992. *Int J. Food Microbiol.* 17, 37-45.
25. Scheu, P.M., Berghof K., and Stahl U. 1998. *Food Microbiol.* 15:13-31.
26. Simon M.C, Gray D.I. y Cook N. 1996. *Appl. Environ. Microb.* 62:822-824.
27. Vancanneyt, M., A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K. J. Björkroth, C. M. A. P. Franz, M. R. F. Moreno, H. Revets, L. De Vuyst, J. Swings, K. Kersters, F. Dellaglio, and W. H. Holzapfel. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1381-1391.

## Aplicación de métodos basados en las técnicas de PCR y NASBA a tiempo real en distintas matrices alimentarias

David Rodríguez-Lázaro  
INTEA. Universidad de Girona

La presencia de microorganismos patógenos en alimentos es un problema importante en salud pública. Actualmente, las toxiinfecciones producidas por los mismos son una de las causas principales de enfermedad en los países desarrollados. Por tanto, hoy día se aplican controles microbiológicos dentro de los programas de aseguramiento de la calidad alimentaria como premisa para minimizar el riesgo de infección de los consumidores. Los métodos microbiológicos clásicos requieren, en general, el uso de pre-enriquecimiento(s) no-selectivo(s), enriquecimiento(s) selectivo(s), aislamiento en medio selectivo y la confirmación posterior usando pruebas basadas en la morfología, bioquímica y serología propia de cada uno de los microorganismos objeto de estudio. Estos métodos son laboriosos, requieren un largo proceso para obtener resultados definitivos y, además no siempre pueden realizarse. Para solucionar estos inconvenientes se han desarrollado distintas metodologías alternativas que permiten la detección, identificación y cuantificación de microorganismos patógenos de origen alimentario, entre las que destacan los métodos inmunológicos y moleculares. En esta última categoría, la técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés *polymerase chain reaction*) se ha convertido en la técnica diagnóstica más utilizada en microbiología. Recientemente, se ha introducido una mejora, la PCR a tiempo real, que ha producido una segunda revolución en la metodología diagnóstica molecular, como puede deducirse por el número creciente de publicaciones científicas que emplean dicha técnica y la aparición continua de nuevos kits comerciales basados en la misma. La PCR a tiempo real es una técnica altamente sensible –detección de hasta una molécula en la reacción- que permite la cuantificación exacta de secuencias de ADN específicas de un determinado microorganismo. Además, otras ventajas que favorecen su implantación en laboratorios de análisis de alimentos son su rapidez, sencillez y el formato en tubo cerrado que evita contaminaciones post-PCR y favorece la automatización y un alto rendimiento.

Cuando se emplean métodos moleculares basados en la técnica de PCR para la detección de microorganismos presentes en los alimentos, se utiliza generalmente el ADN como diana de amplificación. Sin embargo, el ADN no es un buen indicador de la viabilidad celular ya que persiste durante períodos largos tras producirse la muerte celular. Además, los métodos que emplean un enriquecimiento previo de la muestra pueden producir errores en el recuento de microorganismos lesionados subletalmente o que se encuentran en un estado viable pero no cultivable (VBNC), ya que los medios selectivos que se emplean pueden inhibir el crecimiento a colonias visibles de las bacterias que se encuentran en estas circunstancias. Sin embargo los microorganismos en dichas circunstancias conserban la capacidad de provocar brotes de toxiinfecciones de origen alimentario. Por lo tanto, aunque la PCR es una técnica ampliamente empleada en los laboratorios de análisis, en algunas circunstancias puede ser deseable la detección de ARN, ya que éste puede ser un indicador adecuado de la presencia de células viables. Además, la detección, en particular, de ARN mensajero (ARNm) de genes de virulencia es más relevante para estudios de salud pública que la detección del mismo gen, ya que únicamente las células capaces de expresar este gen de virulencia pueden constituir un peligro potencial para la salud. Una modificación de la PCR, la RT-PCR (del inglés *reverse transcription PCR*), puede amplificar ARN, pero sin embargo, tampoco es capaz de discriminar entre microorganismos viables y no viables de una manera totalmente eficaz, ya que es necesario para ello la eliminación completa de cualquier traza de ADN, ya que éste último también puede ser amplificado simultáneamente mediante esta técnica. En consecuencia, en la última década se ha empezado a utilizar métodos basados en la técnica NASBA (del inglés *nucleic acid sequence-based amplification*) como herramientas diagnósticas en microbiología de los alimentos. Esta técnica molecular está basada en una reacción continua de amplificación de ARN en condiciones isotérmicas. A diferencia de la RT-PCR, esta técnica puede amplificar ARN de una manera específica, aún existiendo también ADN en la muestra. Esta característica le confiere la posibilidad de detectar, de una forma inequívoca y sencilla, microorganismos viables ya que la presencia de ARN puede ser utilizada como indicador de la viabilidad celular. Sin embargo, no todos los tipos de ARN son adecuados como indicadores de la viabilidad celular, ya que en el caso, por ejemplo, del ARN ribosomal (ARNr), los ribosomas bacterianos son estables al menos 48 horas tras la muerte celular. Por lo tanto, únicamente el ARNm es la diana ideal como indicador de la viabilidad celular así como de su estado metabólico y de la presencia de microorganismos patogénicos en estado VBNC. Por otro lado, el progreso de la reacción puede también monitorizarse a tiempo real mediante el empleo de sondas fluorescentes (p.ej. *molecular beacons*), con lo que tampoco se necesita una manipulación posterior del producto amplificado, reduciéndose considerablemente el riesgo de contaminación así como el tiempo de procesado. Además, al ser un procedimiento a tiempo real, se puede conocer la cinética de la reacción y establecer estrategias para la cuantificación de manera similar a la sugerida para los sistemas de PCR a tiempo real.

Por otro lado, la eficiencia de los métodos moleculares puede estar influenciada negativamente por la presencia de sustancias inhibidoras presentes en las matrices alimentarias, que pueden interferir e incluso inhibir completamente la reacción de amplificación, y consecuentemente producir tanto la subestimación de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra alimentaria como la producción de falsos negativos. Por tanto, para la implantación de métodos moleculares como herramientas diagnósticas en laboratorios de microbiología de los alimentos, es fundamental el desarrollo de procedimientos adecuados de preparación de las muestras, ya que este paso previo puede ser crucial para la robustez y funcionamiento de los mismos. El objetivo del procesado de la muestra previo a la reacción de amplificación es la transformación de las muestras alimentarias

en muestras amplificables por medio de (i) la homogenización de la muestra; (ii) el incremento de la concentración de los microorganismos estudiados a rangos operativos adecuados; y (iii) la reducción o exclusión de sustancias inhibidoras de la amplificación. Como las muestras alimentarias varían en homogeneidad, consistencia, composición y microbiota acompañante, estos procedimientos deberían ser adaptados a cada matriz alimentaria. Si se aplica únicamente un enriquecimiento previo se puede alcanzar una doble ventaja: por un lado el incremento potencial del número de bacterias estudiadas y la disminución de las sustancias inhibidoras, y por otro, la detección únicamente de los microorganismos que hayan sido capaz de crecer en dicho medio, es decir, los microorganismos viables. Además este procedimiento es simple y económico. Sin embargo, existen medios de cultivo que poseen inhibidores de la amplificación y además, y especialmente, tras el pre-enriquecimiento la cuantificación no es posible. Por ello, seguramente, la aproximación más racional para la preparación de la muestra sea la combinación de varios procedimientos de procesado de la muestra, generalmente procedimientos físicos combinados con la extracción de los ácidos nucleicos. Las ventajas que se consiguen son que los resultados se obtienen de una forma más rápida que cuando se emplea un pre-enriquecimiento previo y, especialmente, que la cuantificación todavía puede ser posible. Sin embargo éstos son más caros y difíciles de realizar.

Otro aspecto fundamental es un adecuado control de la eficiencia de la reacción de amplificación. En este sentido, la aplicación de controles internos de amplificación (IAC) puede permitir la interpretación y valoración de los resultados diagnósticos de las técnicas moleculares. Un IAC es un ácido nucleico quimérico que se añade a la reacción para ser co-amplificado por los mismos *primers* que el ácido nucleico diana. La amplificación del mismo indicará si la eficiencia de la reacción es adecuada, mientras que la no amplificación del mismo junto con la ausencia de señal para el microorganismo estudiado indicará que se ha producido un resultado falso negativo. Además, si la detección del IAC se realiza mediante técnicas moleculares a tiempo real, el aseguramiento de la inhibición de la amplificación es mayor ya que puede evaluarse cuantitativamente (mediante la comparación de los valores obtenidos y los teóricos o esperados de IAC).

En conclusión, a causa de los problemas actuales relacionados con las toxiinfecciones de origen alimentario, es necesario el desarrollo y mejora de métodos moleculares de diagnóstico y tipado de microorganismos patogénicos de origen alimentario. Estas herramientas ofrecen una alta versatilidad ya que pueden reducir de una forma considerable los problemas originados de la presencia de resultados erróneos (falsos negativos y positivos) y permiten una alta automatización que favorece un alto rendimiento (análisis de hasta 384 muestras por reacción), a la vez que presentan una elevada sensibilidad en el procesado de distintas matrices alimentarias de diferente procedencia y con una naturaleza muy heterogénea y una excelente especificidad entre cepas bacterianas que están estrechamente relacionadas filogenéticamente, además de una gran rapidez en la obtención de los resultados si se emplean métodos moleculares a tiempo real. Por todo ello, los métodos moleculares basados en técnicas como la PCR o NASBA constituyen una alternativa que puede sustituir o complementar a los métodos de referencia en el diagnóstico microbiológico, al mismo tiempo que puede facilitar resultados más rápidos y precisos, e incluso, en el caso de las técnicas moleculares basadas en la técnica NASBA, detectar y cuantificar específicamente microorganismos viables.

## Técnicas de ácidos nucleicos para la detección y selección de mohos y levaduras de interés en alimentos

J.J. Córdoba, M. J. Andrade, B. Sánchez, A. Martín\*, E. Aranda\*, M.G. Córdoba\*, M. Rodríguez.

Higiene de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Cáceres.

(\*)Nutrición y Bromatología. Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Badajoz.

### Introducción

Las condiciones de temperatura y humedad relativa que se alcanzan en algunos alimentos durante los procesos de maduración o fermentación favorecen el desarrollo de una abundante población fúngica. El desarrollo de mohos en la superficie de alimentos madurados como productos cárnicos crudos-curados tiene un efecto beneficioso derivado de la acción que ejercen como barrera frente al secado excesivo y a la oxidación de la grasa, así como por su actividad proteolítica (Rodríguez y col., 1998; Ordóñez y col., 1999; López-Díaz y col., 2001; Córdoba y col., 2002; Martín y col., 2002), que influyen positivamente en las características sensoriales del producto acabado. Sin embargo, la mayoría de las especies encontradas en estos productos son toxigénicas (Rojas y col., 1991; Núñez y col., 1996; Núñez y col. 2000; Sosa y col., 2002). Las levaduras han mostrado un papel relevante en la generación de compuestos volátiles responsables del aroma de alimentos fermentados y madurados. Sin embargo, entre las levaduras puede haber cepas alterantes capaces de originar defectos en el aroma o coloraciones anómalas (Loureiro y Querol, 1999).

El control de mohos toxigénicos y levaduras alterantes en este tipo de productos, así como la selección de mohos y levaduras para su utilización como cultivos iniciadores fúngicos requiere disponer de métodos sensibles y razonablemente rápidos que permitan diferenciar a los microorganismos seleccionados de cepas de mohos toxigénicos y de levaduras alterantes. Estos métodos deberían ser aplicables a la vigilancia en el sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC). La diferenciación de mohos y levaduras por métodos convencionales requiere, el cultivo del moho o de la levadura en medios apropiados para la caracterización mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas y determinar la capacidad de síntesis de micotoxinas o de compuestos volátiles, por procedimientos sensibles tales como HPLC-MS y GC-MS. Todo esto supone un excesivo tiempo de análisis y un elevado coste que lo haría inviable para la vigilancia en APPCC. Las técnicas de ácidos nucleicos son una posible alternativa en la diferenciación rápida de mohos y levaduras de interés en alimentos.

### Detección de mohos toxigénicos mediante técnicas de ácidos nucleicos

El conocimiento de genes relacionados con las síntesis de determinadas micotoxinas ha permitido el diseño de protocolos de PCR o sondas de ADN para la detección de mohos productores de toxinas, tales como aflatoxinas y esterigmatocistina (Shapiro y col., 1996; Fäber y col., 1997), ocratoxina A y citrinina (Edwards y col., 2002), Pr toxin (Geisen, 1998) y patulina (Paterson y col., 2000). Cuando no se conocen los genes relacionados con la síntesis de la micotoxina se puede recurrir a alternativas tales como la elaboración de una biblioteca de ADN genómico, que permita la detección de ADN relacionado con su síntesis, que posteriormente será utilizado para el diseño de sondas o cebadores (Feng y col., 1992; Aranda y col., 2002). Con este procedimiento se ha elaborado una sonda de ADN para la detección de *P. polonicum* productor de verrucosidina, aislado con frecuencia en productos cárnicos (Aranda y col., 2002).

La amplificación mediante RAPD-PCR usando cebadores inespecíficos o aleatorios de diversos fragmentos de ADN, permite obtener perfiles genéticos que puede igualmente ser utilizados para la diferenciación de aislamientos de mohos (Dupont y col., 1999; Geisen y col., 2001). Recientemente se ha demostrado que existe correlación entre perfiles genéticos obtenidos por RAPD-PCR y la producción de micotoxinas en mohos (Geisen y col., 2001; Lund y col., 2003). En nuestro laboratorio se ha optimizado un procedimiento de RAPD-PCR utilizando el cebador GO2 con el que se obtienen perfiles genéticos diferentes para las especies de mohos más frecuentemente aisladas en alimentos (Martín y col., 2004). Los perfiles de bandas obtenidos muestran una elevada correlación con el análisis de metabolitos secundarios analizados por electroforesis capilar micelar; lo cual permite que el método RAPD-PCR pueda ser considerado, además de para la diferenciación de aislamientos a nivel de especie, para distinguir entre cepas toxigénicas y no toxigénicas.

### Diferenciación de levaduras de interés en alimentos mediante técnicas de ácidos nucleicos

La diferenciación de levaduras puede realizarse con el análisis de perfiles genéticos obtenidos a partir del 18 S y de la secuencia de espaciadores internos que se transcriben (ITS) (internal transcriber spacers) (Esteve-Zarzoso y col., 1999; Granchi y col., 1999; Capece y col., 2003). La amplificación por PCR y posterior análisis con enzimas de restricción de los fragmentos 18 S e ITS ha permitido la diferenciación a nivel de especie y cepa de diferentes levaduras, fundamentalmente del género *Saccharomyces* (Esteve-Zarzoso y col. 1999; Petersen y col. 2001). Sin embargo, la utilización de estos métodos con las especies de levaduras más frecuentemente aisladas de alimentos sólo permite la diferenciación a nivel de especie en alguno de los casos (Tabla I).

El análisis de restricción del ADN mitocondrial, permite obtener perfiles genéticos con los que puede incluso diferenciarse cepas de una misma especie, tal y como se ha realizado con levaduras vínicas (Querol y col., 1992). Cuando esta técnica ha sido ensayada con cepas de las levaduras más frecuentemente aisladas en alimentos se observaron, en general, diferencias tanto a nivel de especie como de cepa (Tabla I).

Especie (nº cepas)	ITS		18 S		RAPD MI3		RAPD GACA <sub>4</sub> , GAC <sub>5</sub> , GTG <sub>5</sub>		ADN mitocondrial	
	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C
<i>Candida zeylanoides</i> (5)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i> (5)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> (5)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia carsonii</i> (5)	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (5)	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (5)	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

**Tabla 1. Diferenciación a nivel de especie (E) y cepa (C) de los diferentes métodos de ácidos nucleicos probados en levaduras. (+) alta capacidad de diferenciación, (-) no diferencia.**

Con la técnica RAPD-PCR utilizando cebadores mini y microsatélites se ha logrado diferenciar a nivel de cepa aislamientos de determinadas especies de levaduras (Vasdinyei y Deák, 2003). Con el objetivo de buscar diferencias a nivel de aislamientos se han optimizado varios protocolos de RAPD-PCR con los minisatélites MI3 y (GACA)<sub>4</sub> y los microsatélites (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub>. Con el cebador MI3 no se consigue agrupar adecuadamente a nivel de especie y cepa los aislamientos de las levaduras más frecuentemente aisladas en alimentos (Tabla 1). Sin embargo, los perfiles genéticos obtenidos con los cebadores (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub> sí permiten diferenciar estas especies de levaduras hasta el nivel de cepa (Tabla 1).

### Conclusiones

La elaboración de una biblioteca de ADN genómico y la posterior selección de material genético relacionado con la síntesis de micotoxinas es un procedimiento adecuado para la elaboración de sondas o cebadores para la detección sensible mediante hibridación o por PCR de mohos toxigénicos.

El método de RAPD-PCR es una herramienta alternativa a la PCR o la hibridación con sondas, para la diferenciación de mohos toxigénicos de los utilizados como cultivos iniciadores. Estos métodos deben ser incorporados en la vigilancia de mohos toxigénicos en sistemas APPCC.

La utilización conjunta del análisis de restricción del ADN mitocondrial y el RAPD-PCR con el minisatélite (GACA)<sub>4</sub> y los microsatélites (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub> permiten diferenciar levaduras a nivel de cepa, lo cual puede ser utilizado para la tipificación de levaduras de interés en alimentos.

### Agradecimientos

Las investigaciones del grupo en el tema objeto de la ponencia han sido subvencionadas con el proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología AGL01-0804.

### Bibliografía

- Aranda, E.; Rodríguez, M., Benito, M.J., Asensio, M.A. y Córdoba, J.J. 2002. Int. J. Food Microbiol. 76, 55-61.
- Capece, A., Salzano, G. y Romano, P. 2003. Int. J. Food Microbiol. 84, 33-39.
- Córdoba, J.J., Núñez, F. y Asensio, M.A. 2002. Ed. F.Toldrá. Ed. Research Signpost. Kerala, India. pp. 310-325.
- Dupont, J., Magnin, S., Marti, A. y Brousse, M. 1999. Int. J. Food Microbiol. 49, 109-118.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. 1999. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 329-337.
- Edwards, S. G., O'Callaghan, J. y Dobson, D.W. 2002. Mycol. Res. 106, 1005-1025.
- Fäber, P., Geisen, R. y Holzapfel, W.H. 1997. Int. J. Food Microbiol. 36, 215-220.
- Feng, G.H., Chu, F.S., Leonard, T.J. 1992. Appl. Environm. Microbiol. 58, 455-459.
- Geisen, R. 1998. Eds. P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy and R.P. Elander: CAB Publishing, Wallingford. Reino Unido, pp. 243-266.
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzapfel, W.H. y Jakobsen, M. 2001. Int. J. Food Microbiol. 65, 183-191.
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A. y Vincenzini, M. 1999. J. Appl. Microbiol. 87, 949-956.
- Loureiro, V. y Querol, A. 1999. Trends Food Sci. Tech. 10, 356-365.
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., García-López, M.L. y Otero, A. 2001. Int. J. Food Microbiol. 68, 69-74.
- Lund, F., Nielsen, A.B. y Skouboe, P. 2003. Food Microbiol. 20, 725-734.
- Martín, A., Asensio, M.A., Bermúdez, M.E., Córdoba, M.G., Aranda, E. y Córdoba, J.J. 2002. Meat Sci. 62, 129-137.
- Martín, A., Jurado, M., Rodríguez, M., Núñez, F. y Córdoba, J.J. 2004. J. Food Prot. En prensa.
- Núñez, F., Rodríguez, M., Bermúdez, M.E., Córdoba, J.J. y Asensio, M.A. 1996. Int. J. Food Microbiol. 32, 185-197.
- Núñez, F., Díaz, M.C., Rodríguez, M., Aranda, E., Martín, A. y Asensio, M.A. 2000. J. Food Prot. 63, 231-236.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M. y De la Hoz, L. 1999. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 39, 329-367.

- Paterson, R.R.M., Archer, S., Kozakiewicz, Z., Lea, A., Locke, T. y O'Grady, E. 2000. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 509-512.
- Petersen, K.M., Moller, P.L. y Jespersen, L. 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 11-24.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, E. 1992. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
- Rodríguez, M.M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, E. y Asensio, M.A. 1998. *J. Appl. Microbiol.* 85, 905-912.
- Rojas, F.J., Jodral, M., Gosalvez, F. y Pozo, R. 1991. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 329-335.
- Shapiro, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A. y Solomon, R. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3270-3273.
- Sosa, M.J., Córdoba, J.J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Asensio, M.A. y Núñez, F. 2002. *J. Food Prot.* 65, 988-992.
- Vasdinyei, R. y Deák, T. 2003. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 123-130.

## MESA REDONDA IV

### La seguridad vírica de los alimentos

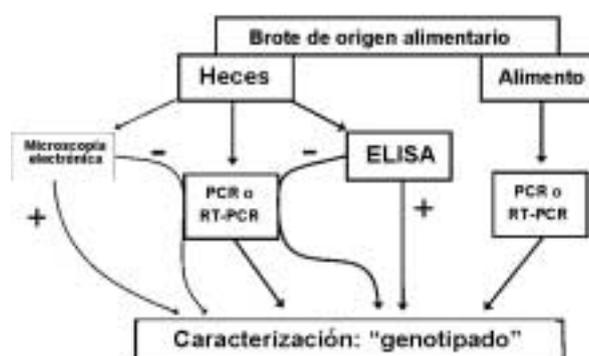
Albert Bosch, F. Xavier Abad, M. Isabel Costafreda, Rosa M. Pintó  
 Virus Entèrics, Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona

Los virus constituyen uno de los principales problemas en seguridad alimentaria, y ello ha favorecido que en las últimas décadas se hayan llevado a cabo avances técnicos que han permitido el desarrollo de sistemas de detección aptos para virus cultivables y virus no cultivables. El término virus entérico se refiere a cualquier virus susceptible de ser transmitido por la vía fecal-oral y por lo tanto a través de la ingestión de alimentos contaminados. De entre los virus entéricos destacan el virus de la hepatitis A, asociado a brotes de hepatitis transmitidas por alimentos, los rotavirus, como la causa individual más importante de gastroenteritis infantil, y los norovirus, como los agentes más habituales de diarreas de transmisión alimentaria.

**Tabla I.** Virus entéricos humanos potencialmente transmisibles por alimentos.

Género	Nombre vulgar	Enfermedad causada
Enterovirus	Polio	Parálisis, meningitis, fiebre
	Coxsackie A, B	Herpangina, meningitis, fiebre, cuadro respiratorio, enfermedad de mano, pié y boca, miocarditis, anomalías cardíacas
	Echo	Meningitis, fiebre, cuadro respiratorio, erupciones, gastroenteritis
Hepatovirus	Hepatitis A	Hepatitis
Reovirus	Reovirus humano	Desconocida
Rotavirus	Rotavirus humano	Gastroenteritis
Mastadenovirus	Adenovirus humano	Gastroenteritis, cuadro respiratorio, conjuntivitis
Norovirus	Norwalk-like	Gastroenteritis
Sapovirus	Sapporo-like	Gastroenteritis
Hepevirus	Hepatitis E	Hepatitis
Mamastrovirus	Astrovirus humano	Gastroenteritis
Parvovirus	Parvovirus humano	Gastroenteritis
Coronavirus	Coronavirus humano	Gastroenteritis, cuadro respiratorio
Torovirus	Torovirus humano	Gastroenteritis

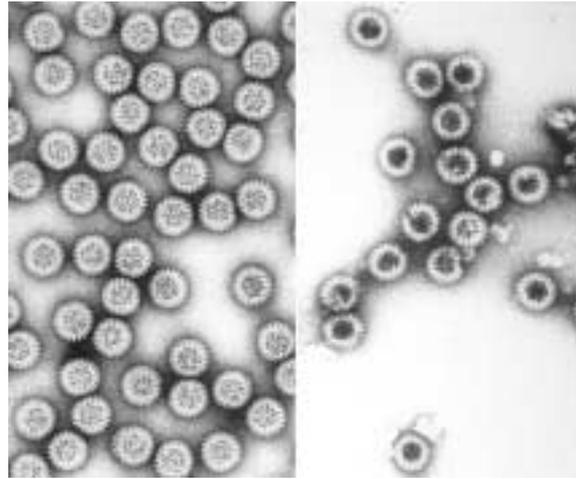
Es importante determinar los agentes causales de los brotes alimentarios y si es posible llegar a su caracterización genotípica. Para ello es necesario disponer de sistemas de diagnóstico adecuados para ser empleados en muestras clínicas, y también en alimentos. En la figura 1 se muestran los pasos a seguir en la investigación virológica de un brote de gastroenteritis. El diagnóstico virológico a partir de las heces de un individuo afectado puede realizarse por diversas metodologías tales como observación al microscopio electrónico, técnicas inmunoenzimáticas o, sobre todo por PCR o RT-PCR.



**Figura 1.** Investigación virológica de un brote de gastroenteritis de origen alimentario.

No obstante para la detección de patógenos víricos en muestras alimentarias se requiere de sistemas de diagnóstico de muy elevada sensibilidad, por lo que en la práctica estamos obligados al uso de técnicas de amplificación molecular. Dentro de lo posible es importante conseguir la caracterización del virus responsable del brote, lo que suele realizarse a través del análisis de la secuencia de los amplímeros obtenidos por PCR, o RT-PCR.

No es viable, tanto desde el punto de vista técnico como económico, llevar a cabo la detección de virus en el producto final para garantizar la seguridad virológica de un alimento. En estos casos, es más correcto abordar el problema de forma que pueda asegurarse que, en caso de que hubiera algún virus, éste fuera inactivado y/o eliminado con un tratamiento adecuado del producto. Para este fin pueden utilizarse virus modelo, o trazadores del comportamiento de los patógenos víricos. En este último caso, el uso de trazadores moleculares constituye una aproximación aplicable directamente en muestras alimentarias, ya que al no constituir ningún tipo de riesgo sanitario pueden añadirse al alimento para validar el proceso utilizado para eliminar virus contaminantes. La figura 3 muestra micrografías electrónicas de rotavirus humanos y de partículas virus-like recombinantes de rotavirus. Puede apreciarse la gran similitud entre los patógenos víricos y los trazadores moleculares. Estos últimos son permeables al ácido fosfotúngstico al ser partículas vacías, totalmente inócuas.



**Figura 2.** Izquierda: Micrografía electrónica de partículas de rotavirus humanos. Derecha: partículas de rotavirus recombinantes VP2/VP7 producidas en células de insecto mediante el sistema baculovirus.

Existe una serie de alimentos, tales como moluscos bivalvos, fresas, frambuesas o verduras en general, que están más habitualmente relacionados con brotes víricos que otro tipo de alimentos. No obstante, es frecuente que sea una mala manipulación la causante de la contaminación del alimento con virus de transmisión fecal-oral. En cualquier caso, la frecuencia con la que se describen brotes de infecciones víricas transmitidas por alimentos nos obliga a adoptar una serie de medidas preventivas. Para ello debe tenerse en cuenta que los patógenos víricos transmitidos por alimentos están en continua evolución, y que de hecho emergen nuevos agentes transmitidos por productos alimentarios. Los mecanismos de control para garantizar la seguridad de los alimentos deben adecuarse en todo momento para responder a estos nuevos retos. Para ello debemos por un lado disponer de sistemas de diagnóstico aplicables a muestras alimentarias válidos para la detección de los patógenos relevantes, y por otro llevar a cabo validaciones de los procesos realizados para eliminar la presencia de virus, en general, en alimentos susceptibles de estar contaminados con este tipo de patógenos.

## Marco legal para garantizar la calidad sanitaria de los moluscos destinados a consumo humano

M.D. Furones y J. Diogène.

Centre d'Aqüicultura, IRTA, Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)

Los moluscos bivalvos son una fuente importante de proteína, siendo España uno de los principales productores y consumidores mundiales, fundamentalmente de mejillón. Estos organismos pueden proceder tanto de bancos naturales, como de sistemas de acuicultura, bien sea de cultivo en fondo (parques) o cultivos en suspensión (bateas y long-lines), que son los mayoritarios.

Independientemente del origen del producto (producción acuícola o extracción de banco natural) las zonas de crecimiento son siempre ambientes con elevada carga de nutrientes y material particulado, imprescindibles para poder soportar las demandas fisiológicas de los bivalvos, que se alimentan mediante filtración del material en suspensión que hay en el agua. Ello hace que acumulen en su interior sustancias y microorganismos potencialmente dañinos para sus depredadores, en el caso que nos interesa, los humanos. Estas sustancias acumuladas o retenidas pueden ser de origen abiótico (metales pesados, fitosanitarios, hidrocarburos) o de origen biótico (microorganismos, bacterias, virus, bacteriófagos, fitopláncton tóxico y toxinas).

El hecho de que los bivalvos habitualmente se coman completos (vísceras y sistema digestivo) y crudos o poco cocinados, hace que el factor de riesgo para la alimentación humana se incremente de una manera muy notable, siendo de los productos que conllevan un mayor riesgo alimentario. Ello se conoce desde la antigüedad e incluso están documentadas prohibiciones de su consumo en determinadas culturas y épocas. La epidemiología ha relacionado en múltiples ocasiones brotes de enfermedades con el consumo de bivalvos (Richards, 2003). Con los avances en las medidas de control de los alimentos se han ido poniendo a punto sistemas para asegurar la calidad sanitaria de los distintos productos alimentarios que llegan al consumidor, y esto también ha afectado a los bivalvos.

En el caso de los bivalvos, los sistemas de control sanitario deben establecerse vinculados a las condiciones ambientales específicas y a las dinámicas espacio-temporales de las zonas donde crecen los organismos. A estas zonas se les exige legalmente que cumplan una serie de requisitos para poder ser "zonas de producción" explotables para el consumo humano. Diferentes países han establecido sistemas de seguimiento y control de las zonas de producción obedeciendo a distintas estrategias, pero todas ellas se basan fundamentalmente en el conocimiento y la documentación de una serie de factores de riesgo principales tanto abióticos como bióticos.

Los factores bióticos fluctúan en el tiempo y en el espacio y ello conlleva variaciones en los valores obtenidos de los distintos parámetros, que pueden llegar a sobrepasar los límites legales. Los sistemas de monitorización, para garantizar la calidad sanitaria, intentan gestionar estas variaciones para poder poner en marcha medidas de precaución que eviten que salga al mercado producto con valores que superen los límites legales.

Ciñiéndonos a las prescripciones de la legislación comunitaria (Directivas 91/492/EEC y 97/61/EEC) y a la normativa española traspuesta (RD 571/99 y 345/93, éste último derogado parcialmente), la administración establece una demarcación de las aguas costeras en "zonas de producción" que deben ser definidas en relación a sus límites geográficos, a las especies presentes en las mismas, y a las condiciones hidrográficas. Asimismo, se deben identificar la/s especie/s de referencia para cada una de las zonas (generalmente las mayoritarias). También están establecidos los parámetros a seguir y la metodología recomendada a utilizar. La frecuencia del muestreo sólo se especifica, para algunos parámetros, en el RD 345/93.

### Seguimiento del fitopláncton tóxico y biotoxinas marinas

Entre la comunidad fitoplanctónica, que es una de las principales fuentes de alimento de los bivalvos, pueden producirse proliferaciones de especies potencialmente productoras de biotoxinas marinas. Dichas proliferaciones no son generalmente previsible y tampoco obedecen a patrones espacio-temporales establecidos. Ello hace que se requiera una monitorización de las comunidades fitoplanctónicas, con la finalidad de conocer la presencia de organismos tóxicos y sus densidades. Habitualmente se conocen las especies indicadoras de toxicidad más comunes en cada zona y los niveles de riesgo para la aparición de biotoxinas en los organismos que crecen en las zonas.

Las biotoxinas marinas contempladas actualmente en la legislación Española son: la "Toxina Diarreica de los Moluscos" (DSP), la "Toxina Paralizante de los Moluscos" (PSP) y la "Toxina amnésica de los Moluscos" (ASP). Para cada una de ellas están establecidos niveles y métodos de referencia para su detección. Para la PSP y la DSP el sistema de detección de referencia es el bioensayo en ratón, mientras que la detección de ASP se lleva a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Para que el producto pueda ser comercializado, en 100 grs. de carne los niveles de PSP no deben sobrepasar los 80 microgramos de equivalentes de Saxitoxina, la DSP no debe ser detectable y la ASP debe estar por debajo de los 20 microgramos.

El sistema de seguimiento para las biotoxinas marinas tiene, por lo tanto, 2 vertientes vinculadas íntimamente: se precisa conocer cualitativa y cuantitativamente la presencia de especies de fitoplancton potencialmente productoras de toxinas en el agua de las zonas de producción (determinación mediante contajes celulares al microscopio óptico) y por otra parte, se requiere la determinación de los niveles de las biotoxinas marinas legisladas en la carne de los bivalvos de las mismas zonas.

Combinando este doble seguimiento, se establecen protocolos de actuación dirigidos a gestionar la comercialización del producto, de tal manera que las zonas permanecen "abiertas" cuando no hay toxinas en los bivalvos y "cerradas" cuando las hay en niveles superiores a los límites legales. Habitualmente, los protocolos contemplan estatus intermedios de alerta para las situaciones de transición, en las cuales se identifica fitopláncton tóxico en el agua de la zona sin que se registren niveles de toxinas en carne por encima de los permitidos. Ello implica una intensificación en los muestreos. Cuando una zona de producción ha estado cerrada por presencia de toxinas, sólo puede ser reabierta cuando los niveles vuelvan a estar por debajo de los límites legales. En estas fases de reapertura se observa muy detalladamente la evolución de los organismos productores de toxinas antes de reabrir la zona.

Existe también la posibilidad de llevar a cabo cierres precautorios para situaciones en las que no se puede disponer de datos de niveles de biotoxinas en un momento determinado y el fitoplancton indique una situación de alerta.

### Seguimiento microbiológico de las zonas de producción

La normativa exige que las zonas de producción estén catalogadas en A, B y C en función de la calidad microbiológica de las mismas, lo que se hace utilizando coliformes fecales o *Escherichia coli* como organismos indicadores. Éstos son cuantificados mediante el método del número más probable, en series de 5 tubos y tres diluciones, utilizando la vianda de los organismos como matriz. Los criterios de clasificación son:

Zona A: Aquella en la que los niveles de coliformes fecales son inferiores a 300 o los niveles de *E. coli* no superan los 230 en 100 grs. de carne. El producto puede ir directamente a un centro de expedición y ser empaquetado para consumo humano.

Zona B: Aquella en la que los niveles de coliformes fecales son iguales o inferiores a 6.000 o los niveles de *E. coli* son iguales o inferiores a 4.600 en 100 grs. de carne. El producto debe ser enviado a depurar (generalmente 24 horas).

Zona C : Aquella en la que los niveles de coliformes fecales son iguales o inferiores a 60.000 en 100 grs. de carne. El producto no puede ser enviado a depuración, sino que debe reinstalarse en una zona de aguas limpias durante un periodo no inferior a 2 meses, al cabo del cual debe ser re-evaluado.

En base a muestreos periódicos de las especies de referencia en las distintas zonas de producción, las administraciones elaboran la clasificación de las mismas para su posterior publicación en el Boletín Oficial del Estado (Orden APA/1029/2003). Estas clasificaciones deben ser revisadas periódicamente aunque la periodicidad no está fijada legalmente.

Hay que tener en cuenta que la clasificación microbiológica de las zonas de producción no constituye más que un primer nivel de control, ya que el producto que sale de éstas debe ir o bien a centros de expedición o bien a centros de depuración para ser sometido a posteriores análisis donde además de la revisión de los niveles de *E. coli* o coliformes fecales, se deben realizar análisis de *Salmonella* (ausencia en 25 grs.). Obviamente, el producto que sale al mercado debe cumplir con la normativa para el resto de parámetros: contaminantes (metales pesados, plaguicidas, organoclorados y organofosforados) y toxinas marinas.

Este sistema permite disminuir el riesgo de una manera muy notable, si bien hay que tener en cuenta que la normativa contempla controles de virus adicionales que no se llevan a cabo por falta de metodología oficial recomendada ni de los virus en cuestión que hay que analizar:

El esfuerzo de muchos grupos de investigación por aportar métodos alternativos-complementarios será de un gran valor:

Los coliformes fecales y *E. coli* no proporcionan la cobertura para todas las situaciones. No pueden, por ejemplo, garantizar la ausencia de virus en zonas A, como tampoco pueden garantizar la ausencia de virus después de un proceso de depuración, debido a que las cinéticas de desaparición en el proceso son distintas. También debería contemplarse algunos *vibrios* en los sistemas de monitorización.

Por último, si bien los parámetros a determinar en el producto están claramente identificados desde el punto de vista metodológico y de los valores límite, todavía falta un trabajo de armonización en las estrategias de seguimiento para las zonas, tanto dentro de la misma UE, donde no siempre se trabaja con los mismos criterios espacio-temporales de muestreo, como en relación a otros países (EE.UU, Nueva Zelanda, Australia) que operan con procedimientos de muestreo en los que las características concretas para cada zona, desde el punto de vista ambiental y desde el punto de vista de contaminación potencial, están contemplados y gestionados.

### REFERENCIAS:

- Richards, G.P. 2003. The evolution of molluscan shellfish safety. In: A. Villalba, B. Reguera, J.L. Romalde and R. Beiras (Eds.), Molluscan Shellfish Safety. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp. 221-245.
- Anom. (1991). Council Directive 91/492/EEC). Off.J.Eur.Communities L 268: 1-13.
- Anom. (1993). Real Decreto 345/1993. B.O.E. nº 74: 9301-9307.
- Anom. (1997). Council Directive 97/61/EEC). Off.J.Eur.Communities L 295: 35-36.
- Anom. (1999). Real Decreto 571/1999. B.O.E. nº 89.
- Anom. (2003). Orden APA/1029/2003. B.O.E. nº 103: 16768-16790.

## Aminas biógenas en cárnicos fermentados: de un problema de seguridad a una cuestión de confianza

Sara Bover-Cid  
Universidad de Barcelona

En un principio se consideraba que todas las aminas biógenas (AB) eran componentes naturales de los alimentos o bien inherentes al proceso de elaboración de ciertos productos. Actualmente, se acepta que su presencia en los alimentos, por lo menos en cantidades importantes, debe atribuirse a la acción bacteriana sobre la fracción proteica mediante reacciones de descarboxilación de aminoácidos precursores. En general, este proceso requiere la conjunción de diversos factores (11), como son: (a) el desarrollo de microorganismos aminoácido-decarboxilasa positivos; (b) disponibilidad de cantidades suficientes de aminoácidos precursores libres; (c) presencia de piridoxal 5'-fosfato, cofactor enzimático de la reacción de descarboxilación; (d) condiciones ambientales favorables para la síntesis y actividad de las descarboxilasas (pH ácido, cierto grado de anaerobiosis, etc...).

El origen microbiano de las AB, y las consecuentes implicaciones sanitarias y tecnológicas, enmarcan a estos microcomponentes de los alimentos en el ámbito de la Seguridad y Calidad alimentarias. La investigación entorno a las AB ha experimentado una importante evolución desde sus inicios, en los que preocupaba la visión toxicológica, hasta la actual perspectiva multidisciplinar químico-microbiológica, en la que prevalece el interés que pueden tener estas sustancias como indicadores de deterioro, ya que su ausencia sería un atributo de calidad o una mejora de un producto.

Las AB se pueden encontrar en una amplia variedad de alimentos, siendo principalmente los pescados y los quesos los productos más relacionados con la presencia de elevados contenidos de histamina y tiramina respectivamente (14). Sin embargo, se ha prestado relativamente poca atención a los productos cárnicos a pesar de que existen datos que señalan que en conjunto pueden tener cantidades tanto o más importantes que los pescados y quesos. Ciertamente, la elaboración de productos cárnicos fermentados ofrece los requisitos necesarios para la formación de AB: se produce el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos potencialmente aminogénicos, un cierto grado de proteólisis que aumenta la disponibilidad de aminoácidos precursores, así como una acidificación que parece favorecer las reacciones de descarboxilación. La actividad aminogénica microbiana puede estar relacionada, *a priori*, con procesos fermentativos propios de la elaboración del producto, también puede ser consecuencia de la degradación de las materias primas utilizadas para su elaboración.

Los trabajos realizados sobre aminas biógenas en productos cárnicos fermentados indican que existe una amplia variabilidad cuali y cuantitativa en los contenidos (2, 17). Sin embargo, a parte de la presencia más o menos constante de las poliaminas endógenas (espermidina y espermina), la tiramina es la amina más importante en estos productos y sus valores promedios en los trabajos publicados se sitúan entorno a los 100 – 200 mg/kg. Sin embargo, los niveles de tiramina pueden llegar a más de 700 mg/kg en algunos casos, a menudo acompañados de cantidades notables de otras AB minoritarias como feniletilamina y triptamina. Generalmente, la acumulación de tiramina se da principalmente en las primeras etapas de la elaboración asociada al desarrollo de la flora láctica fermentativa y al descenso del pH, por lo que la presencia de cantidades relativamente bajas de tiramina en embutidos fermentados podría ser prácticamente inevitable. La putrescina suele describirse como segunda amina desde el punto de vista cuantitativo, y generalmente de aparición más tardía. Por otra parte, la cadaverina y la histamina presentan mayor variabilidad que las anteriores aminas. Los contenidos promedios suelen ser bajos y en muchos casos ni se detectan, especialmente la histamina. Cabe destacar que ocasionalmente estas aminas pueden acumularse en cantidades importantes, asociadas a recuentos elevados de enterobacterias, superando a la putrescina e incluso a la tiramina (8, 16).

La gran variabilidad observada en la distribución de aminas biógenas es atribuible no sólo a los diferentes tipos de productos fermentados y a los diferentes procesos tecnológicos que apliquen los fabricantes, sino que también hay diferencias cuando se comparan lotes de producción de un mismo tipo de producto y fabricante. En efecto, en productos cárnicos fermentados la aminogénesis es el resultado de una compleja interacción de factores que influyen en la presencia y en la actividad (proteolítica y aminogénica) de diferentes microorganismos, tanto de los involucrados en el proceso fermentativo como de los provenientes de contaminaciones. Es evidente y ampliamente reconocido el importantísimo papel que juega la calidad higiénica de las materias primas, pues de ella depende la carga inicial de microorganismos contaminantes. Así, la presencia de cadaverina e histamina, al menos en cantidades importantes, podrían indicar un estado higiénico de las materias primas no óptimo (6, 16).

La inoculación de cultivos iniciadores de la fermentación parece, *a priori*, una de las herramientas tecnológicas más interesantes para reducir la aminogénesis por parte de la flora espontánea. No obstante, no todos los microorganismos son igualmente eficaces, pues además de carecer de actividad aminoácido-decarboxilasa, deberían ser competitivos en las condiciones particulares de fermentación de cada producto.

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo diversos estudios sobre el potencial papel protector de diferentes cultivos iniciadores frente a la acumulación de AB durante la elaboración de Fuet. Se estudiaron distintos procesos de elaboración de Fuet a partir de las mismas materias primas, formulación y condiciones de fermentación-maduración, pero variando el tipo de cultivo iniciador. Los cultivos iniciadores estudiados fueron cepas de lactobacilos y/o estafilococos aisladas de productos cárnicos fer-

mentados. Se realizaron estudios comparativos de forma que en uno de los lotes de producción no se adicionaba cultivo iniciador para ser considerado como lote control de fermentación espontánea.

De los resultados de estos trabajos, se destaca como una de las conclusiones más significativas que la inoculación de cualquiera de los cultivos iniciadores seleccionados es útil para reducir considerablemente la formación de aminas biógenas. El efecto de los cultivos se traduce en una reducción pero no en una modificación del perfil de las aminas, puesto que tiramina, putrescina y cadaverina se mantuvieron siempre como aminas mayoritarias. El grado de protección del cultivo, expresado como el porcentaje de reducción de los contenidos de AB formados en los productos comparación con el correspondiente control de fermentación espontánea, varió entre un 25% y un 95%, dependiendo del *starter* y de la amina considerada.

Cabe destacar en concreto que la adición de la cepa *L. sakei* CTC494 (no formadora de aminas *in vitro*) resultó muy efectiva para reducir el contenido de las principales aminas (tiramina, putrescina y cadaverina), y para inhibir totalmente la formación de b-feniletilamina, triptamina e histamina por parte de la microbiota inicialmente presente en las materias primas (4). La reducción observada en la acumulación de aminas biógenas (90-95%) fue cuantitativamente más importante que las descritas en trabajos previos (9, 10, 13, 15). La reducción pudo apreciarse, aunque menor, incluso al utilizar lactobacilos aminoácido-descarboxilasa positivos como la cepa *L. curvatus* CTC371. Cabe señalar que la efectividad protectora de la cepa *L. sakei* CTC494 se pierde si se utiliza como materia prima carne con elevados recuentos microbianos (7). Este hecho representa, sin embargo, una ventaja adicional para el uso de este *starter*, ya que en ningún caso debería ser aceptado un ingrediente o procedimiento que enmascarase un mal estado de las materias primas.

Las cepas de *L. sakei* y *L. curvatus* de origen cárnico presentan una buena tolerancia a la acidez, se adaptan a las condiciones de anaerobiosis y crecen bien a las temperaturas relativamente bajas (15 – 22 °C) aplicadas para la elaboración de los productos cárnicos fermentados estudiados, siendo por tanto microorganismos con capacidad para dominar los procesos fermentativos e inhibir la actividad aminogénica de la microflora presente. Por ello, las cepas de las especies de *L. sakei* y *L. curvatus* fueron mucho más efectivas para reducir la acumulación de aminas biógenas durante la fermentación de productos cárnicos fermentados que los *starters* de otras especies de lactobacilos, pediococos, estafilococos o micrococos.

Las cepas de estafilococos proteolíticas también se tradujo en un cierto grado de protección (3). El empleo de *starters* mixtos, debidamente seleccionados y compuestos por estafilococos y lactobacilos competitivos, ambos sin la capacidad para descarboxilar aminoácidos, ofrece las ventajas de los dos grupos microbianos: permiten beneficiarse de la contribución positiva de los estafilococos proteolíticos sobre las cualidades organolépticas del producto acabado, así como de las propiedades tecnológicas (competencia, producción de ácido láctico, inhibición de patógenos) que presentan los lactobacilos, evitando al mismo tiempo, la producción de cantidades significativas de aminas biógenas por parte de la flora espontánea (5).

En principio debe admitirse que las AB de los productos cárnicos en general, y los fermentados en particular, representan para la población en general una preocupación menor en el ámbito de la seguridad alimentaria, especialmente en comparación con los actuales problemas relacionados con los patógenos emergentes. Sin embargo, como apuntan Bodmer *et al.* (1), la población susceptible a sufrir intolerancias alimentarias, justifica el reto de la industria alimentaria de elaborar productos con niveles de AB lo más bajos posible. Además, el interés del estudio de las AB en los alimentos se ha visto renovado en un contexto como el actual en el que se persigue la optimización del procesado de los alimentos para obtener la máxima calidad y seguridad. Según los conocimientos actuales, no hay ningún efecto positivo atribuible a la presencia de AB y en cambio que si que hay un potencial efecto negativo para la salud de los consumidores en general o para los más susceptibles. Por tanto, siempre dentro de lo razonablemente posible, debe considerarse positivo su control en los alimentos. El desarrollo de procedimientos de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) supone un interesante enfoque para evitar la presencia y la actividad de enzimas aminoácido descarboxilasa de origen microbiano y, en definitiva, controlar la acumulación de AB durante la elaboración de productos cárnicos fermentados.

## Referencias

1. Bodmer S, Imark C, Kneubuhl M (1999) Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Res*, 48(6): 296-300.
2. Bover-Cid S, Schoppen S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC (1999) Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Sci*, 51: 305-311.
3. Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC (1999) Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on the biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol*, 46: 95-104.
4. Bover-Cid S, Hugas M, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC (2000) Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausage. *J Food Prot*, 63(2): 237-243.
5. Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC (2000) Mixed starter cultures of lactobacilli and staphylococci to reduce biogenic amine production during ripening of dry fermented sausages. *J Food Prot*, 63(11): 1556-1562.
6. Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC (2000) Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *J Food Prot*, 63(11): 1544-1550.
7. Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. (2001) Effectiveness of *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction

- of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *J Food Prot*, 64 (3): 367-373.
8. Bover-Cid S, Hernández-Jover T, Miguélez-Arriazo MJ, Vidal Carou MC (2003) Contribution of contaminant *enterobacteria* and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *Eur Food Res Tech*, 216: 477-482.
  9. Brink B, Damink C, Joosten H, Huis in't Veld J (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol*, 11: 73-84.
  10. Buncic S, Paunovic L, Radisic D, Vojinovic G, Smiljanic D, Baltic M (1993) Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *Int J Food Microbiol*, 17: 303-309.
  11. Halász A, Barath A, Simonsarkadi L, Holzapfel W. (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Tech*, 5(2): 42-49.
  12. Hernández-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1997) Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *J Food Prot*, 60(5): 1-7.
  13. Majjala R, Eerola S, Lievonen S, Hill P, Hirvi T (1995) Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *J Food Sci*, 60(6): 1187-1190.
  14. Mariné-Font A, Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués MT, Hernández-Jover T (1995) Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals. Exp. Chim. Toxicol.*, 88: 119-140.
  15. Paulsen P, Bauer F (1997) Biogenic amines in fermented sausages. 2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft Int*, 77(4): 32-34.
  16. Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido M, Martín-Morro MC, Mariné-Font A (1990) Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. *Food Chem*, 37: 239-249.
  17. Suzzi G, Gardini F (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int J Food Microbiol*, 88(1): 41-54.

### The new European Structure for Risk Assessment: Biological Hazards Area

Bart Goossens  
EFSA, Scientific Panel on Biological Hazards

The European Food Safety Authority (EFSA) is the keystone of the European food safety network. The Authority is committed to providing scientific advice of the highest possible quality and clear communication of existing and emerging risk. It provides risk assessments on all matters linked to food and feed safety, including animal health and welfare and plant protection. In addition, the Authority provides scientific advice on nutrition in relation to Community legislation.

Five principal objectives underlie EFSA's scientific activities and work program:

1. To provide scientific opinions and advice in response to questions related to food safety issues formally addressed to the Authority by the European Commission, the European Parliament, the Member States or by the Authority itself (ie through "self-tasking).
2. To assess the risk of, and as appropriate, propose risk-related factors for specific groups of regulated substances, following notification procedures and time schedules defined by legislation (e.g. food additives, food flavorings, feed additives including medicinal products, pesticides, GMOs and novel food ingredients).
3. To monitor specific risk factors and diseases and provide scientific opinions on tests and other tools to control these risk factors and diseases (for instance, the geographical BSE risk assessment or the monitoring of zoonoses and other food-borne zoonotic agents).
4. To prepare work for the future evaluation of health claims made for food products. Depending on the final text of the legislation currently being discussed in Council and Parliament, this could include the development of proposals for and guidance on nutritional profiles which must be respected or on the nature and extent of scientific data required to substantiate a given claim.
5. To apply and promote new and harmonized scientific approaches and methodologies for hazard and risk assessment of food and feed.

EFSA's risk assessments are carried out by its Scientific Committee and eight Scientific Panels specialized in the following areas:  
Panel on food additives, flavorings, processing aids and materials in contact with food (AFC)  
Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP)  
Panel on plant health, plant protection products and their residues (PPR)  
Panel on genetically modified organisms (GMO)  
Panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA)  
Panel on biological hazards  
Panel on contaminants in the food chain (CONTAM)  
Panel on animal health and welfare (AHAW)

The Panels are made up of leading independent scientists coming from all over Europe and even in a few cases from beyond Europe, and were appointed following an open call for expression of interest. The Scientific Committee co-ordinates the work of the Panels, proposes common methodology and guidance in carrying out risk assessments, and addresses transversal issues common to all Panels (for instance, exposure assessment).

The Scientific Committee and Expert Panels are supported by EFSA's own scientific staff. In addition, the Authority expects to reinforce its Science department by creating a series of expert service "teams" each dedicated to a specific area of risk assessment (eg data collection, epidemiology and exposure...).

In total EFSA's team of highly qualified scientists, experts in their respective fields, and support staff is expected to number 70 in 2004, representing approximately 50% of total headcount.

Finally, the Authority will also seek to build scientific networks involving Community institutions, national food safety authorities and scientific institutions in and outside the EU as well as international organizations in order to: facilitate exchange of information and expertise; evaluate possible collaboration in areas of mutual interest and continuously improve its own scientific knowledge and expertise.

More in particular, the Scientific Panel on Biological Hazards replies to questions related to Biological Hazards for human health and food safety. It provides scientific based risk assessments (opinion) on biological hazards relating to food safety and food-borne disease, including food-borne zoonoses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE), microbiology, food hygiene and associated waste management.

As compared to the structure previously under the Commission services, the Scientific Panel on Biological Hazards combines the TSE/BSE ad hoc group of the Scientific Steering Committee (SSC) and the Scientific Committee on Veterinary Measures related to Public Health (SCVMPH).



## SESIONES ORALES

Sesión oral I (O01-O05)	Pág. 54
Sesión oral II (O06-O10)	Pág. 56
Sesión oral III (O11-O15)	Pág. 59

**O01 BACTERIAS LÁCTICAS INICIADORAS DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN VINOS Y PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS**

Fernanda Ruiz-Larrea<sup>1</sup>, Isabel López<sup>1</sup>, Victoria Moreno-Arribas<sup>2</sup>, Carmen Polo<sup>2</sup>, María L. Vaderrama<sup>1</sup>, Beatriz Rojo<sup>1</sup>, Carmen Tenorio<sup>1</sup>, Myriam Zarazaga<sup>1</sup>, Carmen Torres<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño

<sup>2</sup>-Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid

Las aminos biógenas son constituyentes frecuentes en los alimentos y bebidas fermentadas. Existen numerosas evidencias que muestran que en el vino las aminos biógenas se originan fundamentalmente por la presencia de bacterias lácticas (BL) que poseen enzimas que descarboxilan los aminoácidos precursores correspondientes (1). Sin embargo, las especies bacterianas implicadas y especialmente los factores que intervienen en su producción, no se conocen bien.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la implantación de BL en vinos y evaluar las características del producto final obtenido al realizar la fermentación maloláctica (FML) bajo distintas condiciones. Se ha estudiado la influencia de los siguientes factores: (1) FML espontánea o inducida mediante la inoculación de las cepas bacterianas seleccionadas, estudiándose las especies *Lactobacillus plantarum* y *O. Oeni*. (2) tipo de depósito empleado para realizar la FML, (3) temperatura de la fermentación y (4) presencia o ausencia del lías en los vinos.

Se han realizado los análisis microbiológicos, químicos y sensoriales de los vinos elaborados. La identificación microbiológica a nivel clonal se llevó a cabo mediante análisis de restricción del DNA genómico con el enzima *SfiI* y mediante PFGE (2). La detección del gen histidina descarboxilasa (*hdc*) se llevó a cabo mediante PCR siguiendo el método de Coton *et al.* (3) modificado. Los análisis de aminos biógenas (4) y aminoácidos (5) se llevaron a cabo por HPLC en fase inversa (RP-HPLC) mediante una reacción de derivatización precolumna con orto-ftaldialdehído (OPA) y detección por fluorescencia.

La comparación de los resultados obtenidos en los análisis realizados permite hacer una valoración de los vinos finales y de ciertas condiciones de elaboración que pueden influir en los niveles de aminos biógenas durante la elaboración del vino.

**Referencias:**

1) Lonvaud-Funel, A. FEMS Microbiol. Let. 199, 9-13 (2001).

2) G-Alegría, G., López, I., Ruiz, J. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M. Torres, C. and Ruiz-Larrea. F. FEMS Microbiol. Let. 230, 53-61 (2004).

3) Coton, E., Rollan, G.C. and Lonvaud-Funel, A. Am.J.Enol.Vitic. 49 (2) 199-204 (1998).

4) Moreno-Arribas MV, Polo MC, Jorganes F, Munoz R. Int J Food Microbiol. 84(1), 117-23 (2003).

5) Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P.J.; Polo, M.C. J. Agric. Food Chem., 46, 3422-25 (1998).

Este trabajo se ha financiado por los Proyectos de Investigación AGL2003-02436 y VIN00-043-C3.

**O02 GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES POR *Debaryomyces hansenii* Y *Penicillium chrysogenum* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y EN CARNE MADURADA**

Mercedes Alonso Candela, Miguel A. Asensio Pérez, Elena Bermúdez Polo, María J. Sosa Zuñil, Félix Núñez Breña  
Higiene de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres

Diversos microorganismos han sido utilizados como cultivos iniciadores en productos cárnicos madurados para mejorar el aroma debido a su capacidad de generación de compuestos volátiles. El incremento de aminoácidos libres mediante proteólisis no es suficiente para mejorar las características sensoriales, siendo la presencia de microorganismos decisiva para la formación de esos compuestos volátiles. El objetivo del trabajo ha sido comprobar la influencia de la disponibilidad de aminoácidos en la formación de compuestos volátiles por *Penicillium chrysogenum* y *Debaryomyces hansenii*.

*P. chrysogenum* Pg222 y *D. hansenii* Dh345 aislados de jamón, se inocularon ( $10^6$  ufc/ml ó g) en medio de cultivo tamponado (fosfato sódico 0,1 M, pH 6 con ácido láctico, 5% NaCl) y en carne de cerdo con 5% de NaCl suplementados con leucina, isoleucina, valina o fenilalanina y se incubaron a 18°C 30 días sobre solución de KCl sobresaturada (HR 85%), tomando muestras a los 3, 7, 10, 15 y 30 días. El desarrollo de los microorganismos fue evaluado por siembras en agar extracto de malta. Los compuestos volátiles fueron extraídos por microextracción en fase sólida con fibra de polidimetilsiloxano e identificados por GC-MS. En las muestras estériles sólo se detectaron compuestos de oxidación lipídica pero en menor variedad y concentración que en las inoculadas. Los microorganismos alcanzaron recuentos de  $10^8$  ufc/ml ó g en 3-7 días. En los medios inoculados con ambas cepas se detectaron compuestos derivados de los aminoácidos añadidos incluyendo los aldehídos ramificados (3-metilbutanal, 2-metilbutanal, 2-metilpropanal) y sus correspondientes alcoholes y ácidos. En la carne madurada también se detectaron estos compuestos pero en menor concentración que en la suplementada con aminoácidos. En los sustratos estériles no se detectó ninguno de estos compuestos, por lo que su formación por fenómenos autolíticos no tiene lugar a un ritmo apreciable, resultando decisiva la contribución microbiana para alcanzar un nivel detectable. Además, en carne inoculada con *D. hansenii* se detectaron ésteres y con *P. chrysogenum* pirazinas por lo que estas dos cepas contribuyen decisivamente a la formación de compuestos volátiles.

Estos resultados demuestran que el metabolismo microbiano induce la formación de gran cantidad y diversidad de volátiles encontrados habitualmente en productos cárnicos madurados. Además, la cantidad inicial de aminoácidos resulta decisiva para la producción de estos compuestos.

Agradecimientos. Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto CAL02-085 financiado por el INIA (Ministerio de Ciencia y Tecnología). M. Alonso es beneficiaria de una beca FPI de la Junta de Extremadura.

### **003 VALORACIÓN DEL USO DE CULTIVOS INICIADORES Y ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA COMO OBSTÁCULOS COMBINADOS PARA MEJORAR LA SEGURIDAD DE EMBUTIDOS POCO ÁCIDOS**

Begonya Marcos<sup>1</sup>, Teresa Aymerich<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>, Margarita Garriga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Microbiología y Biotecnología Alimentaria, IRTA-Centro de Tecnología de la Carne, Monells

<sup>2</sup>-EFSA, Bruselas, Bélgica

Los consumidores europeos del área mediterránea rechazan los sabores ácidos intensos asociados con los embutidos. Así, en países como Francia, Italia y España la producción de embutidos fermentados ha disminuido a favor del consumo de embutidos madurados de pequeño calibre ( $\leq 30$ -40 mm) y poco ácidos. La tecnología de este tipo de embutidos se basa en el uso de bajas temperaturas de maduración ( $\leq 10$ -12 °C) con el fin de evitar una intensa y rápida fermentación. Aunque la reducción en la actividad de agua de los productos mejora la salubridad de este tipo de embutidos, un pH elevado implica un riesgo para la seguridad alimentaria. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilización de cultivos iniciadores así como la aplicación de alta presión hidrostática para mejorar la seguridad de este tipo de embutidos.

Se fabricaron dos tipos de embutidos de calibre estrecho, fuet y chorizo, a los que se les añadió un inóculo ( $6 \times 10^2$  ufc/g) consistente en un cóctel de cepas diversas de *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Se diseñaron cuatro lotes, dos de ellos con inoculación suplementaria de cultivo iniciador compuesto de una mezcla de bacterias ácido lácticas y estafilococos aislados de embutidos tradicionales poco ácidos. Los embutidos fueron madurados durante 21 días a 12 °C y con un 80 % de humedad relativa. Se evaluó el efecto de la alta presión hidrostática al principio del proceso, después de embutir (200 MPa, 10 min, 17 °C) y a final del proceso de maduración (400 MPa, 10 min, 17 °C).

El nivel de presión de 200 MPa aplicado después de embutir no alteró el color y textura de los embutidos, pero no resultó efectivo para inhibir el crecimiento de los patógenos inoculados. La adición de cultivo iniciador, a diferencia del tratamiento de presurización, permitió el control de la población de *L. monocytogenes* evitando la multiplicación del patógeno durante el proceso de maduración. No se detectaron diferencias entre los tratamientos para *Salmonella*, que disminuyó en ambos embutidos, presurizados y no presurizados, por debajo del límite de detección (10 ufc/g). La aplicación del tratamiento de alta presión (400 MPa, 10 min, 17 °C) al final del proceso de maduración permitió obtener, en ambos embutidos, la ausencia de *Salmonella* en 25 g.

### **004 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CONSERVACIÓN SOBRE LA MICROBIOTA DE JAMÓN COCIDO LONCHEADO SOMETIDO A ALTAS PRESIONES**

Claudia Ruiz-Capillas, Virginia Díaz Barcos, José Carballo, Francisco Jiménez Colmenero

Instituto del Frío, CSIC, Madrid

Las altas presiones (HP) se están empleando en jamón cocido para limitar el efecto de la recontaminación que tiene lugar durante el loncheado y posterior envasado. Con distinta magnitud, abusos de temperatura pueden producirse en algunas de las fases del proceso de comercialización del producto, por lo que conviene explorar sus consecuencias. El objetivo de este estudio ha consistido en analizar cómo las condiciones de almacenamiento (temperatura constante y abusos de temperatura) afectan al desarrollo microbiano en lonchas de jamón cocido envasado a vacío y sometido a altas presiones (HP) (400 MPa/10 min/30 °C). Su comportamiento ha sido comparado con un envasado convencional a vacío (V). Se han ensayado tres condiciones de conservación: temperatura constante a  $2 \pm 1$  °C (VC y HPC), a  $12 \pm 1$  °C (VT y HPT), y oscilaciones de temperatura de  $7 \pm 5$  °C (ciclos entre 2-12 °C/12 h) (VS y HPS). En las muestras estudiadas se han analizado microorganismos totales, bacterias lácticas y enterobacterias.

Inicialmente los recuentos totales fueron inferiores a 1 log ufc/g, aumentando al cabo de los 14 días en todas las muestras excepto en HPC. Dicha microbiota estaba constituida principalmente por bacterias lácticas, ya que los niveles de enterobacterias fueron inferiores a 1 log ufc/g. El crecimiento microbiano fue más pronunciado en los productos almacenados 12 °C y en oscilaciones que en los mantenidos a 2 °C. Al cabo de 42 días, se apreciaron diferencias debido tanto al efecto de la presurización como de las condiciones de conservación: VS y VT presentaron recuentos superiores a 11 log ufc/g, HPS y HPT del orden de 9 log ufc/g y VC superó 8 log ufc/g, mientras que en la muestra HPC, los recuentos estuvieron próximos a 6 log ufc/g. Sin embargo, al cabo de los 56 días los recuentos en VC y HPC se igualaron, situándose en torno a 8 log ufc/g. En estas muestras, el efecto de la temperatura (2 °C) dio lugar a la ralentización del crecimiento microbiano, de modo que incluso a los 77 días los recuentos se mantuvieron en torno a 8 log ufc/g, valor muy inferior al experimentado por las otras dos condiciones de conservación.

Estos resultados evidencian la importancia de las condiciones de conservación para optimizar el beneficio de la aplicación de HP, el cual puede incluso perderse en condiciones de conservación inadecuadas.

## O05 INACTIVACIÓN DE *S. senftenberg* EN HUEVOS ÍNTEGROS MEDIANTE LA ACCIÓN COMBINADA DE ULTRASONIDOS Y CALOR

María Concepción Cabeza, María Luisa García, Lorenzo de la Hoz, Isabel Cambero, Juan Antonio Ordóñez  
Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid

Los estudios realizados para obtener huevos íntegros exentos de salmonelas han sido numerosos, la mayoría de ellos basados en la aplicación de tratamientos térmicos. Sin embargo, la termolabilidad de las proteínas de la clara del huevo dificulta este objetivo, ya que la aplicación de estos tratamientos a temperaturas que garanticen la eliminación de este microorganismo produce modificaciones en sus propiedades funcionales. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que la aplicación simultánea de ultrasonidos y calor reduce la termorresistencia de *S. enteritidis* adherida a la cáscara de huevo unas 5-7 veces, respecto al tratamiento térmico, cuando se aplica a temperaturas entre 55 y 52°C (1). Con este trabajo se pretende establecer si el efecto letal observado al aplicar este nuevo tratamiento combinado en *S. enteritidis* se consigue también para *S. senftenberg*, una cepa que presenta una termorresistencia anormalmente elevada, aunque su presencia en huevos es muy escasa.

Para ello, se contaminaron huevos con un cultivo de 24 h de *S. senftenberg* ATCC 43845 ( $10^8$  cél/ml), obteniéndose, tras 24 h a 37°C, una carga inicial de aproximadamente  $10^8$  células por huevo. Posteriormente, cada huevo se sumergió en 200 ml de agua destilada estéril y se procedió a la aplicación de tratamientos termoultrasónicos (24 KHz, 300 W) a diferentes temperaturas para la obtención de los correspondientes valores D. La cinética de destrucción se ajustó a la ecuación  $\log D = 8,0333 - 0,13T$  ( $R^2 = 0,98$ ), con un valor  $z = 7,69^\circ\text{C}$ . Comparando estos valores con los obtenidos mediante aplicación de tratamientos térmicos ( $\log D = 10,1257 - 0,1597T$ ) ( $R^2 = 0,99$ ), se observó que el efecto sinérgico ultrasonidos-calor disminuía a medida que aumentaba la temperatura. Sin embargo, al aplicar ultrasonidos a temperaturas no letales para este microorganismo (53-55°C) se producía una reducción del valor D mucho mayor, del orden de 12 a 6 veces.

Por tanto, la aplicación de ultrasonidos a estas temperaturas permite reducir drásticamente la presencia de salmonelas en la cáscara de huevo manteniendo las propiedades funcionales y sensoriales de los componentes del mismo.

Agradecimientos: A L. Aranciaga por su colaboración. El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT AGL 2001-1470.

(1) Cabeza, M.C., J.A. Ordóñez, I. Cambero, L. de la Hoz, and M.L. García. J. Food Prot. En prensa.

## O06 PCR A TIEMPO REAL-SYBR GREEN I PARA DETECCIÓN DE *Bacillus cereus* TOXIGÉNICOS

Juan Fco. Martínez-Blanch<sup>1,4</sup>, Beatriz Pinto<sup>4</sup>, M<sup>a</sup> José Ocio<sup>2,4</sup>, Esperanza Garay<sup>1,3</sup>, Rosa Aznar<sup>3,4</sup>

1-Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Univ. de Valencia, Edif. de Investigación Jeroni Muñoz, Campus de Burjassot, Valencia

2-Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Universidad de Valencia

3-Departamento de Microbiología y Ecología, Univ. de Valencia

4-Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC, Valencia

*Bacillus cereus* es un bacilo Gram positivo esporulado contaminante habitual de alimentos tanto frescos como procesados. Además de su carácter alterante, produce varios tipos de toxinas que han sido relacionadas fundamentalmente con dos tipos de gastroenteritis alimentarias: el síndrome emético, asociado a la toxina cereúlica y el síndrome diarreico, debido a la acción de diversas enterotoxinas. Sin embargo, existen referencias respecto a la producción de enterotoxinas y a la presencia de los genes implicados en cepas de *B. thuringiensis*, *B. mycoides* y *B. Weihenstephanensis*, especies incluidas en el grupo *B. cereus* (Hansen et al., 2001). Las esporas de estos microorganismos resisten a los tratamientos térmicos de pasteurización, y algunas cepas pueden crecer a temperatura de refrigeración durante el almacenamiento por lo que constituyen un problema para la industria alimentaria. Su detección y cuantificación se realiza habitualmente por técnicas culturales. Dichas técnicas consumen mucho tiempo y en ocasiones llevan a identificaciones erróneas. Como alternativa, las técnicas moleculares basadas en la PCR tienen como ventaja una mayor rapidez y seguridad en la identificación del microorganismo e incluso permiten su cuantificación mediante PCR (RTi-PCR).

En este trabajo se presenta el desarrollo de un sistema de RTi-PCR con SYBR-Green I para la cuantificación de cepas toxigénicas del grupo *B. cereus*. Para ello un total de 62 cepas, tanto de referencia como aisladas de alimentos, fueron sometidas a caracterización fenotípica (ISO 7932 y API-50CH/B) y fenotípica (ISR y RAPD). Se determinó la presencia de genes relacionados con factores de virulencia como cereolisina O (*clo*), enterotoxina FM (*entFM*), fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (*pc-plc*) y esfingomielinasa (*sph*) mediante PCR convencional utilizando cebadores descritos previamente. De ellos, el gen *pc-plc* se detectó en las cepas del grupo *B. cereus*, y dado que se encuentra en una única copia por genoma, fue seleccionado como diana para el desarrollo de la RTi-PCR. El diseño de cebadores específicos se realizó mediante el análisis de secuencias, tanto públicas como obtenidas en el estudio, utilizando los programas ARB (<http://www.arb-home.de>) y Primer Express™ versión 1.0 (ABI Prism, PE Biosystems). Se optimizaron los parámetros de la reacción de cuantificación, en base a su nivel de sensibilidad y al valor de la pendiente de la curva estándar, utilizando la cepa *B. cereus* CECT 148<sup>T</sup>. Su aplicación en el total de cepas incluidas en el estudio confirmó su especificidad para grupo *B. cereus*.

## **007 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE UN TIPO EMERGENTE DE *Salmonella* SEROTIPO *typhimurium* QUE PORTA UN PLÁSMIDO HÍBRIDO DE VIRULENCIA-RESISTENCIA A ANTI-MICROBIANOS (pUO-StVR2)**

Ana Herrero<sup>1</sup>, María Rosario Rodicio<sup>1</sup>, Noelia Martínez<sup>1</sup>, Irene Rodríguez<sup>1</sup>, María Cruz Martín<sup>1</sup>, María Angeles González-Hevia<sup>2</sup>, María Carmen Mendoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo

<sup>2</sup>-Laboratorio de Salud Pública, Principado de Asturias, Oviedo

En el Principado de Asturias (PA) hemos constatado la aparición a principios de la década de los 90, de una "geno-variedad" de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* multirresistente a antimicrobianos, que alberga un plásmido conjugativo de 140 Kb (pUO-StVR2). Se trata de un plásmido híbrido, derivado de pSLT90 (plásmido de virulencia de 94 Kb) mediante la adquisición de una región-R compleja. Esta región incluye los genes tet(B), catA1, oxa1, [str(A)-str(B), aad1], sul1, qacED1 y merA, que confieren resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, estreptomicina-espectinomicina, sulfamidas, antisépticos de amonio cuaternario y mercurio, respectivamente.

En esta comunicación se presentan los resultados de un estudio de Epidemiología Molecular sobre pUO-StVR2 y su hospedador. Se utilizaron 152 cepas (de origen clínico y de alimentos) del serotipo *Typhimurium*, resistentes a ampicilina (aisladas durante 2001-2003). Se analizó la presencia de los genes oxa1 (resistencia a ampicilina por producción de una b-lactamasa de tipo OXA) y spvC (perteneciente a la región-spv de pSLT90) mediante PCR simple, tanto en las 152 cepas seleccionadas como en las cepas control *Typhimurium* T31-pUO-StRV2 y LT2-pSLT90, y en Braenderup (sin plásmidos). Cuarenta y siete cepas (27 de 2001, 18 de 2002 y dos de 2003) y el control positivo (T31-pUO-StRV2) generaron amplicones del tamaño esperado. El estudio del perfil plasmídico de las cepas spvC-oxa1 positivas mostró que todas portaban un plásmido de unas 140 kb y algunas, además, plásmidos pequeños (< 10 kb). Mediante hibridación se mapearon sondas específicas para spvC y oxa1 en el plásmido de 140 kb. Estos resultados confirmaron la presencia de pUO-StVR2 en las cepas ensayadas, sugerida previamente por la correcta amplificación de los genes plasmídicos. Las 47 cepas pUO-StRV2 positivas se analizaron mediante Xba1-PFGE, lo que permitió agruparlas en 5 perfiles, designados X1-X5. Resaltar que cepas analizadas en un estudio previo (correspondientes al periodo 1993-1998) presentaron una menor diversidad genómica, perteneciendo todas ellas al perfil X1.

Los resultados presentados (i) demostraron la validez del gen oxa1 y de la región spv como marcadores para el seguimiento del plásmido híbrido en cepas del serotipo *Typhimurium*, (ii) permitieron establecer los tipos genómicos portadores del plásmido que circularon en el PA durante el período investigado y (iii) servirán de base para el futuro seguimiento epidemiológico de los tipos genómicos responsables del mantenimiento y la dispersión del plásmido.

## **008 DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN AGUAS MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL vs RT-PCR CONVENCIONAL**

Alejandro Rodrigo Gil<sup>1</sup>, José Luís Monzó Sánchez<sup>1</sup>, Javier Buesa Gómez<sup>2</sup>, David Tomás Fornés<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Laboratorio de Bioensayos, AINIA, Paterna, Valencia

<sup>2</sup>-Dpt. Microbiología. Fac. Medicina y Hospital Clínico Universitario, Universitat de Valencia

Los rotavirus son el principal agente etiológico de gastroenteritis infantil en todo el mundo, infectando también a adultos. Producen aproximadamente 870.000 muertes al año en niños menores de tres años en los países pobres. Un factor importante en su transmisión es su relación con contaminaciones alimentarias, ya que su vía de infección es fecal-oral.

Los métodos de detección de virus entéricos en alimentos se han basado clásicamente en su capacidad para producir efectos citopáticos en líneas celulares susceptibles, lo cual ha limitado su sensibilidad y utilidad. El desarrollo de técnicas alternativas de análisis, como los métodos inmunológicos y los métodos genéticos basados fundamentalmente en la técnica RT-PCR han mejorado sus resultados y ampliado sus aplicaciones. Esta última técnica presenta una serie de ventajas que la convierte en una de las más frecuentemente utilizada en la actualidad y con mayor potencial de aplicación en los laboratorios de control microbiológico de aguas y alimentos.

El presente trabajo ha tenido como objetivo la puesta a punto y posterior evaluación de métodos de detección de rotavirus basados en dos técnicas de análisis de RT-PCR. Se han realizado ensayos con partículas víricas obtenidas de pacientes infectados con rotavirus genotipados con una concentración conocida de virus en heces.

Tras inocular muestras de agua de diversa procedencia (aguas fecales de origen doméstico e industrial, aguas de riego, aguas marinas...) con distintas concentraciones de virus, se han realizado análisis de detección del ARN viral mediante RT-PCR convencional así como mediante RT-PCR a Tiempo Real (Sequence Detection System GENEAMP 5700. Applied Biosystems) usando la sonda intercalante SYBR green. Se han ensayado diferentes procedimientos de extracción del ARN viral (celulosa, isotiocianato de guanidinio), de concentración (filtros de carga positiva/negativa, partículas de sílica), cebadores específicos de diferentes genes diana (VP6,VP4) así como condiciones de amplificación.

Así mismo, con objeto de mejorar la sensibilidad, se han realizado ensayos de nested PCR.

## **O09 ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE TIRAMINA EN *Lactococcus lactis* IPLA 655**

Daniel M. Linares, María Fernández, Miguel A. Álvarez  
Instituto de Productos Lácteos de Asturias

Las aminas biógenas (AB) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular capaces de provocar intoxicaciones alimentarias. Su acumulación en alimentos fermentados se debe a la descarboxilación de determinados aminoácidos llevada a cabo por algunas de las cepas que forman parte del cultivo iniciador ó de la microbiota secundaria. El hecho de que su presencia en los alimentos suponga un riesgo potencial para la salud del consumidor; unido a la creciente demanda de alimentos más saludables y seguros, ha aumentado el interés de los estudios sobre la identificación de cepas productoras de AB, así como de los genes responsables del proceso y la regulación de los mismos.

Las AB más abundantes en productos lácteos son la histamina y la tiramina, que se forman por descarboxilación de los aminoácidos histidina y tirosina respectivamente. Nuestro trabajo en la actualidad se centra en el estudio de los genes responsables de la descarboxilación de tirosina. Para ello, a partir de la colección de bacterias del ácido láctico del Instituto de Productos Lácteos de Asturias, aisladas a partir de quesos artesanales, se han encontrado más de 20 cepas productoras de tiramina, de entre las cuales se ha seleccionado *Lactococcus lactis* IPLA 655. Se han localizado y secuenciado los genes responsables de la síntesis de tiramina, comprobándose que forman un cluster en el que se identificaron tres pautas abiertas de lectura que incluyen una tirosina descarboxilasa (*tdc*), una tiosil-tRNA-sintetasa (*tyrS*) que podría estar implicada en la regulación del sistema, y un tercer gen, *tyrP*, que parece codificar el transportador responsable del intercambio entre la tirosina presente en el medio y la tiramina producida en el citoplasma bacteriano.

En este trabajo se presentará el análisis Northern llevado a cabo para determinar la organización transcripcional del cluster, así como los experimentos RACE que permiten identificar el inicio de la transcripción de los distintos genes. Además, dado que el consumo de un protón durante la reacción de descarboxilación podría tener importancia fisiológica para la célula, de forma que le permitiría sobrevivir a pH bajo, se han realizado estudios funcionales que parecen indicar que la producción de tiramina está inducida en medios ácidos. Debido a ello, también se abordará la regulación transcripcional del sistema en función de distintos parámetros que pudieran estar implicados en la síntesis de tiramina, prestando especial atención a la expresión de los distintos genes en función del pH del medio.

## **O10 ANÁLISIS MOLECULAR POR PCR-DGGE DEL CONTENIDO FECAL DE INDIVIDUOS SANOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON YOGURES TRADICIONALES Y YOGURES TRADICIONALES PASTEURIZADOS**

Raimundo García-Albiach<sup>1</sup>, Rosa Del Campo<sup>2</sup>, Daniel Bravo<sup>2</sup>, Alejandra Montesi-Libois<sup>1</sup>, María José Pozuelo de Felipe<sup>1</sup>, Fernando Baquero<sup>2</sup>

1-Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU, Madrid

2-Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

El yogur se ha considerado tradicionalmente como un alimento saludable debido a su contenido bacteriano. Últimamente ha aumentado el interés por los probióticos, lo que ha dado lugar al desarrollo de nuevos productos comerciales. En un trabajo previo pudimos comprobar la ausencia de las bacterias del yogur vivas o de restos de su ADN en las heces de 113 voluntarios sanos tras consumo de 3 yogures al día, durante 15 días. El objetivo del presente estudio ha sido evaluar los posibles cambios cualitativos de los perfiles bacterianos intestinales tras la ingesta de yogures tradicionales, y compararlo con la ingesta de yogures pasteurizados. Se incluyeron 113 individuos sanos (48 mujeres, 65 hombres, edad media 23,6 años), recogiendo tres muestras de heces por individuo: T0 ó muestra basal; T1: tras consumo de 375 gr: diarios de yogur tradicional 15 días; y T2: tras consumo de 375 gr: diarios de yogur pasteurizado 15 días. Entre la muestra 1 y la 2 existieron 15 días de lavado sin toma de yogur. Se obtuvo el ADN total de las heces mediante un método comercial modificado y se aplicó la técnica PCR-DGGE utilizando cebadores universales (correspondientes al dominio Bacteria), así como cebadores correspondientes al grupo de bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Weissella* y *Pediococcus*) para amplificar fragmentos de ADNr 16S de 566 pb y 340 pb respectivamente. Las bandas de mayor interés fueron recortadas y secuenciadas. El análisis con cebadores universales nos ha permitido observar que cada individuo presenta un perfil bacteriano propio constante en las tres muestras, salvo ligeras variaciones. Se han detectado diferentes *Eubacterias* y varias bacterias incultivables. En el análisis cualitativo de bacterias lácticas se apreciaron variaciones que podrían ser atribuibles al consumo de los preparados lácteos en algunos de los individuos, sin observar diferencias significativas entre los yogures tradicionales y sus equivalentes pasteurizados. *Lactobacillus algidus*, *Weissella confusa*, *Weissella viridescens*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus curvatus* fueron algunas de las bacterias detectadas en las muestras T1 y T2 que no se amplificaron en las muestras T0. Conclusión: Se ha detectado una especificidad individual en la flora intestinal utilizando los cebadores universales, mientras que se han observado cambios cualitativos en la flora láctica tras el consumo de yogur; no existiendo diferencias entre la ingesta de yogur tradicional o su equivalente pasteurizado.

## **O11 COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* O157:H7 DURANTE EL CULTIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L, VARIEDAD ROMANA) EN SUELO FERTILIZADO CON ESTIÉRCOL DE BOVINO**

Ma. Refugio Torres-Vitela, Elisa Cabrera-Díaz, Rosa del Carmen Olivares-Cruz, Raúl Montaña-Rosales, Edgar Vinicio Villalpando-Arteaga  
Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Lab. de Microbiología Sanitaria, Universidad de Guadalajara, México

*E. coli* O157:H7 es un importante patógeno transmitido por agua y alimentos, cuyo principal reservorio es el ganado bovino que excreta a la bacteria en sus heces de forma intermitente y por períodos cortos. El uso de estiércol animal como fertilizante mejora la composición del suelo con efectos benéficos en los cultivos, sin embargo microorganismos como *E. coli* O157:H7 pueden persistir y contaminar frutas y hortalizas. *E. coli* puede sobrevivir por largos periodos en estiércol animal. Para conocer el comportamiento de *E. coli* O157:H7 durante el cultivo de la lechuga en el suelo fertilizado con estiércol de bovino se estudió la presencia de la bacteria en lechugas cosechadas de una parcela que fue fertilizada con estiércol de bovino; se cultivaron lechugas en suelo fertilizado con el estiércol para observar una posible transmisión y se estudio la supervivencia de la bacteria en plantas de lechuga, así como también la influencia de algunos factores como pH, humedad y microbiota asociada. No se logró aislar a la bacteria de las lechugas cosechadas de la parcela con estiércol de bovino. *E. coli* O157:H7 sobrevivió durante 18 semanas en la tierra para cultivo de lechuga fertilizada con estiércol. Durante la primer semana post inoculación se observó un incremento de 0.7 log<sub>10</sub> en la concentración de *E. coli* O157:H7 en el sustrato con inóculo alto (105 UFC/g) y de 1.35 log<sub>10</sub> en el sustrato con inóculo bajo (103 UFC/g). A partir de la novena semana no se observaron diferencias significativas (p<0.05) en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 de acuerdo con la concentración inicial del patógeno en el sustrato. Después de 10 semanas los niveles de la bacteria se encontraron por debajo de 1 log<sub>10</sub> de UFC/g y no se detectó después de 18 semanas. La microbiota asociada tuvo un efecto negativo significativo (p<0.05) en la supervivencia del patógeno. Los niveles de bacterias mesófilas aerobias, hongos y levaduras se mantuvieron entre 6-8 y 3-5 log<sub>10</sub> UFC/g respectivamente. Los Coliformes totales mostraron un comportamiento similar al de *E. coli* O157:H7 con niveles entre 1-3 log<sub>10</sub> UFC/g. La humedad se mantuvo por arriba del 50% mientras que el pH osciló entre 7.0-7.9 sin influir en la supervivencia del patógeno. *E. coli* O157:H7 sobrevivió por 20 días en plantas de lechugas inoculadas por aspersion. Debido al largo tiempo de supervivencia de la bacteria en la tierra y en las hojas de lechuga es necesario aplicar buenas prácticas agrícolas.

## **O12 VALORACIÓN CUANTITATIVA DEL RIESGO DE LISTERIOSIS EN ALIMENTOS LISTOS PARA CONSUMO EN NAVARRA**

V. Garrido, A. I. Vitas, B. Sesma, M. L. Verbo, E. Alonso, I. García-Jalón.

Dpto. Interfacultativo de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra

### **Introducción**

La valoración cuantitativa del riesgo de listeriosis por alimentos constituye un enfoque nuevo en el control sanitario. Frente a la visión clásica basada en límites microbiológicos del alimento al final de la cadena de producción, la valoración del riesgo se dirige a conocer la probabilidad de que se produzcan casos de listeriosis por consumo de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes*. En los últimos 10 años se han declarado en Navarra 3-4 casos esporádicos de listeriosis/año desconociéndose si esta cifra está subestimada y apreciándose una ligera tendencia al alza. Este trabajo se propone iniciar la evaluación del riesgo de listeriosis en Navarra, estudiando los datos disponibles y detectando las carencias que impidan cuantificar este riesgo.

### **Material y Métodos**

Se han seguido las pautas establecidas por USDA y por el Comité de Expertos FAO/OMS:

- a) Tipos de alimentos: Se han analizado diferentes categorías de alimentos incluyendo los considerados de mayor riesgo como son los llamados "listos para el consumo".
- b) Nivel de contaminación: Presencia y recuento de *L. monocytogenes* según ISO 11290-1:1997 y 11290-2:1998 en dos periodos de tiempo (1996-2000) y (2003- 2004).
- c) Características de las cepas aisladas: Mediante biotipado, serotipado y técnicas moleculares.
- d) Población de riesgo: Investigación del porcentaje de población considerada más susceptible a la infección por *Listeria*.
- e) Frecuencia de consumo: Encuesta alimentaria a una muestra de población representativa

### **Resultados**

- a) De los más de 3.000 alimentos analizados, el salmón ahumado y los productos cárnicos cocidos loncheados presentan un alto nivel de contaminación por *L. monocytogenes*, por lo que el estudio ha continuado centrándose en estos alimentos.
- b) El salmón ahumado ha revelado una disminución de la contaminación entre el primero (28%) y el segundo (12,1%) periodo de estudio, mientras que los cárnicos cocidos se han mantenido estables (9,3% y 8,9%). Marca, tipo de envasado y establecimiento de venta influyen en la contaminación.
- c) Se ha encontrado identidad entre cepas clínicas y de origen alimentario, aunque no pudieron asociarse a brotes
- d) La población en riesgo ( 23,9%) se reparte el 93,5% de los casos de listeriosis declarados.
- e) Se ha diseñado una metodología específica, basada en una encuesta alimentaria, pendiente de implantación

### **Conclusión**

No se puede establecer todavía, de forma científica, una valoración cuantitativa del riesgo de listeriosis en Navarra pero se ha avanzado considerablemente en esta metodología detectando las carencias de datos que son precisos para esta evaluación y diseñando la forma de obtenerlos.

## **O13 EFECTO DE LA EVISCERACIÓN EN LA ACUMULACIÓN DE AMINAS BIOGENAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN HIELO DE MERLUZA DEL MEDITERRÁNEO (*Merluccius merluccius*)**

Sonia Baixas-Nogueras, Tommaso Lavizzari, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou  
Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona

Las aminas biógenas (AB) son compuestos básicos que se encuentran en los alimentos debido a la actividad aminoácido descarboxilasa de algunos microorganismos (Halász y col 1994). La pérdida de frescura de la merluza supone la acumulación de cadaverina pero también de otras AB (Baixas-Nogueras y col 2002). Un factor clave en la alteración del pescado es su manipulación post-captura. El descabezado y eviscerado ayudan a disminuir la carga bacteriana pero también exponen al músculo a la entrada de microorganismos. Es crucial realizar esta operación con cuidado. En España la merluza del mediterráneo tradicionalmente se mantiene entera antes de la venta, eviscerándose cuando el comprador lo demanda. Sin embargo, es cada vez más frecuente que el distribuidor se adelante a los deseos del cliente.

### **OBJETIVO**

Estudiar el efecto de la evisceración en la evolución de la carga bacteriana total, enterobacterias y pseudomonas, así como en la acumulación de AB durante el almacenamiento en hielo de la merluza.

### **MÉTODOS**

El estudio se realizó por duplicado manteniendo, en cajas con hielo durante catorce días, la merluza eviscerada (ME) y no eviscerada (MNE) por separado. Las AB se determinaron por HPLC (Veciana-Nogués y col 1995) y los recuentos microbianos según procedimientos estándar.

### **RESULTADOS**

Los recuentos bacterianos fueron ligeramente más bajos en la MNE que en la ME. En el caso de pseudomonas se mantuvo una diferencia de 0,5–1 unidades logarítmicas durante todo el estudio. Los recuentos de enterobacterias, similares en el punto inicial, experimentaron un desarrollo mayor en la ME llegando a diferencias con la MNE de 1,5–2 unidades. Este menor o más tardío desarrollo bacteriano en la MNE se reflejó en una escasa producción de AB. Así, mientras que en la MNE se alcanzaron cifras de 70mg/kg de cadaverina y de 40mg/kg de putrescina, en la ME los contenidos de estas diaminas no superaron los 7mg/kg. La histamina sólo se detectó en ME al final del estudio. La ausencia de histamina así como los bajos niveles de diaminas en la MNE, estaría en concordancia con el bajo crecimiento de las enterobacterias. Este trabajo permite concluir que la no evisceración de la merluza tuvo un efecto favorable en el posterior almacenamiento en hielo, pues supuso una reducción de la carga bacteriana y de la formación de AB.

### **BIBLIOGRAFIA**

Baixas-Nogueras y col 2002, J Food Agric Food Chem, 50: 6504. Veciana-Nogués y col 1995, J AOAC Int 78: 1045. Halász y col 1994, Trends Food Sci Technol 5:42

## **O14 EFECTO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, GRASA DE LECHE HIDROLIZADA Y EMULSIONANTES DE USO ALIMENTARIO EN LA SUPERVIVENCIA DE BIOFILMS DE *Pseudomonas***

Belén Orgaz Martín, Juliana Kives Ostronoff, Carmen San José Serrán  
Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos, UCM, Madrid

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), secretadas por las células en los biofilms, crean una matriz protectora alrededor, que les confieren una resistencia superior a la de las células planctónicas a la desecación y a la acción de productos de limpieza y desinfección. La composición del EPS, aunque dependiente de multitud de factores (género, sustrato, superficie..), incluye, en orden decreciente, agua, carbohidratos y proteínas. Los ácidos orgánicos han sido utilizados por sus propiedades antimicrobianas sobre células en suspensión. En particular, los ácidos grasos de cadena corta, abundantes en la grasa de la leche, presentan estas propiedades. Los surfactantes son moléculas anfipáticas, que disminuyen la tensión superficial, por lo que son comúnmente empleados en la formulación de detergentes.

En el presente trabajo se emplearon surfactantes de uso alimentario de distinta naturaleza (iónicos, no iónicos y ramnolípidos), así como ácidos orgánicos puros (ácido cítrico, ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico y ácido butírico) para la limpieza de los biofilms formados por una cepa de *P. fluorescens* de origen alimentario. Además, se empleó un lipolizado enzimático de nata de leche. Los biofilms objeto de limpieza, fueron desarrollados sobre una superficie de vidrio, empleando un medio mineral para su crecimiento. La eficacia de los distintos tratamientos fue evaluada en términos de biomasa desprendida, por densitometría óptica, y de eliminación de las células del biofilm, por recuento en placa.

Los mejores resultados obtenidos en cuanto a desprendimiento de biomasa, se obtuvieron con los surfactantes iónicos. Los ácidos grasos de cadena corta (4 a 8 C), abundantes en grasa de leche, mostraron una potente acción bactericida. El ácido cítrico, seleccionado también por su acción quelante, fue menos eficaz. También mostraron efecto bactericida, aunque en menor medida, algunos surfactantes y el lipolizado obtenido a partir de grasa de leche. Esto último podría ser tenido en cuenta en el desarrollo de procedimientos de limpieza y desinfección específicos para la industria láctea.

## **O15 SELECCIÓN DE *Penicillium spp.* PRODUCTORES DE PÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS DE INTERÉS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS Y OBTENCIÓN DE FRACCIONES ACTIVAS**

Raquel Acosta<sup>1</sup>, Laureano Frizzo<sup>2</sup>, Elena Bermúdez<sup>1</sup>, Félix Núñez<sup>1</sup>, Miguel Angel Asensio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Higiene de los Alimentos, Universidad de Extremadura, Cáceres

<sup>2</sup>-Universidad Nacional del Litoral, Argentina

Los productos cárnicos madurados ofrecen unas condiciones ecológicas que favorecen el desarrollo de una diversa población fúngica en la superficie. Estos microorganismos pueden contribuir a la maduración, pero también pueden originar defectos o alteraciones, e incluso formar toxinas. Para controlarlos se pueden aprovechar mohos productores de péptidos antifúngicos como cultivos iniciadores. En trabajos previos se han obtenido aislamientos de penicilios cuyo crecimiento en medio sólido inhibe a diversas cepas de mohos habituales en productos cárnicos madurados. Este efecto puede deberse a la producción de péptidos antifúngicos, pero también a micotoxinas o a una simple inhibición competitiva por los nutrientes del medio, por lo que es necesario caracterizar los compuestos responsables de la inhibición.

Se cultivaron 33 aislamientos caracterizados como *Penicillium spp.* en Caldo Extracto de Malta (MEB) y en Caldo Patata Dextrosa (PDB) a 25°C 15 días. El medio libre de células se fraccionó en una columna de Sepharose (HiTrap SP HP, Amersham Biosciences), equilibrada en tampón acetato sódico 20mM (pH 4.5). Tras la elución en un gradiente de NaCl 1M, se obtuvieron 3 fracciones de baja (B), media (M) y alta (A) fuerza iónica. La capacidad de inhibición de dichas fracciones se determinó frente a *Penicillium solitum* cultivado en placas multipocillo.

La fracción B mostró actividad prácticamente en todos los aislamientos cultivados en MEB, siendo mucho menos frecuente al cultivar en PDB. La actividad en la fracción M se ve favorecida al cultivar en MEB. En la fracción A podrían eluir dos compuestos activos diferentes: uno que se produce en los dos medios y que podría resistir el cloroformo, y otro que sólo se observa en MEB, cuya actividad podría perderse al extraer con cloroformo. Además, los compuestos activos de las fracciones M y A sólo excepcionalmente aparecen de forma conjunta. Estos resultados indican que la actividad inhibitoria de diversas especies del género *Penicillium* frente a los mohos más frecuentes en productos cárnicos se debe a distintos compuestos activos, y que la producción de los compuestos de baja y media fuerza iónica se ve favorecida en el medio MEB respecto al medio PDB. No obstante, es preciso evaluar la posible toxicidad de los compuestos activos antes de utilizarlos en alimentos.

Este trabajo se ha realizado con el proyecto AGL2001-0521 (Ministerio de Ciencia y Tecnología y FEDER). Raquel Acosta es beneficiaria de una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología.



## PÓSTERS

Alimentos fermentados P00 - P017

Técnicas moleculares en microbiología de alimentos P018 - P038

Control de calidad en el análisis microbiológico P039 - P047

Tecnologías de la producción y conservación de alimentos P048 - P063

Evaluación de riesgos microbiológicos P064 - P076

Microorganismos patógenos P077 - P086

Virus P087 - P088

Microorganismos alterantes P089 - P095

Aplicación de microorganismos en la bioconservación de alimentos P096 - P100

Microbiología predictiva P101 - P105

Probióticos P106 - P110

Fisiología y metabolismo P111 - P112

Genética microbiana P113 - P114

Otros P115 - P119



### **P001 BACTERIAS LÁCTICAS INICIADORAS DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN VINOS Y PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS**

Fernanda Ruiz-Larrea<sup>1</sup>, Isabel López<sup>1</sup>, Victoria Moreno-Arribas<sup>2</sup>, Carmen Polo<sup>2</sup>, María L. Vaderrama<sup>1</sup>, Beatriz Rojo<sup>1</sup>, Carmen Tenorio<sup>1</sup>, Myriam Zarazaga<sup>1</sup>, Carmen Torres<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>-Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño

<sup>2</sup>-Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid

Ver resúmen O01

### **P002 GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES POR *Debaryomyces hansenii* Y *Penicillium chrysogenum* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y EN CARNE MADURADA**

Mercedes Alonso Candela, Miguel A. Asensio Pérez, Elena Bermúdez Polo, María J. Sosa Zuñil, Félix Núñez Breña

Higiene de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres

Ver resúmen O02

### **P003 VALORACIÓN DEL USO DE CULTIVOS INICIADORES Y ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA COMO OBSTÁCULOS COMBINADOS PARA MEJORAR LA SEGURIDAD DE EMBUTIDOS POCO ÁCIDOS**

Begonya Marcos<sup>1</sup>, Teresa Aymerich<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>, Margarita Garriga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Microbiología y Biotecnología Alimentaria, IRTA-Centro de Tecnología de la Carne, Monells

<sup>2</sup>-EFSA, Bruselas, Bélgica

Ver resúmen O03

### **P004 INTERACCIONES ENTRE LEVADURAS Y BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO EN LA FERMENTACIÓN DE LA LECHE**

Pablo Álvarez, Baltasar Mayo

Instituto de Productos Lácteos de Asturias-CSIC, Villaviciosa

#### **INTRODUCCIÓN**

Entre los microorganismos que acceden a la leche procedentes del ambiente se incluyen diversas especies de levaduras. La capacidad de asimilar o fermentar la lactosa y otros ácidos orgánicos (láctico, cítrico o succínico), así como sus actividades proteolíticas y lipolíticas, posibilitan su multiplicación. Además, las levaduras toleran bajos niveles de pH y  $A_w$  y son capaces de crecer a baja temperatura y en concentraciones elevadas de sal, condiciones corrientes durante la maduración de los productos lácteos. La presencia de estos microorganismos se relaciona, en ocasiones, con una alteración del alimento. En otros casos, por el contrario, su presencia es indispensable para obtener las características organolépticas deseadas. Así, las levaduras son esenciales en la elaboración del kéfir, el koumiss, el viili y otras leches fermentadas europeas y africanas. Están presentes también en la inmensa mayoría de los quesos, si bien con un papel tecnológico poco definido. En todo caso, las levaduras han de interactuar con la microbiota que se desarrolla durante los procesos fermentativos; en especial, con las bacterias del ácido láctico responsables de la acidificación inicial.

El conocimiento de estas interacciones, posibilitará una utilización tecnológica más racional, promoviendo o inhibiendo su crecimiento en función del producto.

#### **METODOLOGÍA**

Nueve cepas de levaduras, pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces* y *Geotrichum*, y cuatro de bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, se inocularon en leche UHT desnatada, por separado y en cocultivo. Tras 48 horas de fermentación a 25°C, se analizó el pH, el número de viables (de levaduras y bacterias), y se cuantificó la producción de ácidos orgánicos (HPLC) y compuestos volátiles (cromatografía de gases).

#### **RESULTADOS**

Las bacterias lácticas utilizadas alcanzan un buen desarrollo en leche (alrededor de  $1,2 \times 10^9$  ufc/ml) e inducen una buena acidificación (pH final entre 4,05 y 4,28). Mientras que, de manera aislada, las levaduras ni se multiplican ni acidifican excesivamente (pH final 6,20-6,68). El comportamiento de ambos tipos no se altera en los cocultivos, aunque la acidificación final es superior en varios casos. Los perfiles de ácidos orgánicos y compuestos volátiles tampoco se modifican sustancialmente. En algunas parejas levadura/bacteria láctica se invierte, aunque no en la misma dirección, la utilización del citrato. Asimismo, en otros casos, se incrementa la producción de compuestos volátiles como el acetaldehído, el acetato de etilo y el 2,3-metil butanol.

## **P005 ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS HIDROFÓBICAS DE LA SUPERFICIE CELULAR DE CEPAS VÍNICAS *S. cerevisiae* CON CAPACIDAD FLOCULANTE**

Carmen Fajardo, Belén Simón, Pilar Hidalgo

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria

En el presente trabajo se han estudiado las características hidrofóbicas superficiales de cepas vínicas (*Saccharomyces cerevisiae*) que presentan capacidad floculante con distinta intensidad, tras ser crecidas en dos medios de cultivo diferentes, con el fin de determinar la posible relación existente entre floculación e hidrofobicidad, así como evaluar la importancia relativa de este tipo de interacción no específica en el mecanismo de agregación de las cepas estudiadas.

Los resultados encontrados señalan que solo en el caso de dos de las cepas floculantes ensayadas en este trabajo, las interacciones hidrofóbicas podrían favorecer el proceso de floculación, mientras que para las restantes cepas estudiadas, la importancia relativa de esta interacción de tipo físico en el mecanismo de agregación de las mismas sería prácticamente despreciable.

El tratamiento estadístico aplicado a los resultados obtenidos ha puesto de manifiesto las diferencias existentes entre las cepas ensayadas en relación a los valores presentados de hidrofobicidad superficial (CSH), si bien, considerando un medio de crecimiento concreto, no se ha encontrado una relación directa entre la capacidad floculante mostrada por las células de levadura y las características hidrofóbicas que manifiestan las mismas, puesto que cepas con el mismo grado de floculación presentan valores distintos de CSH, y de forma inversa, cepas con valores muy semejantes de hidrofobicidad muestran distinta intensidad floculante.

Así mismo, tan solo se han detectado diferencias estadísticamente significativas en las propiedades hidrofóbicas superficiales de dos de las cepas estudiadas al ser cultivadas en los diferentes medios de crecimiento ensayados, por lo que no podemos señalar que este factor ejerza una influencia notable sobre la manifestación de la propiedad superficial en estudio.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos podemos indicar que la relación positiva que se señala en la bibliografía (Jin y Speers, 2000; Jin et al., 2001) existente entre las propiedades hidrofóbicas de pared y la floculación, sería una característica dependiente de la cepa de levadura considerada y no una característica general de las levaduras floculantes.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Jin, YL. y Speers, A. (2000). J. Am. Soc. Brew. Chem., 58, 108-116.

Jin, YL., Ritcey, L., Speers, A. y Dolphin, P. (2001). J. Am. Soc. Brew. Chem., 59, 1-9.

## **P006 CARACTERIZACIÓN ENOLÓGICA DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Saccharomyces* Y SUS HÍBRIDOS**

Sara Susana González González<sup>1</sup>, Eladio Barrio Esparducer<sup>2</sup>, Amparo Querol Simón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Biotecnología. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, Valencia

<sup>2</sup>-Departamento de Genética Evolutiva. Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia

Mediante el uso de distintos marcadores moleculares y su posterior secuenciación, se ha identificado en procesos fermentativos la presencia de híbridos entre diferentes especies del grupo *Saccharomyces* "sensu stricto" (donde se encuentran todas las especies responsables de la elaboración del pan, cerveza, sidra y vino). Se han encontrado tanto híbridos de las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, como híbridos de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*. Hasta el momento, la especie *S. kudriavzevii* sólo ha sido descrita en aislados de ambientes naturales. La presencia de estos híbridos durante la vinificación no es esporádica, ya que diversas levaduras comerciales de amplio uso, erróneamente identificadas como *S. cerevisiae*, son realmente híbridos.

Se realizaron microvinificaciones tanto con los híbridos como con los parentales, con 500 ml de mosto a distintas temperaturas (14, 18, 22 y 30°C) y distintos tipos de mosto (mostos blancos de Parellada y Macabeo, y mostos tintos de Bobal y Tempranillo). Se realizó un seguimiento de las microvinificaciones analizando la cantidad de azúcar consumida mediante grados Brix y el grado alcohólico por transflexión en infrarrojo. En los vinos acabados se analizó, por cromatografía de gases y espectrometría de masas, tanto el perfil aromático, centrándose en la producción de alcoholes superiores, terpenos y ésteres, así como algunos compuestos importantes en la calidad final de los vinos como el ácido acético, ácido málico, glicerol, y acetaldehído utilizando un analizador multicanal selectivo.

Se han encontrado diferencias en el comportamiento de los parentales y sus híbridos durante la fermentación. *S. kudriavzevii* fermenta, en general, de forma más lenta que el resto de levaduras, sin embargo, a 22 °C tiene un comportamiento de fermentación similar a *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Un híbrido de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (S6U) fermenta de forma muy similar a sus parentales, mientras que el otro híbrido de estas especies tiene mayores problemas para fermentar. Los híbridos de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* fermentan mejor vinos blancos y a bajas temperaturas, obteniéndose vinos más aromáticos.

## P007 POTENCIACIÓN DE LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE UN EMBUTIDO CRUDO CURADO MEDIANTE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES

Lorenzo Hoz Perales, Beatriz Herranz Hernández, Eva Hierro Paredes, Manuela Fernández Álvarez, J. Antonio Ordoñez Pereda  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Madrid

Se pretende potenciar la generación de los compuestos responsables del sabor y aroma de embutidos crudos curados mediante el empleo de aminoácidos libres como precursores de dichos compuestos.

Se fabricaron 3 lotes de salchichón: Lote Control (C); Lote L1 (lote control más 0,159% (p/p) de valina, isoleucina y leucina en las proporciones (p/p): (58/35/66) y Lote L2 (lote control más 1,01 % (p/p) de un "pool" de aminoácidos en las proporciones (p/p) (gly/asn/his/arg/thr/ala/pro/tyr/val/met/ile/leu/phe/trp/lys/asp/glu/ser/gln/cys)(19/19/105/41/55/69/90/10/58/27/35/66/35/62/110/56/106/18/19/10).

A los 0, 5, 15 y 22 días de maduración se realizaron los siguientes recuentos microbianos: totales en ágar PCA, bacterias lácticas en ágar MRS en doble capa a pH 5,6 y micrococáceas en ágar MSA. Además, se analizaron los aminoácidos libres y el contenido de amoniaco, los días 0 y 22 de maduración, por RP-HPLC y con el kit enzimático de Boehringer-Mannheim, respectivamente. Por último, al final de la maduración (día 22) se determinaron los compuestos volátiles del espacio de cabeza por GC-MS.

La adición de aminoácidos libres comerciales no afectó a la evolución de la microbiota total y láctica, que fue la habitual para este tipo de productos; sin embargo, se observó en el día 22 que el lote L2 mostró un mayor recuento de micrococáceas que los lotes C y L1. Este hecho se atribuyó a una potenciación de la actividad metabólica del cultivo iniciador debido a una mayor cantidad de aminoácidos libres disponibles.

Los análisis de los aminoácidos libres y amoniaco mostraron en el día 22 que el Lote L2 fue el que presentó las mayores concentraciones, seguido del lote L1 y, finalmente de C, diferenciándose significativamente los tres lotes ( $p < 0,05$ ). Este mayor aumento parece indicar que se produjo, además de la adición de los correspondientes aminoácidos, una potenciación de la proteólisis en una fase tardía.

Respecto al análisis de compuestos volátiles, las principales diferencias se observaron en los compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos y de la actividad microbiana, así se obtuvieron mayores concentraciones de aldehídos ramificados (2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal) y ésteres (3-metiletilbutanoato) en los lotes a los que se adicionaron aminoácidos libres, siendo estos lotes significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) que su control; este hecho pudo deberse probablemente a una estimulación de las micrococáceas por parte de los aminoácidos añadidos.

Trabajo financiado por la CICYT (Proyecto ALI96-0928).

## P008 AUTOLISIS DE LEVADURAS EN SIDRAS ESPUMOSAS. INFLUENCIA EN LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

Noemí Palacios García, Rosa Pando Bedriñana, Roberto Rodríguez Madrera, Anna Picinelli Lobo, Belén Suárez Valles  
Area de Tecnología de los Alimentos, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Villaviciosa, Asturias

La elaboración de sidras espumosas está caracterizada por la fermentación de sidra base, seguida de un periodo de envejecimiento en contacto con las lías. Durante este periodo las levaduras sufren un proceso de autólisis, liberando al medio diferentes compuestos químicos, tales como los aminoácidos, que influyen en la calidad organoléptica de las sidras.

**OBJETIVOS:** Determinar y estudiar los aminoácidos liberados durante el periodo de autólisis de diferentes cepas de levaduras en sidras espumosas.

**MÉTODOS:** Se utilizaron seis cepas de levaduras, tres de ellas aisladas en vinos, y tres aisladas en sidra pertenecientes a la colección de cultivos del SERIDA.

Se realizaron dos ensayos:

- A: a escala de laboratorio se incubaron todas las cepas a 30°C y en agitación, en un medio sintético similar a la sidra (1 g/L ácido acético, 1 g/L ácido láctico, 0.1 g/L  $K_2SO_4$ , 0.025 g/L  $MgSO_4$ , 6% etanol, pH= 3.7).

- B: a escala industrial se fermentaron 2000 litros de sidra base con dos cepas de levaduras, una vínica y otra autóctona de sidra, mediante el método tradicional *Champenoise*.

La cuantificación de aminoácidos se llevó a cabo mediante la técnica cromatográfica RP-HPLC, previa derivatización automática con OPA/3-MCPA y posterior detección a 338 nm.

**RESULTADOS:** Se observó con todas las levaduras estudiadas un aumento generalizado en la concentración de aminoácidos libres durante el ensayo.

A escala de laboratorio e industrial, las levaduras vínicas excretaron al medio una mayor cantidad de aminoácidos que las levaduras autóctonas.

Con independencia del tipo de medio estudiado, los aminoácidos liberados en mayor concentración durante el proceso de autólisis fueron alanina, valina, fenilalanina y leucina; siendo glicina, triptófano y tirosina los minoritarios.

**CONCLUSIONES:** El tipo de cepa influyó en la concentración y en la dinámica de liberación de los aminoácidos. Las levaduras vínicas ensayadas presentaron una mayor capacidad de autólisis que las levaduras de sidra.

El estudio de los aminoácidos mayoritarios excretados es de gran interés a la hora de caracterizar el proceso de autólisis.

## **P009 INCIDENCE OF VIRULENCE FACTORS, ANTIBIOTIC RESISTANCE AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS AMONG ENTEROCOCCI ISOLATED FROM HOMEMADE FERMENTED CAPERS**

Magdalena Martínez Cañamero, Rubén Pérez Pulido, Hikmate Abriouel, Nabil Ben Omar, Rosario Lucas López, Antonio Gálvez  
Dpto. de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén

*Capparis spinosais* a blue-gray spiny plant which grows wild, and tamed, in the dry, desert-like regions located around the Mediterranean Sea. The caper bush grows throughout Spain, Italy, Morocco and Turkey. Fermented capers are highly appreciated as an appetizer in several countries. The fruits are allowed to undergo a natural fermentation during the months of June and/or July and then stabilized in brine.

In an ecological study, 30 enterococci strains were isolated from different homemade caper fermentations from Jaén, Spain. Typing of the strains was done by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR analysis. Enterococcal strains were identified by PCR analysis and 16S rDNA sequencing.

Enterococcal strains were further investigated regarding their safety aspects and involvement in the fermentation. The investigation included incidence of known virulence determinants, antibiotic resistance and functional characteristics. Different and distinct patterns of incidence of virulence determinants were found. A large number of strains were susceptible to clinically relevant antibiotics, but none was resistant to vancomycin. Four of the strains produced bacteriocins. All bacteriocin extracts were active against *Listeria innocua* and *L. monocytogenes*. They were also active against a variable number of *E. faecalis* and *E. faecium* strains. Other interesting properties were their ability to produce a wide spectrum of enzymes.

This work was supported by research project CAL01-059.

## **P010 ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA DE ENTEROCOCOS AISLADOS EN QUESO DE OVEJA**

M<sup>a</sup> Pilar Fernandez Gil, Marta Albisu Aguado, Francisco Jose Perez Elortondo

Area de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad del Pais Vasco, Vitoria-Gasteiz

El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas juega un papel importante en el desarrollo de las características organolépticas durante la maduración del queso. Este sistema está compuesto por proteasas que catalizan la hidrólisis de la caseína a oligopéptidos (algunos de los cuales producen sabor amargo) y peptidasas intra o extracelulares que hidrolizan los péptidos a aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular. Estos compuestos contribuyen directamente al sabor de los quesos ó bien sirven como sustrato en otras reacciones que generan sabores.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la actividad aminopeptidasa extracelular en 98 cepas de *Enterococcus* aisladas de queso Idiazabal y preseleccionadas en base diferentes actividades tecnológicas. Estas cepas pertenecen a las especies *E. faecalis* (39 cepas), *E. faecium* (33 cepas) y *E. durans* (26 cepas).

Las cepas se cultivaron en caldo Elliker a 37°C. Tras centrifugar los cultivos se resuspendió el sedimento en tampón fosfato (pH 7.0). Esa suspensión se utilizó para determinar la actividad aminopeptidasa. Los sustratos empleados fueron L- leucina p-nitroanilina (Leu-NA) y L-prolina p-nitroanilina (Pro-NA).

Los resultados se expresaron como actividad aminopeptidasa, sabiendo que 1 unidad enzimática (UE) corresponde al incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 405 nm min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> de enzima. La actividad aminopéptidasa se expresó como el número de unidades de actividad mg<sup>-1</sup> de proteína presente en el extracto.

Se detectó actividad aminopeptidasa extracelular en todas las cepas con los dos sustratos estudiados siendo dos cepas de *E. faecalis* las que han presentado la mayor actividad Leu-aminopeptidasa (85.496 UE/mg) y Prol-aminopeptidasa (158.314 UE/mg). Entre los *E. faecium* 2 cepas mostraron actividad Leu-aminopeptidasa alta siendo esta 56.37 y 53.44 UE/mg. Con el sustrato Pro-NA 2 cepas de *E. faecium* presentaron actividad de 87.89 y 64.160 UE/mg siendo en el resto de las cepas la actividad inferior a 10 UE/mg en ambos sustratos. Las cepas de *E. durans* estudiadas presentaron actividad baja (menor a 10 UE/mg) frente a los dos sustratos.

La disparidad de actividades enzimáticas encontradas entre cepas de la misma especie, hecho descrito ya en otras especies de LAB, confirma la necesidad de realizar estudios a nivel de cada cepa si se quiere llevar a cabo una selección adecuada de las bacterias para su adición en el cultivo iniciador.

Este estudio ha sido realizado gracias a la financiación concedida por la UPV/EHU con el Proyecto I/UPV/EHU00101.125-TA-8075/2000.

## P01 I INCIDENCIA DE OCRATOXINA A EN CERVEZAS CONSUMIDAS EN ESPAÑA

Angel Medina Vayá<sup>1</sup>, Francisco Manuel Valle Algarra<sup>2</sup>, Laila Aledón Andújar<sup>1</sup>, Rufino Mateo Castro<sup>2</sup>, Jose Vicente Gimeno Adelantado<sup>2</sup>, Misericordia Jiménez Escamilla<sup>1</sup>

1-Dpt. de Microbiología i Ecología, Universitat de València, Burjassot

2-Dpt. de Química Analítica, Universitat de València, Burjassot

La cerveza es una bebida de amplio consumo en todo el mundo. En España, el consumo de cerveza per cápita al año es superior a 70 litros. Es conocido que los cereales usados en el proceso de fabricación de la cerveza son muy susceptibles a la contaminación con hongos potencialmente productores de micotoxinas.

En los últimos años la alta incidencia de la ocratoxina A (OTA) en cereales y otros productos habituales en la dieta como vino y café ha atraído la atención de las autoridades sanitarias, empresas agroalimentarias y asociaciones de consumidores. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer ha considerado a la OTA como un compuesto muy tóxico. Como consecuencia de ello, recientemente se ha publicado una legislación para esta micotoxina común para todos los países que integran la Unión Europea.

La descripción de la presencia de OTA en cerveza con anterioridad a la década de los 90 es escasa debido a que en los 6 estudios de prospección que se han realizado, en cervezas europeas y americanas, los resultados han indicado escasos niveles y en la mayor parte de los casos ausencia de la toxina. Ahora bien hay que tener en cuenta que los límites de detección de los procedimientos analíticos utilizados en estos trabajos oscilaban entre 1 y 10 ng/ml y esta puede ser la razón por la que se registran niveles de incidencia muy bajos. En la actualidad el empleo de una metodología más adecuada está proporcionando resultados preocupantes.

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la incidencia de OTA en cervezas comercializadas y consumidas en España mediante el empleo de una metodología analítica previamente optimizada en nuestro laboratorio.

Se analizaron un total de 88 muestras de cerveza de diversas marcas. 31 de fabricación nacional y 57 de importación. Las muestras fueron obtenidas en locales de venta directa al público del mercado español.

Para su análisis, las muestras fueron desgasificadas en un baño de ultrasonidos y tras un proceso de purificación y limpieza, la OTA fue analizada mediante cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia. (LC-FLD).

Los resultados obtenidos indican que el 84% de las cervezas de fabricación nacional y el 82% de las cervezas de importación están contaminadas con OTA. Los niveles medios de OTA que se registraron fueron de 0.0358 ng/ml (no detectada - 0.1468 ng/ml) para las primeras y de 0.0469 ng/ml (no detectada-0.2042 ng/ml) para las segundas.

## P012 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Lactococcus* DE INTERÉS PARA LA INDUSTRIA LÁCTEA

Daniel Bravo, Antonia Picón, Margarita Medina

Tecnología de los Alimentos, INIA, Madrid

Las medidas de control microbiológico, el ordeño mecánico y la refrigeración de la leche, están siendo responsables del progresivo empobrecimiento de la biodiversidad, especialmente en las bacterias lácticas, lo que conlleva una pérdida de aromas y sabores tradicionales en los quesos. Nuestro objetivo es crear una colección de *Lactococcus* con interés industrial y que permita preservar nuestros recursos genéticos, especialmente los implicados en la elaboración de quesos con Denominación de Origen.

Se aislaron 176 colonias de placas de MRS y MRS pH 5.7 sembradas a partir de las cuajadas fabricadas con leche cruda de oveja procedente de cinco productores de queso Zamorano con D.O.

Se seleccionaron 69 aislados capaces de coagular la leche en 6 horas, que se identificaron mediante técnicas de biología molecular como *L. lactis* subsp. *lactis* (36 aislados), *L. lactis* subsp. *cremoris* (28 aislados) y 5 *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (5 aislados).

Se determinaron algunas propiedades de interés tecnológico: actividad acidificante en leche inoculada al 1%, actividad proteolítica en leche y producción de compuestos antimicrobianos en placas de MRS con  $\beta$ -glicerofosfato y *Lactobacillus buchneri* ST2A como indicador.

Se seleccionaron un total de 48 aislados capaces de reducir el pH de la leche a valores inferiores a 6.0 tras 6 horas de incubación a 30°C o de producir compuestos antimicrobianos.

Un total de 15 aislados dieron lugar a halos de inhibición del crecimiento del indicador. Mediante la amplificación de los genes estructurales de bacteriocinas conocidas se comprobó la presencia de los determinantes de nisina en 10 de los aislados y de lacticina 481 en 5.

Los 48 aislados seleccionados se identificaron a nivel de cepa mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE) tras la digestión enzimática del ADN total con la endonucleasa de restricción *Sma*I. Los aislados que mostraron un perfil idéntico o casi idéntico, fueron nuevamente analizados por PFGE, tras la digestión del ADN con *Xba*I. La técnica permitió adscribir nuestros aislados a 26 grupos diferentes.

## **P013 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO Y ACTIVIDAD KILLER EN LEVADURAS AISLADAS DEL PROCESADO DE ACEITUNAS DE MESA PARA LA SELECCIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR**

Alejandro Hernández León, Francisco Pérez Nevado, María de Guía Córdoba Ramos, Emilio Aranda Medina, Alberto Martín González

Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura

En la elaboración de aceitunas de mesa, la etapa de fermentación es la más importante para la obtención de unas cualidades sensoriales aceptables en el producto final. En esta etapa se instaura una microflora característica donde, además de bacterias ácido lácticas, intervienen levaduras. Aunque algunas especies de levaduras han sido relacionadas con procesos alterantes de las aceitunas de mesa, trabajos más recientes han atribuido a estos microorganismos un importante papel en el desarrollo de las características sensoriales propias de este producto. De la selección y utilización como cultivo iniciador de levaduras con adecuadas características tecnológicas puede derivar un producto de mayor calidad. El estudio del metabolismo de los hidratos de carbono mediante la determinación de producción de ácidos es un criterio importante para la selección de cepas de levaduras con estos fines. Por otro lado, la selección de cepas con actividad killer favorecería la implantación del cultivo iniciador así como la rápida inhibición de otras levaduras indeseables.

Para este trabajo, se aislaron 49 cepas de levaduras de distintas etapas del procesado de aceitunas de mesa (materia prima, fermentación y envasado) en las que se han estudiado la producción de ácidos orgánicos tras su incubación en un medio rico en hidratos de carbono, así como su actividad killer a distintos pHs.

La mayoría de las levaduras estudiadas mostraron capacidad de producir cantidades variables de ácido acético mediante la fermentación de los azúcares. En la mayoría de los casos, se observó que éstas no modificaban significativamente las concentraciones de ácido láctico presentes en el medio. La única excepción fue una cepa de *Candida inconspicua* aislada del producto final que aumentó la concentración de ácido láctico, por lo que se consideró el aislamiento más adecuado para la fermentación de las aceitunas de mesa teniendo en cuenta este criterio.

Al analizar la actividad killer de las levaduras aisladas, se detectaron cepas killer en todas las etapas de elaboración. Las levaduras killer fueron más abundantes en el producto final (37,5%) que en la materia prima (27,3%) y en los fermentadores (4,5%). Dichas levaduras manifestaron este fenotipo a los pHs empleados en el proceso de elaboración de aceitunas de mesa (pH 3,5-4). En base a este criterio, las más adecuadas para su empleo como cultivo iniciador, serían las levaduras aisladas del producto final con capacidad de producir la toxina killer a pH 3,5-4. Todas esas cepas habían sido identificadas previamente como *C. lambica* y *C. inconspicua*.

## **P014 SELECCIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR DE MICROCOCÁCEAS PARA LA ELABORACIÓN DE EMBUTIDOS DE CERDO IBÉRICO, EN BASE A LA RESISTENCIA A BAJAS ACTIVIDADES DE AGUA, CAPACIDAD PROTEOLÍTICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Blanca Colín Cano, María José Benito Bernáldez, Alberto Martín González, Francisco Pérez Nevado, María de Guía Córdoba Ramos  
Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura

El sector cárnico tradicional del cerdo ibérico está sujeto a problemas de normalización y homogenización, siendo la industria charcinera la que presenta una mayor variabilidad del producto terminado. El empleo de cultivos iniciadores autóctonos ofrecería una serie de ventajas tanto al industrial como al consumidor. La homogeneidad en el producto es una de ellas, permitiendo controlar y dirigir el metabolismo bacteriano hacia la optimización de las características sensoriales de los embutidos. Además, la inhibición de los microorganismos alterantes y patógenos revertiría económicamente en el industrial con una reducción del número de piezas defectuosas y un aumento de la calidad higiénica de sus productos.

Las especies del género *Micrococcus* y *Staphylococcus* constituyen parte importante de la población microbiana de los embutidos. Dichos microorganismos participan de forma significativa en el desarrollo de diferentes características sensoriales de estos productos. Además de aptitudes tecnológicas, las cepas de micrococáceas que formen parte de un cultivo iniciador deben poseer una buena adaptación a las condiciones del procesado de los embutidos ibéricos, así como la capacidad de competir con otros microorganismos indeseables capaces de proliferar.

En este trabajo se pretendió seleccionar cepas de micrococáceas para su posible inclusión en un cultivo iniciador, que estuvieran bien adaptadas a las actividades de agua encontradas en los embutidos, con una alta actividad proteolítica y con actividad antimicrobiana frente a microorganismos indeseables. Se investigaron un total de 83 cepas de micrococáceas aisladas de 4 procesados, analizando su crecimiento en medios con actividades de agua de 0,80, 0,85, 0,90 y 0,95. La mayoría de ellas mostraron un buen crecimiento hasta  $a_w$  de 0,85 estimándose adecuada para el crecimiento en los embutidos ibéricos.

Para determinar la actividad proteolítica se utilizó seroalbúmina bovina, determinándose la capacidad de hidrólisis mediante SDS-PAGE. El 75 % de las cepas estudiadas presentaron una actividad proteolítica moderada o alta, siendo el género *Staphylococcus* el más proteolítico.

Se analizó la capacidad de las micrococáceas de producir compuestos inhibidores del crecimiento de microorganismos alterantes en embutidos. Del total de aislamientos, 17 cepas de *S. xyloso* mostraron actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y 17 cepas mostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Según los criterios de selección seguidos, las cepas de *S. xyloso* SM2M69, SR3M33 y SR3M35 fueron las más adecuadas para su inclusión en un cultivo iniciador.

## P015 BACTERIAS LÁCTICAS HISTAMINA POSTIVAS AISLADAS DE QUESOS ELABORADOS CON LECHE CRUDA

Rosa Carbó<sup>1</sup>, Marika Breccia<sup>2</sup>, Michela Maifreni<sup>2</sup>, Francesc Sepulcre<sup>3</sup>, Luís Del Valle<sup>3</sup>

<sup>1</sup>-Enginyeria Alimentària i Biotecnologia, Escola d'Agricultura, Barcelona

<sup>2</sup>-Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine, Udine, Italy

<sup>3</sup>-Enginyeria Alimentària i Biotecnologia, Escola Universitària d' Enginyeria Tècnica Industrial, Barcelona

La presencia de histamina en quesos causa intoxicación alimentaria. La histamina se produce por la descarboxilación de la histidina siendo la histidina descarboxilasa (hdc) la responsable de la bioconversión del aminoácido. La histamina en quesos puede ser producida por bacterias alteradoras y bacterias lácticas. El objetivo de este estudio es determinar la presencia de cepas lácticas potencialmente productoras de histamina procedentes de quesos elaborados con leche no pasteurizada.

Se aislaron bacterias lácticas de 4 quesos típicos de distintas zonas de España que tenían en común haberse elaborado a partir de leche cruda y además presentar un tiempo de maduración de entre 5-6 meses. Dos de los quesos se elaboraron por coagulación enzimática con cuajo vegetal y dos por coagulación mixta añadiendo estárter láctico.

Las bacterias lácticas se aislaron en agar MRS, agar Mayeux y agar M17 en condiciones microaerófilas; una vez crecidas las colonias, se escogieron 5 de cada uno de los medios y para cada queso. Las 15 cepas aisladas de cada queso se purificaron y se realizó la tinción Gram y la prueba de la catalasa para confirmar que se trataba de bacterias lácticas. La presencia del gen de la hdc fue determinado por PCR.

Los resultados demostraron pocas diferencias en el recuento de bacterias lácticas, Así, quesos de coagulación ácida y de coagulación mixta presentaron valores similares. En los 4 quesos los recuentos oscilaban entre 6 y 8 log ufc/g correspondiendo los valores más elevados a los realizados en MRS.

El 64% de las bacterias lácticas aisladas a partir de los 4 quesos estudiados fueron histamina +. Y además, se encontraron proporciones similares de las cepas histamina + en cada uno de los quesos independientemente del tipo de elaboración.

La mayor proporción de cepas histamina + procedían de los aislamientos realizados en agar Mayeux, luego en MRS y en menor proporción en M17. Considerando sólo las cepas aisladas en agar Mayeux se observó que el 76,5% de las mismas eran productoras de histamina.

Los resultados obtenidos demuestran que, ante la elevada probabilidad de que se encuentren cepas lácticas productoras de histamina, es necesario elaborar quesos con leche de máxima calidad, extremar las prácticas higiénicas y, dependiendo del tipo de queso, utilizar adecuadamente el estárter láctico para que domine durante el proceso de elaboración.

## P016 EVALUACIÓN HIGIÉNICO SANITARIA DEL EQUIPAMIENTO Y PRODUCTOS EN FÁBRICAS DE EMBUTIDOS TRADICIONALES EN CATALUÑA

Margarita Garriga<sup>1</sup>, Silvana Fadda<sup>1</sup>, Teresa Aymerich<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Microbiología y Biotecnología Alimentarias, Centro de Tecnología de la Carne, IRTA, Monells

<sup>2</sup>-EFSA, Bruselas, Bélgica

La calidad y la seguridad alimentarias son prioridades de los consumidores actuales, que a su vez aprecian cada vez mas aquellos productos "tradicionales", ricos en connotaciones sensoriales diversas. Los embutidos, producidos de forma mas o menos artesanal en fábricas pequeñas, poseen una microbiota compleja que proviene tanto de la propia materia prima como de la manipulación y del ambiente de manufacturación (máquinas, instalaciones, etc.). El objetivo principal del proyecto europeo en que se enmarca este estudio es evaluar y mejorar la seguridad de los embutidos tradicionales, desde el productor hasta el consumidor. En este trabajo se determinó la calidad higiénico-sanitaria de diez empresas representativas del sector. Para ello se determinó la contaminación superficial de máquinas (picadora, amasadora, embutidora), mesas de trabajo, cuchillos, cámara fría, valorándose microbiota patógena, deteriorante y tecnológica. Asimismo se analizó un producto tipo para cada empresa, durante el proceso de maduración.

Las superficies que registraron mayor contaminación microbiana fueron, en general, la picadora, la embutidora y las mesas, observándose una gran variabilidad de recuentos entre las 10 fábricas investigadas. En general, hongos/levaduras, bacterias lácticas y *Staphylococcus/Kocuria* estuvieron presentes en todos los obradores investigados. *S. aureus* registró valores por debajo del límite de detección, en general, en todas las superficies muestreadas. *L. monocytogenes* fue detectada en 3 puntos distintos (picadora, mesas, cámara fría) únicamente en una de las fábricas. *Salmonella* no fue detectada en ninguna de las 60 muestras de superficie analizadas.

En cuanto a los embutidos, la microbiota principal estuvo compuesta por hongos/levaduras, bacterias lácticas y *Staphylococcus/Kocuria*, con recuentos promedio de 5,31, 7,62 y 5,86 (log ufc/g) respectivamente.

El recuento de enterobacterias y *Pseudomonas* disminuyó a lo largo del proceso en, prácticamente, todos los productos estudiados, mientras que los enterococos se mantuvieron, en general, en los recuentos obtenidos en la mezcla inicial.

Aunque *L. monocytogenes* y *Salmonella* fueron detectadas por PCR (presencia en 25 g) en las mezclas iniciales, en ningún caso se obtuvieron resultados positivos en producto acabado, registrándose para ambos patógenos ausencia en 25 g. *E. coli* verotoxigénica no fue detectada en ningún caso.

## **P017 MICROBIOTA DE INTERÉS TECNOLÓGICO Y BIODIVERSIDAD EN EMBUTIDOS POCO ÁCIDOS**

Teresa Aymerich<sup>1</sup>, Belén Martín<sup>1</sup>, Margarita Garriga<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>

1-Microbiología y Biotecnología Alimentarias, Centro de Tecnología de la Carne, IRTA, Monells

2- EFSA, Bruselas, Bélgica

Los embutidos poco ácidos están compuestos por un amplia variedad de productos regionales muy apreciados por el consumidor. La microbiota endógena, que confiere al producto sus propiedades organolépticas típicas, así como los procesos de producción no han sido estudiados en profundidad.

En este estudio se ha tipificado la microbiota de interés tecnológico (251 de bacterias lácticas y 238 de cocos gram-positivos catalasa-positivos (CG+)) de 21 productos comerciales (salchichón, fuet y chorizo poco ácidos). Para tal fin se han diseñado y/o seleccionado cebadores específicos para la identificación mediante técnicas de PCR de seis especies de bacterias del ácido láctico y seis de CG+. Aquellas colonias que no pudieron ser identificadas mediante las técnicas propuestas, se identificaron por secuenciación parcial del 16s rRNA y/o *SodA*. La biodiversidad a nivel de cepa se determinó mediante perfil plasmídico y RAPD.

El 75% de las colonias de bacterias lácticas se identificaron como *Lactobacillus sakei*, un 20% como *Lactobacillus curvatus* y un 5% como *Leuconostoc mesenteroides*. A nivel de cepa se pudieron identificar 109 cepas diferentes, 88 pertenecientes a *L.sakei*, 13 a *L.curvatus* y 4 a *Leuconostoc*.

Entre los CG+, la mayoría de colonias estudiadas pertenecieron a *Staphylococcus xylosus* (89%), el resto a *Staphylococcus warneri* (6,5%) y *Staphylococcus carnosus* (4,5%). A nivel de cepa se pudieron diferenciar 148 perfiles de RAPD mostrando la biodiversidad presente en las muestras analizadas.

## **P018 PCR A TIEMPO REAL-SYBR GREEN I PARA DETECCIÓN DE *Bacillus cereus* TOXIGÉNICOS**

Juan Fco. Martínez-Blanch<sup>1,4</sup>, Beatriz Pinto<sup>4</sup>, M<sup>a</sup> José Ocio<sup>2,4</sup>, Esperanza Garay<sup>1,3</sup>, Rosa Aznar<sup>3,4</sup>

1-Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Univ. de Valencia, Edif. de Investigación Jeroni Muñoz, Campus de Burjassot, Valencia

2-Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Universidad de Valencia

3-Departamento de Microbiología y Ecología, Univ. de Valencia

4-Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC, Valencia

Ver resumen O06

## **P019 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE UN TIPO EMERGENTE DE *Salmonella* SEROTIPO typhimurium QUE PORTA UN PLÁSMIDO HÍBRIDO DE VIRULENCIA-RESISTENCIA A ANTI-MICROBIANOS (pUO-StVR2)**

Ana Herrero<sup>1</sup>, María Rosario Rodicio<sup>1</sup>, Noelia Martínez<sup>1</sup>, Irene Rodríguez<sup>1</sup>, María Cruz Martín<sup>1</sup>, María Angeles González-Hevia<sup>2</sup>, María Carmen Mendoza<sup>1</sup>

1-Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo

2-Laboratorio de Salud Pública, Principado de Asturias, Oviedo

Ver resumen O07

## **P020 DIVERSIDAD Y EVOLUCIÓN MICROBIANA EN EL QUESO DE CABRALES MEDIANTE PCR-DGGE**

Ana Belén Flórez, Baltasar Mayo

Instituto de Productos Lácteos de Asturias-CSIC, Villaviciosa

### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

Las técnicas microbiológicas de cultivo proporcionan una visión incompleta de la diversidad, distribución y evolución microbiana en hábitats naturales complejos, ya que muchos microorganismos no se recuperan porque requieren factores de crecimiento asociados al nicho ecológico o se encuentran en estados fisiológicos no revivificables. En los últimos años, se han desarrollado diversas técnicas moleculares independientes de cultivo para paliar estas limitaciones. Entre las más utilizadas, tenemos aquellas que analizan los genes del ARNr 16S, amplificados previamente por PCR. La DGGE ("denaturing gradient gel electrophoresis") se basa en la diferenciación de amplicones de ADN con distinta secuencia mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

El Cabrales es el más conocido de los quesos tradicionales españoles enmohecidos en su interior por el desarrollo de *Penicillium roqueforti*, responsable de gran parte de sus cualidades sensoriales. Debido a su singularidad, es uno de los quesos tradicionales más caracterizado físico-química y microbiológicamente. En este trabajo empleamos la DGGE para estudiar la diversidad y evolución microbianas a lo largo de la elaboración y maduración, comparando los resultados con los de la metodología convencional.

## METODOLOGÍA

Se han estudiado cuatro fabricaciones artesanales de queso de Cabrales de dos elaboradores distintos, analizándose las muestras de leche, cuajada y quesos de 3, 7, 15, 30, 60 y 90 días. ADN microbiano total de estas muestras se utilizó como molde en reacciones de PCR para amplificar la región variable V3 de las bacterias y los dominios D1-D2 de los eucariotas. Los amplificones se separaron después por DGGE a 60[deg]C en geles de poliacrilamida con un gradiente de urea-formamida en un equipo DCode (Bio-Rad). Tras tinción con bromuro de etidio, las bandas se aislaron de los geles, se reamplificaron y se identificaron por secuenciación.

## RESULTADOS

Los perfiles de bandas presentaron diferencias entre las muestras de distintas elaboraciones, indicando una evolución microbiana distinta cada vez. La banda bacteriana mayoritaria se correspondió con *Lactococcus lactis*, presente en todas las muestras. A su lado, aparecen en menor proporción (y con distinta evolución) otras especies del género como *Lactococcus raffinolactis* y *Lactococcus garviae*, no detectadas en los cultivos en M17. Entre los días 7 y 15, se hacen visibles las bandas de los lactobacilos mayoritarios: *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*. En el caso de los organismos eucariotas observamos al menos seis bandas con diferente migración que, en estos momentos, están siendo analizadas.

## P021 CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE *Listeria spp.* Y *Listeria monocytogenes* MEDIANTE EL EMPLEO DE UN SISTEMA DUPLEX DE PCR A TIEMPO REAL

David Rodríguez-Lázaro<sup>1</sup>, Marta Hernández<sup>2</sup>, María Pla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-INTEA, Universidad de Girona

<sup>2</sup>-Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBMB-CSIC), Barcelona.

*Listeria monocytogenes* es un patógeno de origen alimentario que ha causado multitud de brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos. Sin embargo, *L. monocytogenes* generalmente coexiste con otras especies apatógenas de este género como *L. innocua*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*. La normativa vigente en la mayoría de los países tiene un criterio de tolerancia cero para *L. monocytogenes* en alimentos listos para su consumo, aunque, sin embargo, la ICMSF ha concluido que la dosis infectiva mínima debe ser superior a las 100 ufc para personas fuera de los grupos de riesgo. La disponibilidad de un método rápido capaz de cuantificar tanto *Listeria spp.* como *L. monocytogenes* en alimentos podría ser una herramienta de gran utilidad para el desarrollo de planes de aseguramiento del riesgo microbiológico.

En este trabajo se describe un sistema de PCR a tiempo real en formato dúplex para la cuantificación simultánea de *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes*. Mediante este sistema es posible la cuantificación de cualquier miembro del género *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*) así como del patógeno *L. monocytogenes* en una única reacción de PCR al emplear dos sondas fluorescentes marcadas con fluorocromos diferentes; FAM para *L. monocytogenes* y VIC para *Listeria spp.* Los genes seleccionados para la amplificación y detección específica de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* fueron los genes 23S rDNA y *hly*, respectivamente.

El sistema desarrollado fue altamente eficiente (mayores a 0.996) y 100% específico (permitió la correcta detección simultánea de 52 cepas de *L. monocytogenes* y 120 cepas de *Listeria spp.*). El límite de detección alcanzado fue de una célula en el 100% (*Listeria spp.*) y el 56% (*L. monocytogenes*) de las reacciones. Además, la linealidad del sistema fue excelente a lo largo de un rango dinámico de 5 órdenes de magnitud (valores de R<sup>2</sup> superiores a 0,995 en ambos casos). Consecuentemente, este sistema permite la cuantificación de ambos especímenes, presentando un límite de cuantificación de 30 células en ambos casos. En conclusión, en este trabajo se describe, por primera vez, un sistema duplex de PCR a tiempo real específico y sensible para la cuantificación simultánea de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes*. Supone además una alternativa prometedora a los métodos microbiológicos usados en los laboratorios de análisis de alimentos. Este sistema puede ser aplicado satisfactoriamente para evaluar la incidencia de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* en las plantas de procesamiento de alimentos así como en alimentos crudos y procesados.

## P022 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA (RAPD-PCR) DE LA MICROBIOTA LÁCTICA DE SALMUERAS PROCEDENTES DE TRES INDUSTRIAS ELABORADORAS DE “BERENJENAS DE ALMAGRO”

Susana Seseña<sup>2</sup>, Isabel Sánchez<sup>1</sup>, María de los Llanos Palop<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Real

<sup>2</sup>-Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Toledo

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la caracterización genética de la microflora láctica obtenida de las salmueras de fermentación tomadas en tres empresas con elaboración artesanal de “Berenjenas de Almagro”, mediante la aplicación de la técnica RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras: Salmueras tomadas en los distintos días de fermentación en tres empresas elaboradoras de “Berenjenas de Almagro”, fueron sembradas en agar MRS (MRSa) y los aislados obtenidos de las placas utilizadas en los recuentos, fueron resembrados

hasta su purificación. 12 cepas de referencia de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* obtenidas de la CECT, fueron analizadas conjuntamente con nuestros aislados, lo que permitió la identificación preliminar de los mismos.

Métodos: Para la caracterización genotípica de los aislados se aplicó la técnica RAPD-PCR, con los primers OPL-05 (ACG-CAGGCAC) y LP-1 (ACGCGCCCT), a los extractos de ADN que se obtuvieron según el método descrito por Veyrat *et al.* (1999). El análisis de los perfiles de polimorfismo se realizó con el software informático GelCompar 2.5 (Vauterin and Vauterin, 1992) y el análisis cluster mediante la aplicación del algoritmo UPGMA, lo que permitió la construcción del correspondiente dendrograma de similitud.

La identificación definitiva de los aislados se realizó siguiendo las descripciones taxonómicas de Wood y Holzapel (1995), realizándose pruebas bioquímicas (tiras API, producción de CO<sub>2</sub> de la glucosa y de NH<sub>3</sub> de la arginina) y ensayos fisiológicos (crecimiento a 5, 15 y 45 °C y en presencia de 4, 6,5 y 8% de ClNa).

## RESULTADOS

De las placas de MRSA se obtuvieron un total de 700 aislados, de los que 510 fueron Gram positivo y catalasa negativo y fueron por ello genéticamente caracterizados. Los resultados obtenidos hasta el momento permiten concluir que en dos de las 3 industrias estudiadas, las especies del género *Lactobacillus* son las que predominan en la fermentación, mientras que en la empresa restante no tiene lugar una fermentación láctica, observándose en todo el proceso un claro predominio de levaduras, que parecen impedir la implantación de la flora láctica.

## BIBLIOGRAFÍA

Veyrat, A.; Miralles, M.C. y Pérez-Martínez, G. (1999). *Int. J. Food Microbiol.* 87: 49-61.

Vauterin, L. y Vauterin, P. (1992). *Eur. Microbiol.* 1: 37-41.

Wood, B.J.B. y Holzapel, W.H. (1995). Vol. 2. Blackie Academic.

## P023 COMPARACIÓN DE LA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN CARNE DE POLLO MEDIANTE PCR Y RT-PCR

Jaime Navas Fernández, Sagrario Ortíz Jareño, Joaquín V. Martínez Suárez  
Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid

## INTRODUCCIÓN

La detección de células viables de patógenos bacterianos que pueden resultar dañadas tras los tratamientos térmicos de los alimentos es esencial para la seguridad alimentaria.

## METODOLOGÍA

Con dicho objetivo hemos llevado a cabo una transcripción inversa y una doble reacción en cadena de la polimerasa (nested RT-PCR) con poblaciones de dos cepas de *Listeria monocytogenes* (serotipos 1/2a y 4b) dañadas mediante tratamiento térmico (60° C, hasta conseguir más del 90% de células dañadas) y conservadas tras el tratamiento térmico a temperatura de refrigeración. La RT-PCR específica se dirigió al gen *iap* (invasión associated protein), empleando un protocolo de lisis celular que no precisa aislamiento del RNA. Las muestras consistieron en 25 g de carne picada de pollo inoculadas artificialmente con diluciones decimales de células previamente dañadas. Se emplearon las condiciones de enriquecimiento del método del USDA-FIS para analizar el crecimiento de *L. monocytogenes* y su detección mediante PCR y RT-PCR.

Este protocolo se ha llevado a cabo igualmente con células viables (no sometidas a tratamiento térmico), y con células no viables (tratamiento térmico a 100° C).

## RESULTADOS

A partir de las muestras de carne, se pudo detectar hasta 1 célula dañada por g mediante cultivo. Para descartar los cultivos negativos e identificar *L. monocytogenes* en los positivos se precisan, como mínimo, 3 y 5 días, respectivamente. La detección por PCR acortó ese tiempo, identificando la especie a partir del enriquecimiento primario (24 h.).

El límite de detección de *L. monocytogenes* mediante PCR o RT-PCR fue de 10-100 células. Con células dañadas se han obtenido resultados positivos por PCR, que resultaron negativos por RT-PCR y cultivo, correspondientes a muestras con números de células viables inferiores al límite de detección de la PCR. Estos positivos, se deberían, probablemente, al DNA de células no viables.

La detección por RT-PCR también permitió identificar *L. monocytogenes* a partir del enriquecimiento primario (24 h.), pero no dio lugar a falsos positivos.

## CONCLUSIONES

Los métodos de detección molecular se han de validar con alimentos sometidos a los tratamientos empleados habitualmente para eliminar los patógenos. La PCR convencional puede amplificar DNA libre o DNA de células no viables. Por el contrario, la detección de mRNA indica la presencia de células viables y, si se escoge una diana apropiada, se puede conseguir la especificidad y sensibilidad propias de la PCR.

## **P024 DINÁMICA POBLACIONAL DE LEVADURAS EN FERMENTACIONES ESPONTÁNEAS DE MOSTOS DE MANZANA**

Rosa Pando Bedriñana<sup>1</sup>, Amparo Querol Simón<sup>2</sup>, Norman Fernández Tascón<sup>1</sup>, Ana García Hevia<sup>1</sup>, Belén Suárez Valles<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Villaviciosa, Asturias

<sup>2</sup>-Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC), Burjassot, Valencia

La sidra natural en Asturias se elabora de forma tradicional mediante la fermentación espontánea del mosto. En esta transformación está implicada la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levaduras. La diversidad de esta población puede estar afectada por varios factores tales como la materia prima, la climatología y la tecnología de elaboración utilizada.

### **OBJETIVOS**

Determinar, en distintas etapas de la fermentación, la diversidad y dinámica poblacional de levaduras durante dos años consecutivos en un lagar que utiliza diferentes tecnologías de elaboración.

### **MÉTODOS**

Los métodos de elaboración estudiados fueron:

a) sistema tradicional: prensado lento (hidráulica)/ fermentación en toneles de castaño.

b) sistema alternativo: prensado rápido (neumática)/ fermentación en tanques de acero inoxidable.

Se muestreó una unidad experimental por cada sistema de elaboración en 4 estadíos de la fermentación alcohólica por año.

El crecimiento de las levaduras se determinó mediante recuento en Agar Extracto de Malta adicionado con penicilina G y estreptomicina sulfato. A partir de este medio se aislaron e identificaron 50 colonias por muestra. La identificación se llevó a cabo mediante RFLP de la zona 5.8S- ITS del DNAr (Esteve-Zaroso y col., 1999; Fernández Espinar y col., 2000).

### **RESULTADOS**

Se aislaron un total de 800 colonias de levaduras; un 59.5% pertenecieron al género *Saccharomyces*, de éstas, el 61.4% fueron *S. bayanus* y 38.6% *S. cerevisiae*. En todas las unidades experimentales *S. bayanus* predominó en las primeras etapas y *S. cerevisiae* en los últimos estadios de la fermentación.

La mayor diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* se observó en las primeras etapas del proceso. La proporción de este grupo fue mayor en los mostos obtenidos con prensas neumáticas, observando diferencias en cuanto a especies mayoritarias en las distintas campañas. Las especies identificadas fueron: *H. valbyensis*, *H. uvarum*, *H. osmophila*, *M. pulcherrima*, y *P. guilliermondii*.

### **CONCLUSIONES**

Las especies *Saccharomyces* se desarrollan de forma secuencial durante el proceso de fermentación. El sistema de elaboración y la materia prima sólo influyó en la dinámica poblacional de las levaduras no-*Saccharomyces*.

## **P025 ESTUDIO DEL GRADO DE IMPLANTACIÓN DE LEVADURAS SELECCIONADAS COMERCIALES EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES DE LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN “VINOS DE MADRID”, MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE**

M<sup>a</sup> del Mar Gil Díaz, Teresa Arroyo Casado, Juan Mariano Cabellos Caballero

Calidad Agroalimentaria, IMIA, Alcalá de Henares, Madrid

El empleo de levaduras secas activas (LSA) comerciales está muy extendido actualmente en la elaboración de vinos. Sin embargo, estas levaduras a veces no llegan a dominar en la fermentación, por lo que se hace necesario realizar un seguimiento de su evolución durante el proceso fermentativo. Para ello se requieren técnicas capaces de diferenciar las cepas de levaduras inoculadas de las cepas silvestres. Las técnicas de taxonomía clásica sólo permiten diferenciar levaduras a nivel de especie; por lo que es preciso recurrir a técnicas de biología molecular. El objetivo del presente trabajo ha sido conocer el grado de implantación de las cepas inoculadas, en 29 procesos fermentativos, de 11 bodegas de la Denominación de Origen “Vinos de Madrid”. Para ello se aislaron levaduras en las fases media y final de la fermentación. Posteriormente fueron identificadas genéticamente mediante electroforesis en campo pulsante (ECP), comparando sus cariotipos con los de las cepas inoculadas. En total se han analizado 16 cepas de LSA comerciales que han presentado suficientes diferencias entre ellas, relativas al número de bandas y a su distribución, excepto dos cepas que han mostrado el mismo perfil electroforético. En los procesos fermentativos industriales estudiados (10 elaboraciones de vino blanco, 9 de rosado y 10 de tinto), se han observado tasas de implantación muy variables, del 80-100% en el 34,5% de las vinificaciones; entre el 50-60% en un 10,3% de las mismas; de 10-45% en el 37,9% de los procesos; siendo la presencia de la cepa inoculada prácticamente nula en el 17,2% de las elaboraciones dirigidas. Con estos resultados se cuestiona la creencia generalizada de que la cepa inoculada sea siempre dominante en la fermentación. Los fallos en la implantación de las levaduras seleccionadas pueden ser debidos a una mala práctica en los procesos de preparación e inoculación del cultivo iniciador, así como a problemas de adaptación de dichas levaduras al medio, produciendo pérdidas económicas, además de no alcanzarse los objetivos enológicos perseguidos. Por ello, se recomienda realizar un estudio previo de implantación de las cepas comerciales, para elegir las más adecuadas a las condiciones de cada bodega.

## **P026 DETECCIÓN RÁPIDA DE *Salmonella* spp. POR PCR APLICADA AL CONTROL DE CALIDAD DE ALIMENTOS. VALIDACIÓN EN MUESTRAS REALES FRENTE A TÉCNICAS CONVENCIONALES**

Ainhoa Bilbao<sup>1</sup>, Garbiñe Olabarria<sup>1</sup>, Mercedes García<sup>2</sup>, Miguel Romeo<sup>2</sup>, Juan Carlos San Vicente<sup>2</sup>,

1-Biotecnología, GAIKER Centro Tecnológico, Zamudio

2-EROSKI, Soc. Coop., Elorrio

El género *Salmonella* es la principal causa de intoxicaciones bacterianas de origen alimentario en España, según datos del Ministerio de Sanidad y consumo del 2002 que revelan la aparición de 8112 casos. Informes de Centros de Prevención y Control de enfermedades en EEUU (CDC) consideran que por cada caso de salmonelosis se producen 40 intoxicaciones no registradas. La confirmación de las muestras positivas en laboratorios de control agroalimentario implica hasta 8 días de investigación siguiendo la metodología convencional. El objetivo principal del trabajo que presentamos es la aplicación de un método sencillo, rápido y robusto para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos. Basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta metodología presenta ventajas frente a los métodos convencionales especialmente en cuanto a la rapidez en la obtención de resultados (24 horas) y el ahorro de costes.

La detección de *Salmonella* spp. por PCR se realizó utilizando una pareja de cebadores específicos que amplifican 152 pares de bases del gen que codifica para la proteína de unión hns al ADN. La especificidad se comprobó en 44 géneros de *Salmonella* y 45 cepas no-*Salmonella* (Jones et al, 1993).

Este estudio presenta una validación realizada en 47 muestras de carne, 47 de pescado, 47 de lácteos, 47 de pastelería y 47 de matriz precocinada. La confirmación de los positivos se realizó mediante digestión enzimática con Hind II.

25 gramos de cada muestra ensayada de las matrices alimenticias fueron inoculadas con *S. choleraesuis* (CECT 4594). En cada matriz alimenticia se crearon cuatro grupos: tres formados con 10 réplicas cada una. Estas series se contaminaron artificialmente con  $\approx 10$  u.f.c.,  $\approx 5$  u.f.c. y la más baja al límite de detección  $\approx 1$  u.f.c. Por otro lado la especificidad se estudió en 15 muestras inoculadas con  $\approx 10$  u.f.c. de *Salmonella choleraesuis* y 100 u.f.c de *Escherichia coli* (CECT 434), *Citrobacter freundii* (CECT 401), *Enterobacter aerogenes* (CECT 684), *Shigella dysenteriae* (CECT 584) y *Hafnia alvei* (CECT 157).

Las muestras procesadas por PCR fueron analizadas en paralelo empleando elVIDAS para la detección de *Salmonella*. Los resultados analíticos fueron concordantes en el 100% de las muestras analizadas. Otros análisis interlaboratorios avalan con similares resultados y metodología, la idoneidad de este método para su utilización en la rutina de un laboratorio de control de alimentos.

## **P027 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE *Staphylococcus aureus* IMPLICADAS EN TRES BROTES DE INTOXICACION POR ALIMENTOS**

José María Fueyo<sup>1</sup>, María Carmen Mendoza<sup>1</sup>, María Rosario Rodicio<sup>1</sup>, María Angeles González-Hevia<sup>2</sup>, María Cruz Martín<sup>1</sup>

1-Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo

2-Laboratorio de Salud Pública. Principado de Asturias, Oviedo

*Staphylococcus aureus* forma parte de la microbiota normal del hombre y animales y es agente causal de infecciones e intoxicaciones. Tiene potencial para colonizar una amplia gama de alimentos donde puede segregar enterotoxinas (SEs), que son exoproteínas, pirogénicas, eméticas, superantigénicas y termoresistentes, capaces de persistir en el alimento aunque desaparezca la cepa productora. Las SEs identificadas se han designado: SEA-SEE y SEG-SEU, y son codificadas por los genes sea-see y seg-seu, respectivamente.

En el Principado de Asturias (PA) durante junio-octubre 2002 se detectaron tres brotes (B1, B2 y B3) de intoxicación alimentaria asociados a *S. aureus*. Cada brote ocurrió en un restaurante, en días diferentes, y sin relación epidemiológica aparente entre ellos. En los tres casos se aisló *S. aureus* tanto de algunos de los alimentos consumidos como del personal de cocina implicado en su elaboración. Este trabajo se centró en valorar el potencial enterotóxico, y los tipos genéticos de *S. aureus* recogidos en los tres brotes. Las SEs se analizaron mediante detección de antígenos-SE (SET-RPLA, Oxoid) y/o investigando la presencia de "DNA-fingerprinting": Smal-PFGE, RAPD con dos oligonucleótidos diferentes, y análisis de restricción de plásmidos con HindIII. En total se analizaron 32 aislamientos, diferenciados en 12 cepas se-positivas y 3 cepas se-negativas. Todas ellas fueron específicas de brote, excepto una que se detectó en dos brotes.

En B1 se estudiaron 3 aislamientos de manipuladores y 16 de alimentos. Estos últimos producían SEC y portaban genes asociados a dos islas de patogenicidad [sec-sel-sem] a SaPI4, y [seg-sei-sem-sen-seo] a vSaB-1, y generaron idénticos perfiles genéticos con los tres métodos, siendo por tanto considerados como una única cepa, que se diferenciaba claramente de las procedentes de los manipuladores. En B2, se analizaron 3 aislamientos de manipuladores y 4 de alimentos, asignados a 5 cepas. No se pudo establecer relación entre cepas, pero sí la presencia de cepas SEA/sea, o con [seg-sei-sem-sen-seo] en los alimentos. En B3 se estudiaron 5 aislamientos de alimentos y 4 de portadores, asignados a 8 cepas. Una cepa SEA/sea se encontró en alimentos y en un manipulador (y además en dos manipuladores del B2). En alimentos se encontraron, además, 4 cepas con [seg-sei-sem-sen-seo]. Los perfiles genómicos de la cepa SEA/sea, común en B2 y B3, corresponden a los de un linaje SEA/sea encontrado esporádicamente en portadores en el PA.

## P028 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS DE ALIMENTOS MEDIANTE ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL Y RAPD-PCR

María Jesús Andrade, Beatriz Sánchez Navarro, Eva Casado, Mar Rodríguez Jovita, Juan José Córdoba  
Higiene de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Univ. de Extremadura. Cáceres

Las levaduras han mostrado un papel relevante en la generación de compuestos volátiles de diversos alimentos. La selección de levaduras como cultivos iniciadores así como el seguimiento y control de su implantación en alimentos, hace necesario disponer de métodos sensibles y específicos que permitan diferenciar los cultivos iniciadores de otras cepas. La caracterización por métodos bioquímicos y fisiológicos es lenta y en ocasiones poco sensible. El análisis de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt) y el RAPD-PCR, pueden ser una alternativa para la caracterización de levaduras de alimentos.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad del análisis de restricción del ADNmt y de la técnica RAPD-PCR para la caracterización hasta nivel de cepa de las levaduras más frecuentemente encontradas en alimentos.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 5 cepas de cada una de las especies *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Pichia carsonii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica* pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo. Se ha realizado el análisis de restricción del ADNmt con los enzimas Hae III y Rsa I y el análisis de RAPD-PCR con los cebadores minisatélites M13 y (GACA)<sub>4</sub> y los cebadores microsátélites (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub>. Los resultados obtenidos se compararon con la caracterización fenotípica realizada mediante asimilación de azúcares y formación de pseudohifas.

El análisis del ADNmt resultó adecuado para diferenciar aislamientos a nivel de especie. Además se observaron diferencias entre cepas en todas las especies, excepto en *Candida zeylanoides*. Los perfiles obtenidos con el RAPD-PCR usando el cebador M13 permiten agrupar las cepas sólo a nivel de especie, con algunas excepciones. Sin embargo, con el minisatélite (GACA)<sub>4</sub> y los microsátélites (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub> se encontraron diferencias a nivel de cepa dentro de las distintas especies ensayadas.

La caracterización molecular mediante el análisis de restricción del ADNmt y la técnica RAPD-PCR con el minisatélite (GACA)<sub>4</sub> y los microsátélites (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub>, permite diferenciar a nivel de cepa, por lo que deben ser considerados de forma conjunta para la tipificación sensible de levaduras de interés en alimentos.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología AGL01-0804. M.J. Andrade es beneficiaria de una beca de la Junta de Extremadura.

## P029 PUESTA A PUNTO DE UN METODO MOLECULAR PARA LA DETECCION DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS PRODUCTORAS DE $\beta$ -GLUCANOS

María Laura Werning<sup>1</sup>, Idoia Ibarburu<sup>2</sup>, Ana Irastorza<sup>2</sup>, María Teresa Dueñas<sup>2</sup>, Jesús Navas<sup>3</sup>, Paloma López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Madrid

<sup>2</sup>-Departamento de Química Aplicada, Facultad de Química, Universidad del País Vasco, San Sebastián

<sup>3</sup>- Departamento de Biología Molecular (Unidad Asociada al C.I.B.-C.S.I.C.), Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander

Algunas bacterias ácido lácticas producen exopolisacáridos (EPS) que se utilizan en la industria alimentaria para mejorar la textura y las propiedades organolépticas de ciertos productos como quesos o yogures. Por otra parte estos EPS tienen efectos deletéreos en bebidas alcohólicas como sidras y vinos. En concreto, durante la producción de sidra, ocasionalmente se producen sidras "ahiladas", muy viscosas y de aspecto aceitoso, debido a una producción excesiva de EPS. Hemos desarrollado un método para la detección de bacterias productoras de EPS que puede aplicarse para identificar sidras susceptibles de sufrir el "ahilado" y también para aislar nuevas cepas de bacterias lácticas de interés por sus propiedades fermentadoras.

*Pediococcus damnosus* 2.6 es una bacteria procedente de una sidra ahilada que produce un EPS del tipo  $\beta$ -D-glucano. El gen *gtf* de *P.damosus* 2.6 codificante para la glicosiltransferasa responsable de la síntesis del glucano ha sido clonado y secuenciado. El producto del gen *gtf* es homólogo a los miembros de la familia de las glicosiltransferasas tipo 2 y su dominio catalítico está flanqueado por regiones transmembranales. Utilizando unos cebadores específicos hemos detectado el gen *gtf* en *Lactobacillus* sp G77 y *Oenococcus oeni* I4, bacterias que producen el mismo EPS que *P.damosus* 2.6. En las tres bacterias la localización genómica del gen *gtf* es diferente. Considerando estos resultados se ha puesto a punto un método de PCR para detectar bacterias portadoras del gen *gtf* que se ha aplicado a una colección de bacterias aisladas de sidra, principalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus*.

## **P030 DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Fusarium* PRODUCTORAS DE MICOTOXINAS EN TRIGO DURO ANDALUZ**

Miguel Jurado<sup>1</sup>, Belen Patiño<sup>2</sup>, Elena López-Errasquín<sup>2</sup>, Virginia Rubio<sup>1</sup>, Amaia González Salgado<sup>1</sup>, Covadonga Vázquez<sup>2</sup>, María Teresa González-Jaén<sup>1</sup>

1-Departamento de Genética, Facultad de Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

2-Departamento de Microbiología III, Facultad de Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

El género *Fusarium* comprende un gran número de especies fitopatógenas de distribución mundial capaces de colonizar una gran variedad de cultivos, entre ellos el trigo, donde ocasiona grandes pérdidas económicas al disminuir la cantidad y la calidad del grano. Además, algunas de estas especies son capaces de producir micotoxinas, constituyendo un riesgo para la salud humana y animal cuando son ingeridas a través de alimentos preparados con el material vegetal contaminado. Las micotoxinas más importantes relacionadas con *Fusarium* que pueden presentarse en concentraciones biológicamente significativas en el trigo son tricotecenos y zearalenona. La complicada taxonomía, aún objeto de controversia, unido a la dificultad y laboriosidad que representa la identificación de las especies siguiendo la metodología tradicional impide conocer la incidencia relativa de las diferentes especies, y con ello predecir las toxinas asociadas a ellas y el desarrollo de métodos eficaces de control que impidan la entrada de las toxinas de riesgo en la cadena alimentaria. En este trabajo se ha analizado la presencia de especies micotoxigénicas de *Fusarium* en un total de 70 muestras de trigo duro de 8 variedades distintas, procedentes de 14 campos localizados en las provincias de Huelva (Bonares, Niebla y Beas) y Sevilla (Utrera, Lebrija y Écija), y que representan a dos zonas climáticas diferentes. Para ello se ha llevado a cabo una identificación molecular mediante PCR con una batería de cebadores específicos de especie, previamente diseñados por nuestro grupo, correspondientes a las principales especies de *Fusarium* asociadas a trigo. Los cebadores fueron diseñados a partir del análisis de secuencias de la región espaciadora intergénica del rDNA (IGS), cuyo carácter multicopia aumenta la sensibilidad con respecto a las secuencias de copia única. La reacción de PCR se lleva a cabo con el DNA extraído directamente de la muestra de trigo previamente sometida a un tratamiento de enriquecimiento fúngico. Este es el primer estudio que se lleva a cabo en España sobre la distribución de las principales especies micotoxigénicas de *Fusarium* asociadas al trigo.

## **P031 ANÁLISIS DE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS EN UVAS DE VINO DE CASTILLA LEÓN Y LA RIOJA**

Belén Patiño<sup>1</sup>, Amaia González-Salgado<sup>2</sup>, Miguel Jurado<sup>2</sup>, Elena López-Errasquín<sup>1</sup>, Victor Barba<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Teresa González-Jaén<sup>2</sup>, Misericordia Jiménez<sup>3</sup>, Covadonga Vázquez<sup>1</sup>

1-Microbiología III, UCM, Madrid

2-Genética, UCM, Madrid

3-Microbiología y Ecología, UV, Valencia

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, que cuando afectan a productos básicos de la dieta humana y animal representan un riesgo importante para la salud. Las ocratoxinas, particularmente la ocratoxina A (OTA), ocupan un lugar destacado dentro de las micotoxinas por su elevada toxicidad para humanos y animales superiores. Los principales productos afectados por su importancia en la dieta son los cereales, uvas y derivados (pasas, vinos y zumos) y café; todos ellos sometidos a regulación o recomendaciones sobre los límites máximos permitidos. La presencia de OTA en esos alimentos se debe a su colonización por ciertas especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* durante la fase final del cultivo previa a la recolección o/y durante el almacenamiento y etapas posteriores. La importancia relativa de las diferentes especies y cepas productoras de OTA varía de acuerdo a criterios geográficos y climatológicos. Su detección está limitada por los métodos tradicionales de identificación, aspecto crítico para diseñar estrategias de control que eliminen el riesgo potencial que su presencia en los alimentos de consumo. Las técnicas de caracterización y detección de cepas fúngicas basadas en el DNA ofrecen rapidez, precisión y sensibilidad y permiten obtener información sobre la variabilidad a nivel intraespecífico y su seguimiento epidemiológico.

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de especies y cepas ocratoxigénicas en uvas de vino de las regiones de la Rioja y Castilla-León. Los aislamientos se realizaron en diferentes variedades de uva de varias localidades. La caracterización de los aislamientos potencialmente productores de OTA se realizó mediante métodos tradicionales y moleculares, utilizando cebadores específicos diseñados en nuestro laboratorio, secuenciación y PCR-RFLPs. Asimismo se ha comprobado su capacidad de producir OTA.

Se aislaron 57 cepas *Penicillium* y 44 de *Aspergillus* cuya caracterización se describe. Hay que destacar que el número de cepas ocratoxigénicas encontradas fue bajo, y que no se detectó la presencia de *A. carbonarius*, especie ocratoxigénica de gran importancia en regiones mediterráneas.

## **P032 INCIDENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS UTILIZANDO TÉCNICAS DE PCRY PCR A TIEMPO REAL**

Antonio Llanos, Andrés Otero, María Luisa García-López, Jesús A. Santos  
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León

### **INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo ha sido la aplicación práctica de un protocolo de detección rápida y fiable de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos cocidos basándose en técnicas genéticas.

### **MATERIALES Y METODOS**

Se analizaron 145 muestras de jamón cocido, chopped, mortadela y salchichas cocidas adquiridas en cuatro establecimientos. Los tres primeros tipos de productos eran loncheados mientras que las salchichas cocidas estaban envasadas. Las muestras fueron transportadas en refrigeración y procesadas inmediatamente. Se tomó una cantidad de 25 g que se homogeneizó durante 2 min en 225 ml de TSB+0,6% YE. A continuación se incubó 6 h a 35°C para posteriormente inocular 1 ml de este cultivo en 10 ml de caldo Fraser. Este se incubó otras 18 h a 35°C y tomándose 1 ml para la técnica de PCR, prolongando otras 24 h la incubación y tomando una segunda muestra para PCR. Se empleó tanto la técnica PCR convencional como la técnica PCR a tiempo real para la amplificación del gen *hly*. Las muestras se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta obtener el resultado de PCR. Las muestras positivas se sembraron en ALOA seleccionando varias colonias típicas para su posterior caracterización por métodos convencionales.

### **RESULTADOS**

- La incidencia total fue de un 8,2%(12/145), distribuyéndose por productos: jamón cocido, 22,2%(8/36); mortadela, 8,1%(3/37) y chopped, 2,8%(1/36) y salchichas cocidas,(0/36).
- Las muestras positivas detectadas por PCR convencional a las 24 h fueron 2 frente a las 9 obtenidas por PCR a tiempo real. Las muestras positivas obtenidas por PCR a las 48 h fueron de 5 frente a las 12 detectadas por PCR a tiempo real.
- Las cepas aisladas fueron identificadas como *Listeria monocytogenes* por las pruebas convencionales.

### **CONCLUSIONES**

- La incidencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos es similar a la encontrada en otros estudios realizados con este tipo de productos. Destaca la ausencia de muestras positivas en las salchichas cocidas, siendo probablemente el envasado la causa de ello. Parece posible concluir que la presencia de *L. monocytogenes* en los productos loncheados, se debe a la contaminación después del tratamiento térmico en el punto de venta.
- La incidencia en jamón cocido es muy superior al resto de productos loncheados probablemente debido a una mayor manipulación al ser un producto más demandado en los establecimientos.
- La PCR a tiempo real se muestra como una técnica más sensible que la PCR convencional para la detección de este microorganismo.

## **P033 APLICACION DEL SISTEMA BAX® EN EL SCREENING DE *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7 Y *Listeria monocytogenes* EN ALIMENTOS: COMPARACION CON LOS METODOS TRADICIONALES**

María Damiana Sáez Cacho, David Aparicio Rendo, Pilar Crespo Ledesma, Argizka Etxebarria Lanborena  
Laboratorio Municipal de Bilbao, Ayuntamiento de Bilbao

El sistema BAX® es un método automatizado de cribado microbiano que utiliza la tecnología PCR para la detección del microorganismo diana; en 24-28h en el caso de *Salmonella spp.* y *E. coli* O157:H7, y en 48h para *L.monocytogenes*.

El objetivo del estudio han sido la comparación de los resultados obtenidos mediante los métodos BAX® y los empleados en el Laboratorio Municipal por microbiología tradicional.

Se inocularon diferentes matrices alimenticias (productos cárnicos, de la pesca, lácteos, ahumados, de pastelería, vegetales) con distintos niveles de concentración de los microorganismos diana y se procesaron en paralelo por el método BAX® y por el método de microbiología tradicional implantado en el Laboratorio. En otros casos se procesaron en paralelo muestras de rutina.

La concordancia de resultados entre estos métodos es la siguiente:

<i>Salmonella spp.</i> :	96,15% (125/130)
<i>L.monocytogenes</i> :	78,79% (52/66)
<i>E.coli</i> O157:H7 :	91,80% (112/122)

El número de resultados positivos a *Salmonella spp.* por el método BAX® fue 63, por la técnica tradicional, 58 (n=130). Para *L.monocytogenes* el número de resultados de presencia fue 34 por el método BAX® y 28 por la técnica tradicional (n=66) y para *E.coli* O157:H7, 70 y 80 respectivamente (n=122).

Conclusiones:

o El método BAX® para *Salmonella spp.* es más sensible que el método tradicional. Tras inocular 49 muestras con este microorganismo a niveles de 0,6-1,6ufc/25g, el porcentaje de positivos fue mayor por el método BAX®.

o El método BAX® para *L.monocytogenes* es más selectivo y específico que el tradicional cuando *L.monocytogenes* se encuentra en concentraciones  $\leq 10$  ufc en presencia de otros microorganismos del género *Listeria* a niveles superiores a 300 ufc/25g. La sensibilidad de ambos métodos es igual cuando se inoculan muestras reales con concentraciones de *L.monocytogenes* de 1-4 ufc/25g (100%).

o El método BAX® para *E.coli* O157:H7 es menos sensible que el método tradicional (empleando inmunocentración). El 95% de las muestras (n=20) sobre las que se les ha adicionado un inóculo de 3-6 ufc/25g de este microorganismo han dado un resultado de presencia por el método BAX®; mientras que por el método de inmunocentración el resultado fue positivo en el 100%.

En todos los casos hay que valorar que el tiempo de análisis mediante los métodos BAX® se reducen entre 24-72h para dar un resultado negativo.

### **P034 DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* Y *Salmonella* EN PRODUCTOS CÁRNICOS A TRAVÉS DE MULTIPLEX-PCR Y NMP-PCR**

Anna Jofré<sup>1</sup>, Belén Martín<sup>1</sup>, Margarita Garriga<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>, Teresa Aymerich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Biotecnología Alimentaria, Centre de Tecnologia de la Carn, IRTA, Monells

<sup>2</sup>-European Food Safety Authority, Bruselas, Bélgica

Los métodos de detección de patógenos basados en PCR son cada vez más usados para la detección de bacterias en muestras clínicas y de alimentos. El aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* a través de los métodos microbiológicos clásicos puede requerir hasta 7-10 días mientras que los métodos basados en PCR constituyen una alternativa específica, sensible y más rápida.

Para la detección de *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* se han descrito varios pares de cebadores, con diferente grado de sensibilidad y especificidad. Recientemente, en el marco de un proyecto financiado por la Unión Europea (FOOD-PCR, www.pcr.dk) se han evaluado y validado métodos basados en la PCR para la detección de *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* O157, *Yersinia enterocolitica*, *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.*

En este estudio, basándonos en los cebadores validados en el proyecto FOOD-PCR, se ha diseñado un sistema de PCR múltiple (m-PCR) para la detección simultánea de *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* en productos cárnicos cocidos, a partir de colonia y caldo de enriquecimiento. El sistema también permite la confirmación directa y simultánea de colonias de *L. monocytogenes* y *Salmonella* de manera rápida y eficiente. La combinación del ensayo con la técnica del Número Más Probable (NMP) permite y agiliza la enumeración de *L. monocytogenes* y *Salmonella* en muestras con recuentos inferiores a 10 ufc/g.

Las diferencias de crecimiento entre *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* en los diferentes medios de cultivo utilizados para el enriquecimiento de la muestra han revelado que es necesario un enriquecimiento por separado de los dos patógenos para una detección conjunta y eficiente mediante PCR múltiple. De este modo, es posible detectar simultáneamente los dos patógenos tanto cuando se encuentran en niveles bajos (incluso 1 ufc / 25 g), como cuando uno de ellos predomina respecto al otro.

El efecto inhibitor que pueden tener algunos componentes de los alimentos en la reacción de PCR se ha valorado mediante la inclusión de un control interno de amplificación (IAC) que co-amplifica con las secuencias diana de los patógenos y permite verificar que los resultados negativos no son debidos a una inhibición de la reacción de PCR.

### **P035 DETECCIÓN DIRECTA DE *Zygosaccharomyces rouxii* DETERIORANTE DE ALIMENTOS CON ALTA CONCENTRACION DE AZUCAR**

Petra Wrent, Maria Isabel Siloniz, Jose Martinez Peinado, Maria Jose Valderrama

Dep. Microbiología, Fac. Biología, Universidad Complutense de Madrid

*Zygosaccharomyces rouxii* es una levadura osmotolerante, capaz de desarrollarse en sustratos con baja actividad de agua, y que representa un problema serio para las industrias que elaboran alimentos con elevada concentración de azúcar. Las principales manifestaciones del deterioro que ocasiona en tales productos son el reblandecimiento de los mismos por formación de biomasa y el hinchamiento de los envases por producción de gas. Además esta levadura resiste el sorbato empleado como conservante, transformándolo en pentadieno, un compuesto volátil que confiere un olor "a petróleo" a los productos (Casas 2004). Para las industrias del sector la detección rápida de este tipo de levaduras, tanto en materias primas como en productos terminados, es de primordial interés, para establecer las medidas de control necesarias que eviten el deterioro de sus productos. Basándonos en estudios previos (Casas 1999), en este trabajo hemos optimizado un ensayo sensorial para la detección de microorganismos productores de pentadieno: mediante la inoculación directa de muestras en un medio de cultivo (ME4, contiene en g/l, glucosa 300, sorbato potásico 0,75, cloranfenicol 0,1) en recipientes adecuados herméticos, puede apreciarse la producción de gas y olor característico a petróleo. El tiempo mínimo de detección de olor es de 48 horas en muestras que contienen 50-100 células / g.

Con objeto de reducir el tiempo de detección de estas levaduras peligrosas, hemos diseñado también un protocolo para detección directa de *Z. rouxii* a partir de alimentos. Se han utilizado cebadores específicos (Sancho 2000) que amplifican la región ITS del DNA ribosómico. Las reacciones de amplificación se realizaron directamente a partir de colonias de *Z. rouxii* (cepas de referencia y aislados de alimentos deteriorados). El método ha sido ensayado también en muestras directas tras enriquecimiento en el medio ME4, permitiendo así la identificación de *Z. rouxii* en 24 h sin aislamiento previo.

La utilización en fábrica de los métodos desarrollados permitirá detectar la presencia de *Z. rouxii*, mediante PCR en 24 h y confirmar su capacidad de deterioro por producción de gas y olor a pentadieno en 48 h.

Casas et al., 1999. En: Improved traditional foods for the next century (eds. Toldrá). pp. 304-307.

Casas et al., 2004. Int. J. Food Microbiol. (en prensa).

Sancho et al., 2000. Food Microbiol. 17: 613.

### **P036 ENTEROCOCOS DE EMBUTIDOS POCO ÁCIDOS: ASPECTOS SANITARIOS Y BIODIVERSIDAD**

Belén Martín<sup>1</sup>, Margarita Garriga<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>, Teresa Aymerich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Microbiología y Biotecnología Alimentarias, Centro de Tecnología de la Carne, IRTA, Monells

<sup>2</sup>-European Food Safety Authority (EFSA), Bruselas, Bélgica

Los enterococos son bacterias lácticas que se encuentran ampliamente distribuidas en alimentos de origen animal. Su uso como cultivos bioprotectores y probióticos en alimentos está siendo cuestionado dado que en los últimos años se ha incrementado su incidencia en infecciones nosocomiales.

El objetivo de este estudio fue determinar, mediante técnicas moleculares, la biodiversidad de enterococos aislados de embutidos ligeramente fermentados (chorizo y fuet) a nivel de especie y cepa. Asimismo, se consideraron aspectos sanitarios como la presencia de genes asociados a factores de virulencia y a resistencia a vancomicina.

*Enterococcus faecium* fue la especie predominante (51,9%) seguido por *Enterococcus hirae* (16%), *Enterococcus faecalis* (14,2%), *Enterococcus durans* (13,2%), *Enterococcus casseliflavus/flavescens* (2,8%), *Enterococcus mundtii* (0,9%) y *Enterococcus gallinarum* (0,9%). Mediante RAPD-PCR se determinaron grupos específicos de especie y se logró la tipificación de las cepas; 44,3% de las cepas presentaron diferentes perfiles de RAPD indicando una elevada variabilidad genética. Todas las cepas de *E. faecalis* presentaron genes de virulencia (*efaAfs*, *esp*, *agg* y *gelE*) mientras que sólo un 5,5% de las cepas de *E. faecium* mostraron la presencia simultánea de los 4 genes estudiados. La mayoría de cepas de *E. faecium* no presentaron los genes *esp*, *agg* y *gelE* aunque el 100% de las cepas presentaron el gen *efaAfm*. El resto de cepas aisladas no presentaron ninguno de estos genes. Una cepa de *E. faecium* fue *vanA* positiva (genotipo que confiere un alto grado de resistencia a la vancomicina) y las cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus/flavescens* mostraron los genotipos *vanC1* y *vanC2/C3* respectivamente (genotipos que confieren un nivel bajo de resistencia a la vancomicina).

### **P037 DETECCIÓN POR PCR DE LOS GENES *ENTA*, *ENTB*, *ENTC*, *ENTD* Y *ENTE* DE *Staphylococcus aureus* EN JAMÓN Y LECHE EN POLVO**

Gabriela Nájera Sánchez<sup>1</sup>, Rogelio Maldonado Rodríguez<sup>1</sup>, Lydia Mota de la Garza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

<sup>2</sup>-Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A. de C.V.

Introducción: Dado que se conoce la secuencia de los genes que codifican para la síntesis de las enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus*, la PCR proporciona una nueva alternativa para la detección de estafilococos enterotoxigénicos en alimentos.

Objetivo: Desarrollar y aplicar dos reacciones múltiples de PCR para la detección simultánea de los genes *entA*, *entB* y *entE* (EEA/EEB/EEE) y de los genes *entC* y *entD* (EEC/EED) de *Staphylococcus aureus* en jamón y leche en polvo.

Metodología: Ambas reacciones se aplicaron en jamón y leche en polvo previamente inoculados con suspensiones celulares de 10, 100, 1,000, 10,000, 100,000 y 1,000,000 de UFC/ mL de las cepas de referencia de *S. aureus* productoras de cada una de las enterotoxinas. Tanto las muestras de jamón como de leche en polvo fueron tratadas por hidrólisis alcalina. Diez microlitros de cada muestra fueron sometidos a las dos reacciones múltiples.

Resultados y discusión: Para la reacción múltiple EEA/EEB/EEE solo se obtuvieron las bandas de amplificación esperadas (120, 472 y 170 pb respectivamente) en las muestras de leche con 1,000 a 1,000,000 de UFC/ g, en la muestra con 100 UFC/g solo se observó la banda de 120 pb. En las muestras de jamón solo se obtuvieron las tres bandas en las muestras con 100,000 y 1,000,000 de UFC/g, en la muestra con 10,000 UFC/g solo se observó la banda de 120 pb.

Para la reacción múltiple EEC/EED solo se obtuvieron las bandas de amplificación correspondientes (257 y 317 pb respectivamente) en las muestras de leche con 10,000 a 1,000,000 de UFC/g. En las muestras de jamón solo se obtuvieron las dos bandas en las muestras con 100,000 y 1,000,000 de UFC/g.

A pesar de que la sensibilidad de la reacción varió con el tipo de alimento, todas las reacciones fueron capaces de detectar al menos 1,000,000 de UFC de *S. aureus* por gramo de alimento, que es la concentración del microorganismo que permite sospechar de la posible presencia de enterotoxinas en los alimentos.

En ambos casos las reacciones de PCR fueron más sensibles cuando se aplicaron en leche en polvo existiendo de uno a dos logaritmos de diferencia cuando se comparan con los resultados en jamón.

## **P038 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE TAPONES DE CORCHO PARA CAVA CON DEFECTOS SENSORIALES**

L. Bañeras<sup>1</sup>, O. Ruiz-Rueda<sup>1</sup>, E. Bosch<sup>2</sup>, J. Deulofeu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Institut d'Ecologia Aquàtica, Facultat de Ciències, Universitat de Girona

<sup>2</sup>-TESA Tapones y Especialidades del Corcho, S.A., Palafrugell

El corcho es un material compuesto principalmente de suberina, un compuesto orgánico relacionado con la lignina. Presenta una elevada resistencia a la degradación orgánica y unas características físicas, elasticidad y resistencia, que lo hacen especialmente indicado para la elaboración de tapones, principalmente utilizados en la industria vinícola. Estudios científicos realizados en diversos países han demostrado que este compuesto natural es posiblemente el mejor y más seguro material para el tapado de vinos de elevada calidad. A pesar de ello, el origen del corcho y los métodos utilizados en el proceso de elaboración de los tapones, lo hacen especialmente sensible al ataque de los microorganismos, los cuales, en las condiciones adecuadas pueden provocar alteraciones organolépticas del mencionado material, algunas de ellas irreversibles. Entre las alteraciones sensoriales mejor conocidas destacan la acumulación de tri- y tetra-cloroanisoles (2,4,6-TCA y 2,3,4,6-TeCA, respectivamente), y de guaiacol. En ambos casos, se ha descrito una relación directa entre la presencia de determinados microorganismos (bacterias y hongos filamentosos) y la acumulación de los compuestos referidos, aunque este último proceso no debe producirse necesariamente en el corcho propiamente dicho.

En el presente trabajo se presentan datos experimentales en los que se relaciona la presencia de determinados grupos microbianos con la aparición de defectos sensoriales en tapones de corcho para cava. Se han analizado un total de 40 muestras de tapones catalogadas como defectuosas y se ha comparado la diversidad microbiana de éstas con 20 muestras control, sin defecto sensorial aparente. El análisis de la diversidad microbiana en las muestras referidas se ha realizado mediante una aproximación molecular utilizando la técnica PCR-DGGE. La técnica se basa en la amplificación selectiva de fragmentos específicos de DNA, su posterior separación en geles de archilamida, y la determinación de la afiliación filogenética de los patrones de bandas obtenidos mediante secuenciación. Se han realizado ensayos para determinar la diversidad específica de hongos filamentosos y de bacterias, mediante el uso de cebadores específicos para las regiones ITS-1 y 357-907 del gen 16S rRNA, respectivamente. Los resultados obtenidos han permitido establecer una clara distinción entre los grupos de microorganismos detectados y los defectos detectados en los tapones. Asimismo, se ha valorado la aplicación de metodologías moleculares para el ensayo de la diversidad bacteriana en muestras complejas como puede ser el corcho.

## **P039 DETECCIÓN RÁPIDA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN SALCHICHÓN MEDIANTE PCR Y SISTEMA VIDAS**

Luis M. Medina, Rafael Priego, Rafael Jordano

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba

### **OBJETIVOS**

Aplicar, para el análisis microbiológico de embutidos crudos curados (salchichón), dos técnicas de detección rápida de patógenos: sistema VIDAS<sup>®</sup> (inmunoanализador automatizado) y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se pretende valorar la utilidad, fiabilidad y seguridad de ambos procedimientos de análisis microbiológico, como alternativa de rutina para la detección rápida de patógenos en la industria cárnica.

### **MÉTODOS**

La PCR se basa en la hibridación de una cadena de oligonucleótidos, de una secuencia específica, con una cadena de ADN más larga y un enzima (ADN polimerasa), la cual incorpora nucleótidos en un extremo del cebador formando una secuencia de ADN complementario. Su principal ventaja es la producción o amplificación de numerosas copias de una secuencia de ADN específica sin recurrir a la clonación.

El sistema VIDAS<sup>®</sup> ha sido desarrollado para la detección rápida de microorganismos patógenos en la industria alimentaria. Su principio es simple, y está basado en la reacción específica antígeno-anticuerpo, utilizando la tecnología ELFA (análisis fluorescente ligado a un enzima). Se han analizado un total de 90 muestras de salchichón agrupadas en seis lotes: tres control (3x15 muestras) y tres inoculados (3x15 muestras) con una concentración de 1.000 UFC/ml de los microorganismos ensayados (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*). Cada muestra (control e inoculada con patógenos) fue analizada mediante PCR, y contrastado el resultado por el sistema VIDAS<sup>®</sup>.

### **RESULTADOS**

Las dos técnicas aplicadas, PCR y sistema VIDAS<sup>®</sup>, ofrecieron resultados idénticos, mostrando un nivel de coincidencia del 100% para los tres microorganismos ensayados: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*. Los resultados fueron positivos en todas las muestras inoculadas y negativos en las muestras control.

### **CONCLUSIONES**

Las dos técnicas estudiadas ofrecen la posibilidad de reducir significativamente el tiempo de detección/identificación de microorganismos a partir del alimento en comparación con los métodos tradicionales o convencionales.

Además, se trata de técnicas rápidas, simples, consistentes y flexibles que no requieren de habilidades específicas.

Ambos procedimientos, PCR y VIDAS<sup>®</sup>, son útiles como alternativa para la detección rápida de la posible presencia de patógenos en la industria alimentaria, en el contexto de los sistemas APPCC como garantía de seguridad alimentaria.

## P040 Anulado

### P041 VALIDACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD APLICADO A LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERANTES DE SALSAS MEDIANTE TÉCNICAS IMPEDIMÉTRICAS

David Tomás Fornés, Cristina Alcón Giner, José Luís Monzó Sánchez, Amparo Benito Armas  
Laboratorio Bioensayos, AINIA, Paterna, Valencia

Las técnicas impedimétricas permiten la detección y cuantificación de microorganismos gracias a la producción de metabolitos que son detectados automáticamente, bien de forma directa o indirecta. Dichas técnicas presentan ventajas con respecto a los métodos de análisis convencionales como son la rapidez, automatización, ahorro de mano de obra y manipulación, reactivos..., si bien también pueden presentar inconvenientes asociados al tipo de matriz y microorganismo a analizar.

Por otro lado la ausencia de procedimientos de análisis normalizados y de circuitos de evaluación de la calidad (interlaboratorios) que permitan evaluar estos métodos, hace necesario implantar protocolos de puesta a punto, validación y control de calidad interno que permita garantizar la fiabilidad del método de ensayo así como de los análisis realizados de forma rutinaria.

En el presente trabajo se ha desarrollado la puesta a punto, validación, cálculo de incertidumbre y sistemática para el control de calidad de métodos impedimétricos indirectos utilizados para la detección de microorganismos productores de gas en salsas finas y ketchup, donde la presencia de levaduras osmófilas y bacterias lácticas heterofermentativas puede dar lugar a alteraciones.

Los ensayos se han realizado mediante el análisis comparativo por técnicas impedimétricas y convencionales de muestras inoculadas a diferentes niveles con cepas de *Zygosaccharomyces bailii* y bacterias lácticas heterofermentativas (*Lactobacillus plantarum* y *brevis*) aislados de salsas alteradas, así como mediante el análisis de duplicados de muestras naturalmente contaminadas.

Los coeficientes de correlación ( $r=0,9978$  a  $r=0,982$ ) indican un buen ajuste de los resultados, lográndose detectar  $<10$  ufc/g con tiempos de detección de 24 a 48 horas.

### P042 MÉTODO NO DESTRUCTIVO PARA LA DETECCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIANO EN LECHE UHT MEDIANTE ULTRASONIDOS

Luis Elvira<sup>1</sup>, Lorena Sampedro<sup>2</sup>, Francisco Montero<sup>1</sup>, Yago Gómez-Ullate<sup>1</sup>, Pablo Resa<sup>1</sup>, Javier Matesanz<sup>2</sup>, José Ramón Iglesias<sup>2</sup>, Alfredo Ron<sup>2</sup>, Francisco Javier Eche

<sup>1</sup>-Instituto de Acústica, CSIC, Madrid

<sup>2</sup>-Corporación Alimentaria Peñasanta S.A., Oviedo

La eventual aparición de contaminaciones microbianas en alimentos envasados puede dar lugar a la pérdida de grandes cantidades de producto en mal estado que ha de ser eliminado, con las consiguientes inconvenientes económicos y medioambientales. Por ello existe un gran interés en el desarrollo de métodos de control de esterilidad rápidos y fiables. En este trabajo se presenta un sistema de medida por ultrasonidos en fase de prototipo para la detección de crecimiento microbiano en leche UHT envasada. Se trata de un procedimiento no destructivo que permite detectar el crecimiento de microorganismos durante la incubación, en aquellos paquetes extraídos de la línea de producción para análisis. El sistema dispone de dispositivos de control de la temperatura y humedad para realizar dicha incubación, así como transductores de ultrasonidos que permiten medir de forma continua los envases recién salidos de la máquina de envasado. La medida se realiza automáticamente, activándose una alarma en el caso de detectarse una contaminación. Para evaluar el sistema, se han inoculado diferentes microorganismos (*Pseudomona aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* y *Kluyveromyces marxianus*) en envases estériles. La medida por ultrasonidos, se contrastó con otras medidas convencionales de control (pH, acidez, recuento microbiano) de las muestras incubadas. Los resultados obtenidos muestran la viabilidad del dispositivo desarrollado para detectar la presencia microbiana en leche envasada sin necesidad de abrir dichos envases.

## **P043 POSIBLES IMPLICACIONES EN SEGURIDAD ALIMENTARIA DEL HALLAZGO DE CEPAS DE *Enterobacter* sp. LACTOSA NEGATIVAS EN PIENSOS DESTINADOS A ALIMENTACIÓN ANIMAL**

Carles Adelantado, Carlos Shiva, Ferran Figueras, M. Angeles Calvo

Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

La detección de cepas de *Salmonella* spp. a partir del crecimiento de colonias en medio sólido selectivo, previo enriquecimientos pertinentes, puede verse dificultada por la aparición de colonias similares susceptibles de ser identificadas como falsos positivos que nos pueden llevar a la decisión de desechar muestras o partidas enteras de alimento innecesariamente.

La metodología aplicada ha sido la descrita en manuales de referencia para analítica alimentaria, y se basa en preenriquecimiento en medio no selectivo (caldo lactosado), posterior enriquecimiento en medio líquido selectivo (caldo selenito cistina o caldo Rappaport Vassiliadis) y siembra en medio sólido selectivo (Agar SS). El crecimiento habitual de *Salmonella* spp. en Agar SS determina la formación de colonias incoloras y transparentes, con o sin producción de ácido sulfhídrico. Tras la detección de colonias sospechosas aisladas en el laboratorio a partir de piensos destinados a alimentación animal (en ningún caso productoras de ácido sulfhídrico), mediante el sistema API20E (Biomérieux) se observó que el 55% de las cepas correspondían a diferentes especies del género *Enterobacter*.

A su vez se compararon medios de enriquecimiento selectivo (selenito cistina y Rappaport Vassiliadis) inoculados con concentraciones conocidas de *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae* y una mezcla de ambos. La recuperación fue muy similar en ambos medios, por lo que no se logró la inhibición de *Enterobacter* sp. Estos resultados cuestionan la capacidad de fermentar lactosa por parte de cepas de *Enterobacter* sp. De este hecho se deriva también que se debe replantear la definición de microorganismos coliformes (enterobacterias lactosa positivas, usadas como índice de contaminación fecal), ya que la existencia de cepas lactosa negativas de *Enterobacter* sp. puede falsear dichos recuentos disminuyéndolos y tal vez aceptando muestras que no deberían ser consideradas aptas para consumo humano y/o animal.

Como conclusión cabe decir que toda colonia sospechosa de ser identificada como *Salmonella* sp. debe ser confirmada mediante pruebas bioquímicas (API20E o combinación de TSI y LIA) y serología. Asimismo, nuestros resultados sugieren una necesaria revisión de conceptos fundamentales para la seguridad alimentaria, como el de coliformes, y su implicación como índices de contaminación fecal de los alimentos.

## **P044 UTILIZACIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA EN LAS PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y DE CONTROL DE CALIDAD EN LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA**

Nuria Sala, Robert Garrofé, Vicente Sanchis, Mercè Torres, Corrie Allaert

Departament de Tecnologia d'Aliments, E.T.S.E.A, Universitat de Lleida

Las clases prácticas son muy importantes en la impartición de las asignaturas de Microbiología de Alimentos y de Control de Calidad. Una de las principales prácticas es el recuento de diversos microorganismos, y que en las muestras de alimentos que se analicen estos deben estar presentes y en número adecuado para su recuento. Así pues, nuestra experiencia en los últimos años ha sido que el mejor camino es la utilización de material de referencia, sobretodo en los recuentos de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

En las clases prácticas de Microbiología de Alimentos preparamos mezclas con uno o diversos microorganismos diana, utilizando para ello cápsulas; conseguimos así saber la cantidad de cada microorganismo en dichas mezclas. A cada estudiante se le da una botella de peptona salina con mezcla de algún microorganismo, que ellos utilizaran para su análisis rutinario del alimento a analizar. A priori ellos no saben que tienen la solución de peptona contaminada. Con todo ello conseguiremos que se obtengan resultados positivos, con colonias típicas, y contables.

Para las prácticas de Control de Calidad, centrada en los laboratorios de Microbiología, se utiliza también material de referencia en forma de lenticulas o de cápsulas, ya que por un lado los estudiantes deben conocer la existencia de estos materiales y por otro poderlos utilizar. La aplicación más importante es para el control de calidad de primera, segunda y tercera línea. En el control de primera línea ellos aprenden a realizar y a utilizar una gráfica de control, que posteriormente en la industria alimentaria pueden utilizarla con otros parámetros. En el control de segunda línea, conociendo el nivel de recuento, podemos verificar la repetibilidad entre dos analistas y entre dos réplicas de una misma muestra. En el control de tercera línea simulamos un ejercicio interlaboratorio de verificación externa de calidad, utilizando lenticulas; se forman grupos entre los estudiantes y se comparan sus resultados con histogramas, medias, medianas y rangos.

Los años de experiencia en la utilización de este tipo de material nos ha demostrado su utilidad en la práctica docente por su facilidad de manejo y buenos resultados, combinados con un elevado nivel de satisfacción por parte del alumnado. Es probable que algunos de nuestros estudiantes, en un futuro, se incorporen a una industria alimentaria (laboratorio) y para ellos es muy importante conocer estas técnicas y aun más importante utilizarlas.

## **P045 EVALUACION DE LA CONTAMINACION FUNGICA EN ALIMENTOS ELABORADOS A BASE DE MAIZ (*Zea mays*)**

Iván Anaya, Meritxell Ventura, Lluís Comellas, Montserrat Agut  
Institut Químic de Sarriá, Universitat Ramon Llull, Barcelona

### **INTRODUCCIÓN**

De acuerdo a la legislación vigente, los alimentos elaborados a base de maíz deberán presentar un recuento de mohos y levaduras de entre  $10^2$  y  $10^4$  ufc/g. Valores de contaminación superiores implicarían la disminución en la calidad y abriría la posibilidad para especular sobre la presencia de metabolitos secundarios producidos por hongos micotoxigénicos. El estudio plantea la determinación de la calidad micológica en alimentos a base de maíz, además de identificar a nivel de especie la microbiota hallada, con énfasis en la identificación de las cepas del género *Fusarium*.

### **MÉTODO**

Se analizan 40 muestras seleccionadas en supermercados de Barcelona, correspondientes a: cereales en grano (maíz fresco en mazorca, maíz dulce, maíz rosetero, maíz para microondas), cereales en copos y expandidos (hojuelas de maíz, maíz frito), harinas y sémolas (harina de maíz) y pienso simple para animales (maíz partido). Las técnicas de recuento están de acuerdo a métodos estandarizados y desarrollados por la FDA[1]. Los mohos se identifican de acuerdo a Samson et al.[2]. La identificación de levaduras se realiza con API 20C Aux.

### **RESULTADOS**

Los recuentos dan: harina de maíz, rosetero y dulce  $10^3$  ufc/g; maíz para microondas, frito y en hojuelas  $10^2$  ufc/g; maíz fresco en mazorca  $10^5$  ufc/g; maíz partido  $2 \times 10^4$  ufc/g. Las especies halladas para el género *Fusarium* son: *Fusarium oxysporum* 38%, *F. solani* y *F. proliferatum* 25%, *F. tricinctum* y *F. verticillioides* 12%. Para los otros géneros: *Penicillium citrinum*, *P. glabrum*, *P. funiculosum*, *Aspergillus candidus*, *A. penicillioide*, *Acremonium charticola* y *A. strictum*. Para levaduras se tiene: *Candida culliculosa*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. sphaerica*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Kloeckera spp.*, *Pichia ohmeri*, *Rhodotorula glutinis*.

### **CONCLUSIONES**

Los elevados valores de recuento para el maíz fresco en mazorca y el maíz partido son atribuibles a la manipulación, al tipo de envasado y al alto contenido de humedad en el primer caso. La microbiota fúngica hallada se corresponde con la información de diferentes publicaciones.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.FDA. 1998. Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition. AOAC Internacional. Gaithersburg, USA.
- 2.Samson A, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. 1995. Introduction to food-borne fungi, 4th edn, Baarn/Wageningen: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

## **P046 EVALUATION OF HACCP SYSTEM TO CONTROL FOOD-BORNE SALMONELLOSIS IN RESTAURANT BY CLASSICAL AND PCR-BASED MICROBIOLOGICAL ANALYSIS**

Houda Berrada, José Miguel Soriano, Yolanda Picó, Jordi Mañes  
Laboratory of Bromatology and Toxicology Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot

*Salmonella* is currently considered the first cause of toxoinfections in industrialised countries. For this reason, the prevention of food-borne Salmonellosis is an objective of fundamental concern. The implementation of the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system was carried out in a restaurant of Valencia (Spain). The meals were divided in four groups first course, main course, accompaniment and dessert plate. In addition, flow charts with possible sources of contamination and a general HACCP worksheet is shown in detail with reference to Critical Control Points (CCPs) and their monitoring. After implementation of the HACCP system, classical and fluorogenic PCR microbiological analysis were carried out in 96 food samples in the studied restaurant. Both procedures did not detect the presence of *Salmonella* demonstrating the importance of the HACCP system to improve the food safety in restaurants.

- 1.J. Meng, M. P. Doyle. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. Bulletin de l'Institut Pasteur 96: 151-163 (1998).
- 2 J.M. Soriano, H. Rico, J.C. Molto, J. Mañes. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. Food Control 13: 253-261 (2002).

## **P047 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* ASOCIADAS A ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTO**

Dania Saavedra Castellanos<sup>1</sup>, Rosa Turati Manrresa<sup>1</sup>, Teresa Infante Dilu<sup>1</sup>, Regla Mora Guerra<sup>1</sup>, Iris Rodríguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de la Habana, Cuba

<sup>2</sup>-Centro Nacional de Biopreparados, Biocen, La Habana, Cuba

Los alimentos elaborados y los lácteos están entre los primeros productos involucrados en Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en nuestro país. Nos trazamos como objetivo realizar la identificación rápida de cepas de *Escherichia coli* utilizando medios de cultivos cromogénico y fluorogénico (CromoCC BioCen), además conocer la susceptibilidad antimicrobiana de estas cepas por el Método de Kirky-Bauer según las normas de la NCCLS 2002, se realizó la caracterización de los cultivos mediante el análisis de macrorestricción del ADN cromosomal con ayuda de la electroforesis de campo pulsante después de la digestión con enzima de restricción. Se estudiaron 51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de ETA, en Ciudad de la Habana, en el período de Enero-Diciembre de 2003. Con el medio de cultivo CromoCC se realizó la identificación más rápida, específico, confiables y más simple en el recuento de *Escherichia coli* en las muestras de alimento. El 33.3 %, 16.6% de las cepas fueron resistente a la tetraciclina y cloranfenicol respectivamente. La caracterización mediante el análisis de la electroforesis de campo pulsante reporto solo, 4 cepas con el mismo patrón de electroforesis que correspondieron a un mismo brote. El 55% de las cepas se aislaron de los productos elaborados. El análisis molecular de las cepas estudiadas, nos permiten demostrar que todas las cepas asociadas a un brote tienen el mismo perfil electroforético, además nos permiten proponer acciones que contribuyan con la calidad de los servicios y la salud del consumidor.

PALABRAS CLAVE: Enfermedades Transmitidas por Alimento, *Escherichia coli*, Susceptibilidad Antimicrobiana, Electroforesis de Campo Pulsante.

## **P048 INFLUENCIA DE LA CONDICIONES DE CONSERVACIÓN SOBRE LA MICROBIOTA DE JAMÓN COCIDO LONCHEADO SOMETIDO A ALTAS PRESIONES**

Claudia Ruiz-Capillas, Virginia Díaz Barcos, José Carballo, Francisco Jiménez Colmenero

Instituto del Frío, CSIC, Madrid

Ver resumen O04

## **P049 INACTIVACIÓN DE *S. senftenberg* EN HUEVOS ÍNTEGROS MEDIANTE LA ACCIÓN COMBINADA DE ULTRASONIDOS Y CALOR**

María Concepción Cabeza, María Luisa García, Lorenzo de la Hoz, Isabel Cambero, Juan Antonio Ordóñez

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid

Ver resumen O05

## **P050 EVOLUCIÓN MICROBIOLÓGICA Y SENSORIAL DE COLIFLOR PROCESADA COMO PRODUCTO DE 4ª GAMA**

Ana Fernández Peso<sup>1</sup>, Susana Sanz Cervera<sup>1</sup>, Carmen Olarte Martínez<sup>1</sup>, Fernando Ayala Zurbano<sup>2</sup>, José Federico Echávarri Granado<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Carmen Lomas Esteban<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Dpto. Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño

<sup>2</sup>-Dpto. de Química, Universidad de La Rioja, Logroño

Las especiales características de la coliflor que se produce en la zona de Calahorra (La Rioja), han llevado a la elaboración de la Indicación Geográfica Protegida "Coliflor de Calahorra". Con el objeto de promocionar y facilitar el consumo de esta hortaliza, se ha estudiado su adaptación a la tecnología de 4ª gama, es decir, el vegetal lavado y envasado listo para su consumo que, durante su vida útil, mantenga su carácter de producto fresco cumpliendo con la normativa higiénico-sanitaria vigente.

Para ello, partiendo de coliflor variedad 50/90, acogida a la I.P.G., se ha determinado la carga microbiológica (recuento de mesófilos y anaerobios) tras la operación de lavado y desinfección así como su evolución durante el almacenamiento (20 días a 4°C) en 4 films de (PVC perforado, P-Plus 120, 160 y 240). Se determinó la composición de la atmósfera en el interior de los envases (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) y la pérdida de peso durante el almacenamiento. Igualmente, se realizó una evaluación sensorial mediante panel entrenado de catadores y estimación instrumental del color. La medida instrumental se realizó con un espectrofotómetro CM 2600d, midiendo tanto el exterior de la coliflor como la zona de corte, con un rango de medida entre 400 y 700 nm cada 10 nm.

La coliflor presentó unos recuentos iniciales en torno a las 3 y 2.5 unidades logarítmicas por gramo de microorganismos mesófilos y anaerobios respectivamente. El lavado por inmersión en 50 ppm de cloro no supuso una reducción significativa de la carga microbiana.

Por su parte, el empleo de films de diferente permeabilidad llevó al establecimiento en el interior de los envases de atmósferas distintas que condicionaron la evolución tanto microbiológica como sensorial de la coliflor durante el envasado. Así, el límite microbiológico permitido para este tipo de productos se alcanzó solamente con los films de mayor permeabilidad (PVC y P-Plus 240) a partir del día 13 de almacenamiento. Sin embargo, desde el punto de vista sensorial solamente la coliflor envasada con P-Plus 120 fue capaz de obtener una valoración aceptable hasta el final del período de almacenamiento estudiado.

## **P051 REDUCCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FUMONISINA B<sub>1</sub> EN MAÍZ MEDIANTE EXTRUSIONADO**

Antonio Javier Ramos Girona, Miren Castells Portal, Sonia Marín Sillué, Vicente Sanchis Almenar  
Tecnología de Alimentos, Certa-UTPV, Universidad de Lleida

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas, producidas principalmente por *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*, que pueden encontrarse en diversos alimentos, especialmente en cereales como el maíz. Se conocen 13 tipos de fumonisinas, siendo la fumonisina B<sub>1</sub> (FBI) la más abundante y tóxica. Según la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC), la FBI pertenece al grupo 2B (posible cancerígeno humano).

La extrusión es un proceso de fabricación de alimentos en el que durante un periodo de tiempo relativamente corto la materia prima es sometida a altas temperaturas, originándose múltiples cambios, como la gelatinización del almidón, la desnaturalización de las proteínas, la inactivación de múltiples enzimas, la reducción de la carga microbiana y, tal y como han demostrado diversos autores, la descomposición térmica de algunas micotoxinas.

En el presente estudio se ha extrusionado harina de maíz naturalmente contaminada con FBI (1.91 µg/g, base seca) en una extrusora de tornillo simple (Compacto E 19/25 D, Brabender, Duisburg, Alemania) variando la temperatura (140, 170 y 200°C), la velocidad de tornillo (40, 90 y 140 rpm) y la humedad inicial de la harina (20, 25 y 30%). La FBI de las muestras extrusionadas fue extraída mediante el método de Shephard *et al.* (1990) y analizada mediante HPLC.

Los tres parámetros de extrusión afectaron significativamente ( $P < 0.05$ ) la estabilidad de la FBI. Dada la termoestabilidad de la toxina, cabría esperar una menor destrucción de la FBI a menor temperatura, pero se observó que la reducción resultante de la cocción a 140 y 200°C fue mayor que la obtenida a 170°C (reducciones del 69, 69 y 65%, respectivamente). La reducción de FBI resultante del procesado a 40 rpm fue significativamente mayor que la obtenida a 90 y 140 rpm, con porcentajes de reducción del 74, 66 y 64%, respectivamente. Aunque la transferencia de calor es mayor a mayor humedad, las reducciones obtenidas a 20% fueron significativamente mayores que las obtenidas a 25 y 30%, con reducciones del 71, 66 y 67%, respectivamente.

Aunque el extrusionado ha mostrado ser un método eficaz en la reducción de FBI, es necesario que se realicen más estudios para identificar y estudiar las propiedades toxicológicas de los posibles productos resultantes de la descomposición térmica de la FBI.

### **REFERENCIA**

Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG and Gelderblom WCA (1990). Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liquid Chromatogr.*, 13: 2077-2087.

## **P052 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE QUESOS TIPO MANCHEGO ELABORADOS CON CUAJO ANIMAL Y CON UN COAGULANTE VEGETAL EN POLVO**

José Fernández-Salguero, Antonio Pino, Montserrat Vioque, Rafael Gómez, Francisco Prados  
Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

Se elaboraron seis lotes de quesos tipo Manchego con leche cruda de oveja, adicionados de cultivos iniciadores, tres de los cuales se coagularon con cuajo animal (CA) y los otros tres con un coagulante vegetal en polvo (CVP), obtenido a partir de extractos acuosos de las flores desecadas del cardo *Cynara cardunculus* L. que ha sido patentado. Los quesos se maduraron a 12 °C de temperatura y 85 % de humedad relativa durante 6 meses, realizándose controles a los 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días de maduración. En cada control se analizaron diferentes parámetros físico-químicos (aw, pH, humedad, grasa, proteína, ceniza, cloruros y ácido láctico), bioquímicos (nitrógeno soluble, nitrógeno no proteico, nitrógeno aminoacídico y nitrógeno amoniacal) y recuentos de diferentes grupos microbianos (aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, estafilococos, micrococos, bacterias ácido lácticas, levaduras y mohos).

La mayoría de los parámetros y los recuentos microbianos estudiados evolucionaron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) a lo largo de la maduración. En líneas generales, el tipo de coagulante ensayado no afectó significativamente ( $p > 0.05$ ) a los parámetros físico-químicos estudiados. En cambio los contenidos en nitrógeno soluble y nitrógeno no proteico de los quesos elaborados con coagulante vegetal en polvo fueron significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a los de los quesos elaborados cuajo animal, debido a la mayor actividad proteolítica de las cipsinas o cardosinas del cardo frente a la quimosina y pepsina del cuajo animal.

Ninguno de los recuentos de los ocho grupos microbiológicos considerados se vio afectado significativamente ( $p < 0.05$ ) por el tipo de coagulante ensayado, presentando los lotes de quesos elaborados con cuajo animal y con coagulante vegetal en polvo unos recuentos similares durante los seis meses de maduración. Este fenómeno es debido a que el coagulante vegetal en polvo ensayado es esencialmente aséptico, a diferencia del extracto acuoso crudo de las flores del cardo que es como se utiliza habitualmente en la producción de quesos, tales como La Serena, Torta del Casar, Los Pedroches y muchas variedades portuguesas acogidas a Denominación de origen y, que como hemos comprobado en nuestro grupo, está fuertemente contaminado.

Los recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, estafilococos, micrococos y bacterias ácido lácticas de las cuajadas de todos los quesos del presente estudio fueron significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a los observados en las respectivas leches de partida.

## **P053 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE PROCESADO SOBRE LA INACTIVACIÓN DE *Lactobacillus brevis* SUSPENDIDO EN GAZPACHO MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD DE CAMPO**

Olga Martín Belloso, Amalia Díaz Lázaro, Pedro Elez Martínez

Departament de Tecnologia d'Aliments, UTPV-CeRTA, Universitat de Lleida

El gazpacho es una preparación culinaria típicamente veraniega. Actualmente, por exigencia de los consumidores, se encuentra gazpacho en el mercado. Pero este alimento está tratado térmicamente para garantizar su estabilidad microbiológica y ello implica pérdidas en su valor nutricional. Los pulsos eléctricos de alta intensidad de campo (PEAIC) son una tecnología emergente de conservación que pretende estabilizar microbiológicamente los alimentos afectando mínimamente a sus características nutricionales.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que ejercían los parámetros de procesado de los PEAIC sobre la inactivación de *Lactobacillus brevis* inoculado en gazpacho.

Se inoculó gazpacho esterilizado con *L. brevis* (CECT 216) ( $10^8$  ufc/ml) que se trató posteriormente mediante PEAIC en un equipo continuo de procesado. El gazpacho inoculado se sometió a campos eléctricos de 25 a 35 kV/cm y hasta 1000  $\mu$ s de tiempo de tratamiento aplicando pulsos eléctricos de onda cuadrada de 4  $\mu$ s de anchura a 200 Hz de frecuencia en modo monopolar y bipolar. Además, las muestras se procesaron a frecuencias de 50 a 450 Hz y a anchuras de pulso de 1 a 10  $\mu$ s para tratamientos de 30 kV/cm, 300  $\mu$ s y modo bipolar. La temperatura de las muestras nunca superó los 32 °C durante el procesado.

La máxima inactivación conseguida fue de 5,1 reducciones decimales cuando el gazpacho inoculado con *L. brevis* se procesó a 35 kV/cm durante 1000  $\mu$ s aplicando pulsos eléctricos bipolares de 4  $\mu$ s de duración a 200 Hz. Al aumentar el campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, se lograron mayores niveles de inactivación. Los PEAIC aplicados en forma bipolar fueron más efectivos en la inactivación microbiana que los aplicados en forma monopolar. Para un mismo campo eléctrico (30 kV/cm), tiempo de tratamiento (300  $\mu$ s) y polaridad (bipolar), la inactivación de *L. brevis* disminuyó al aumentar tanto la frecuencia como la anchura de pulso, siendo la inactivación de 3,4 reducciones decimales para una frecuencia de 50 Hz y de 2,4 reducciones decimales para una anchura de pulso de 1  $\mu$ s.

Los resultados obtenidos muestran que la inactivación de *L. brevis* suspendido en gazpacho mediante PEAIC depende de los parámetros de procesado: campo eléctrico, tiempo de tratamiento, polaridad, anchura y frecuencia de los pulsos eléctricos aplicados. Además, *L. brevis* puede ser inactivado a niveles de pasteurización al procesar gazpacho inoculado mediante PEAIC.

## **P054 OPTIMIZACIÓN DE TRATAMIENTO TÉRMICO EN CONSERVAS DE JUDÍAS VERDES DE LA VARIEDAD *Blue Lake***

Juan Ignacio Reguera Useros<sup>1</sup>, Agustín León Alonso-Cortés<sup>2</sup>

1-Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos

2-Tecnología de los Alimentos, E.TS.II.AA, Universidad de Valladolid, Palencia

### **Introducción**

Mediante la optimización de un tratamiento térmico se pretenden encontrar las condiciones de calentamiento y enfriamiento que minimicen en lo posible los procesos de degradación de nutrientes y los factores que afectan desfavorablemente a la calidad organoléptica, obteniendo un producto microbiológicamente seguro y organolépticamente estable.

El objetivo de este trabajo es encontrar las condiciones ideales del tratamiento de esterilización de conservas de judías verdes de la variedad *Blue Lake* en función de la termodestrucción microbiana y textura deseadas.

### **Material y métodos**

Para la destrucción microbiana de la conserva se tomó como referencia *Bacillus coagulans*, bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, esporulado, acidodúrico y termófilo, responsable en conservas vegetales de acidez media y alta de la alteración denominada "agriado plano". Sus parámetros cinéticos de termodestrucción se calcularon mediante el sistema de inoculación de esporas en un extracto del producto, tratado a 80, 90 y 95°C. En estudios de cocción se aplicaron a las judías tratamientos de 75, 85 y 95°C durante intervalos de tiempo comprendidos entre 5 y 60 min. Seguidamente se sometieron a pruebas de compresión en un texturómetro con accesorio de corte simple y se tomaron los valores máximos de resistencia al corte en Newtons.

### **Resultados y conclusión**

Se obtuvieron valores de 0,03 min para el tiempo de reducción decimal ( $D_{121}$ ) y de 9,25°C para su parámetro Z en los estudios de termodestrucción microbiana y de  $D_{100} = 15,50$  min y  $Z = 20,35$ °C en los estudios de cocción.

Para alcanzar una variación de textura y de termodestrucción microbiana de 1 y 5 unidades logarítmicas respectivamente, valores equivalentes a unos factores de cocción y esterilización de  $C_{100} = 15,50$  min y  $F_{121} = 0,15$  min, el proceso óptimo resulta ser de 104,47°C durante 9,43 min.

## **P055 EFECTO DEL TRATAMIENTO CULINARIO CON O SIN ENVASADO A VACÍO EN LA MICROBIOLOGÍA DEL LACÓN GALLEGO**

Ángel Cobos García, Ángeles Román Vilar, Olga Díaz Rubio

Área de Tecnología Alimentos, Dpto. de Química, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo

El lacón gallego es una salazón cárnica que tradicionalmente se consume tras desalado y cocción. El objetivo de este trabajo es estudiar la microbiología de trozos de lacón gallego desalados y cocidos envasados o no a vacío y conservados a distintas temperaturas.

Se obtuvieron trozos de lacones curados de unos 250 g de peso y se sometieron a desalado. Tras él, se tomó una muestra aseptícamente correspondiente al desalado y los restantes trozos se sometieron a cocción durante 1 hora, la mitad de ellos envasados a vacío. Se tomó entonces una muestra de lacón recién cocido y el resto se conservaron a 2°C, 10°C y 20°C durante 14 y 28 días. Se realizaron las siguientes determinaciones: recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, micrococáceas, bacterias lácticas, enterobacterias, clostridios sulfito-reductores y de *Staphylococcus aureus*, así como pruebas de presencia de *Salmonella*.

Los resultados se expresaron como log u.f.c./g. Los recuentos de aerobios totales fueron de 7,7 y 7,3 unidades logarítmicas para los lacones crudos curados y desalados, respectivamente, siendo la mayoría de ellos micrococáceas (7,3 y 7,1 unidades, respectivamente). Los recuentos de bacterias lácticas en el lacón crudo curado fueron de 2,7 y en los trozos desalados de 1,8 unidades. En cuanto a los recuentos de enterobacterias, los valores estuvieron siempre por debajo de 6 u.f.c./g. Las muestras cocinadas sin envasar presentaron un deterioro rápido a las temperaturas de conservación más altas, con recuentos de aerobios totales y de micrococáceas superiores a 9 unidades logarítmicas a los 14 días. Las muestras conservadas a 2°C sólo presentaron crecimientos a los 28 días de conservación y fueron inferiores a 5 unidades logarítmicas.

Las muestras cocinadas a vacío sólo presentaron crecimiento de mesófilos totales y de micrococáceas a los 28 días de conservación a las temperaturas más altas, y éstos fueron menores de 3 unidades. No se detectaron bacterias lácticas ni enterobacterias.

No se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ni clostridios sulfito-reductores en ninguna de las muestras analizadas.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL 2001-3007 (Ministerio de Ciencia y Tecnología y FEDER) y PGI-DIT02PXIC26201PN (Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia y FEDER-MAC).

## **P056 EFECTO DEL DESALADO A DIFERENTES TEMPERATURAS EN LA MICROBIOLOGÍA DEL LACÓN GALLEGO**

Olga Díaz Rubio, Ángeles Román Vilar, Ángel Cobos García

Área de Tecnología de los Alimentos, Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo

El lacón gallego es una salazón cárnica tradicional, reconocida como Indicación Geográfica Protegida por la Unión Europea desde el año 2001. Su proceso de elaboración es similar al del jamón curado, aunque de menor duración. La forma más común de consumir este producto es cocido, efectuando un desalado previo, realizándose en piezas enteras o en trozos. La escasa información disponible sobre la microbiología del lacón se refiere a la salazón cruda curada. No existe información sobre la microbiología del producto cocinado.

El desalado es un paso previo al tratamiento térmico que permite reducir el alto contenido de sal que posee este producto, mayor que el del jamón curado. Este desalado puede realizar a distintas temperaturas, siendo frecuente que se efectúe a temperatura ambiente, lo cual puede incidir en la microbiología del producto, ya que se prolonga durante 24 o más horas dependiendo del tamaño de la pieza.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de diferentes temperaturas de desalado en la microbiología de este producto.

Se obtuvieron trozos de lacones curados de unos 250 g de peso y se sometieron a desalado en agua durante 24 horas a tres temperaturas distintas; 2°C, 10°C y 20°C, efectuando un cambio de agua a las 8 horas. Se realizaron las siguientes determinaciones: recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, micrococáceas, bacterias lácticas, enterobacterias, clostridios sulfito-reductores y de *Staphylococcus aureus*, así como pruebas de presencia de *Salmonella*. Los resultados se expresaron como log u.f.c./g

No se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ni de clostridios sulfito-reductores en ninguna muestra.

Los recuentos de aerobios totales y de micrococáceas se incrementaron con la temperatura, siendo de 7,3 y 7,1 unidades, respectivamente, a la temperatura de desalado más baja, y de 8,2 y 7,7 unidades a la más elevada. Los recuentos de bacterias lácticas fueron algo más bajos al desalar a 2°C que a las otras dos temperaturas. Sólo se observó la presencia de enterobacterias en las muestras desaladas a 20°C.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL 2001-3007 (Ministerio de Ciencia y Tecnología y FEDER) y PGI-DIT02PXIC26201PN (Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia y FEDER-MAC).

## **P057 ENVASADO DE CORTES DE OVINO A VACÍO: SU INFLUENCIA EN LA VIDA ÚTIL Y EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA**

Oriol Barrera Fernández, Antonio Llanos Canseco, María Luisa García López, Andrés Otero Carballeira  
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria. Universidad de León

Objetivos: 1. Determinar la utilidad, en términos de vida útil del envasado a vacío de cortes de ovino. 2. Determinar los cambios en la microbiota de la carne de ovino asociados a dicho sistema de envasado. 3. Evaluar la eficacia antimicrobiana del tratamiento con nieve carbónica aplicado antes del envasado a vacío en el mismo tipo de producto.

A partir de 10 chuleteros de cordero, se obtuvieron asépticamente chuletas, que se dividieron en tres grupos: (a) una parte se colocó en bandejas (1-2 chuletas/bandeja) que se introdujeron en bolsas de BB4-L (Cryovac) e inmediatamente se envasaron a vacío, (b) un segundo grupo fue sometido a un tratamiento con nieve carbónica antes de su envasado a vacío (ídem grupo anterior), y (c) un tercer grupo se colocó en bandejas similares a las anteriores que únicamente se recubrían con una película permeable al oxígeno (ambiente aerobio, AO). Todos los grupos se almacenaron a refrigeración ( $3\pm 1^\circ\text{C}$ ) y, cada semana, se tomaba una bandeja para cuantificar, en la(s) chuleta(s) contenida(s) en ella, los parámetros siguientes: mesófilos aerobios (MA), psicrotrofos aerobios (PA), *Enterobacteriaceae* (E), bacterias ácido-lácticas (BAL), *Pseudomonas* (P), *Brochothrix thermosphacta* (Bt), clostridios psicrotrofos (CP), pH, volumen de extracto liberado (ERV) y evaluación sensorial. Los análisis se realizaron también en chuletas recién obtenidas y se prolongaron hasta que la carne mostraba una alteración organoléptica (olor y/o color) evidente.

De los resultados de dichos ensayos concluimos: 1. Con contaminaciones iniciales de 5 log ufc/g (pH entre 5,77 y 6,06), el envasado a vacío de chuletas de cordero incrementa significativamente su vida útil (unas 6 semanas de media respecto al envasado en AO). 2. La microbiota alterante de la carne envasada a vacío está constituida por BAL (su ritmo de crecimiento -rc- durante el almacenamiento a vacío fue de 0,63 log ufc/g y día) y E (rc=0,56), mientras que Bt no parecen desempeñar un papel relevante (rc=0,19) y el desarrollo de P (en nuestras muestras era el grupo dominante en la microbiota inicial), es eficazmente controlado por este tipo de envasado. 3. En las condiciones ensayadas, el tratamiento con nieve carbónica de la carne de ovino antes de su envasado a vacío no tiene trascendencia apreciable en términos de vida útil y composición de la microbiota.

Este trabajo ha sido financiado por el MCyT, proyecto IFD 1997-2278

## **P058 SUBLETHAL DAMAGE OF *Lactobacillus casei* AND ASSESSMENT OF THE RISK OF TRANSFORMATION BY PULSED ELECTRIC FIELDS**

Alejandro Rivas Soler, Dolores Rodrigo Aliaga, Vanessa Poulain, Manuel Zúñiga Cabrera, Miguel Rodrigo Enguádanos, Antonio Martínez López

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (I.A.T.A) Burjassot, Valencia

To guarantee that Pulsed Electric Fields (PEF) technology does not compromise food safety, sublethal damage and the chance of recovery of electrotransformants under several conditions were studied. *Lactobacillus casei* (CECT 5275), a lactic acid bacteria commonly found in a variety of foodstuffs, was chosen as a model organism.

PEF treatments were performed with an OSU-4D bench-scale continuous PEF system. Six co-field treatment chambers were connected in series. Cooling coils were connected before and after each pair of chambers and submerged in a circulating refrigerated bath to maintain the treatment temperature within the designed range (11 to 20°C) (inlet temperature 11°C, maximum treatment temperature 20°C).

*L. casei* sublethal damage was evaluated by the difference in counts of PEF treated cells plated in MRS and in SMRS (MRS supplemented with 0.3 M sucrose). Electrotransformant formation was detected with the shuttle vector pIA $\beta$ 8. This plasmid carries a chloramphenicol resistance determinant that is functional in *L. casei*. After PEF treatment, cells were harvested by centrifugation, resuspended in MRS supplemented with 0.3 M sucrose, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, incubated for 2 h at 37°C and spread on SMRS agar plates containing 5 µg/ml chloramphenicol.

Up to 3.4 decimal reductions were achieved under the conditions of this study. PEF treatment caused sublethal damage to cells prepared following a standard procedure for electroporation. No transformants were recovered after PEF treatment under our experimental conditions.

## **P059 GENERACIÓN DE VOLÁTILES EN CARNE POR MICROORGANISMOS AISLADOS DURANTE EL PROCESADO DE JAMÓN CURADO**

María José Sosa Zuñil, Juan José Córdoba Ramos, Ramón Cava López, Mercedes Alonso Candela, Félix Núñez Breña  
Higiene de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres

La formación de algunos compuestos volátiles de gran interés en el aroma de productos cárnicos puede estar relacionada con el metabolismo microbiano de los aminoácidos libres. De hecho, se han utilizado microorganismos proteolíticos como cultivos iniciadores para mejorar el sabor y el aroma de embutidos y de jamón curado. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de microorganismos proteolíticos en la formación de compuestos volátiles en carne, para su selección como cultivos iniciadores.

En este trabajo se utilizaron 9 cocos Gram + catalasa +, 4 lactobacilos y 2 levaduras aislados del interior de jamón curado durante el proceso de maduración. Se inocularon en filetes estériles de lomo de cerdo con 5% de NaCl, utilizándose muestras estériles como control. Las muestras de carne se distribuyeron en envases estériles con una solución de cloruro potásico sobresaturada para favorecer la desecación, simulando las condiciones de maduración de productos cárnicos. Las muestras se incubaron durante 30 días a 18°C. Los compuestos volátiles fueron extraídos por microextracción en fase sólida con fibra de carboxenpolidimetilxilosano e identificados por GC-MS. Para la identificación final de los compuestos volátiles se calcularon sus índices de Kovats y se compararon sus espectros con los de las bibliotecas NIST/EPA/NISH y Wiley.

La mayor parte de los compuestos detectados en carne estéril proceden de reacciones de oxidación lipídica, especialmente hidrocarburos, etanol y aldehídos lineales. Sólo pudieron observarse esporádicamente en algunas muestras estériles pequeñas cantidades de compuestos relacionados con el catabolismo de aminoácidos. En la mayoría de las muestras inoculadas con cocos Gram + catalasa + y lactobacilos se detectaron valores medios superiores de alcoholes y ácidos ramificados y ésteres a los observados en los controles. De las levaduras ensayadas una de ellas incrementó, respecto al control, los niveles de 3-metil butanol, ácido 3-metil butanoico y benceno-etanol, mientras que la otra cepa aumentó el contenido de benceno-etanol, 1,3-dimetil benceno, benceno acetaldehído, dimetil disulfuro y metanotiol. La inoculación de microorganismos proteolíticos aislados del interior de jamón curado provoca en carne madurada un incremento de compuestos volátiles derivados del catabolismo de los aminoácidos. La combinación de algunos de estos microorganismos como cultivos iniciadores puede ser de gran interés para el desarrollo del aroma en productos cárnicos madurados.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto INIA CAL02-085 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## **P060 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y SENSORIAL DE LOMO DE CERDO PIETRAIN PARCIALMENTE DESHIDRATADO**

Claudia Clavijo Olmos, María Jesús Cantalejo  
Química Aplicada, Universidad Pública de Navarra

La deshidratación es un método de conservación muy antiguo en el que el crecimiento microbiológico se paraliza por la eliminación de agua del producto. La liofilización y la deshidratación a vacío son los métodos más utilizados. El primero es muy costoso pero permite obtener productos de buena calidad, mientras que el segundo requiere menos tiempo y energía pero debe ser optimizado para obtener un producto aceptable.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar el efecto de las condiciones de deshidratación a vacío previamente optimizadas sobre la vida útil de filetes de lomo de cerdo Pietrain, además de definir cuál de los dos tiempos de deshidratación ensayados era mejor.

Para este estudio deshidratamos filetes de cerdo Pietrain en un equipo "vacuum cooling" con fuente de calor durante 80 y 120 minutos.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: De acuerdo a los parámetros microbiológicos se consiguió alargar la vida útil de los filetes de cerdo deshidratados parcialmente envasados a vacío y almacenados a una temperatura entre 1-2 (deg)C de 10 días para la carne sin tratar hasta 34 días en la carne deshidratada. No se apreciaron diferencias significativas en los recuentos microbianos ni en las determinaciones de degradación de grasas y proteínas para los dos tiempos de deshidratación empleados. La carne deshidratada presentó recuentos bajos de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, microorganismos psicrótrofos, además de ausencia de los siguientes microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus* enteropatógeno, *Salmonella spp*, coliformes totales y *Escherichia coli*.

Los filetes deshidratados parcialmente presentaron cambios significativos en la actividad del agua y la humedad del producto, lo cual explica su estabilidad microbiana. En cambio, sensorialmente, el tiempo de vida útil observado fue de 27 días. Se presentaron cambios en el aspecto general, color y textura con ausencia de olor. En cuanto a la textura, se observó que la carne pierde firmeza y se vuelve gomosa; este hecho es más evidente en la carne tratada durante 120 minutos. Esos cambios pueden ser debidos a que, a mayor tiempo de tratamiento, se producen modificaciones importantes en la estructura interna de la carne. La carne deshidratada durante 80 minutos presentó mejor color y aspecto general así como una mayor firmeza.

Los resultados de este estudio nos permiten concluir que el mejor tiempo de deshidratación fue el de 80 minutos de acuerdo a todos los aspectos estudiados.

## P061 PODER ANTIBACTERIANO DE ACEITES ESENCIALES COMERCIALES DE ESPECIAS

José María de la Osa Moreno, Andrés Benezet Casarrubios, Marina Botas Soto, Eva Pedregal Domarco, Nieves Olmo Sánchez, Fernando Pérez Flórez  
Laboratorios ANVISA

### INTRODUCCION

Se ha investigado el poder antibacteriano de los aceites esenciales de las especias más utilizadas en la elaboración de productos cárnicos, con objeto de comprobar un posible efecto conservador de la especia de procedencia, independientemente de su acción sobre los caracteres organolépticos.

El estudio se ha efectuado sobre tres especies bacterianas: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

### MATERIAL Y METODOS

Para la detección de la posible inhibición del crecimiento bacteriano, se han distribuido los aceites esenciales a diferentes concentraciones en un medio de agar (TSA).

Los aceites esenciales estudiados procedían de las siguientes especias: Clavo, comino, ajo, nuez moscada, orégano, perejil, pimienta negra y pimienta blanca.

### RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Hasta la fecha, Mayo 2004, los resultados están incompletos, por encontrarse el estudio en fase de elaboración, por lo que se especificarán en el trabajo definitivo.

## P062 SEGURIDAD ALIMENTARIA EN PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS. ANTIMICROBIANOS NATURALES Y ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA

Marta Hugas<sup>1</sup>, Anna Jofré<sup>2</sup>, Margarita Garriga<sup>2</sup>, Teresa Aymerich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-EFSA, Bruselas, Bélgica.

<sup>2</sup>-Microbiología y Biotecnología Alimentarias, Centro de Tecnología de la Carne, IRTA, Monells

La seguridad alimentaria es uno de los principales objetivos, tanto a nivel institucional como de consumidor. Los productos cocidos, loncheados, envasados y listos para el consumo constituyen una fuente de riesgo ya que leves contaminaciones durante las etapas del post-procesado permiten el rápido desarrollo de patógenos debido a la carencia de microbiota endógena competitiva y de diversos parámetros físico-químicos asociados al producto, que no son suficientes para inhibir el crecimiento de algunos patógenos alimentarios. Las técnicas de envasado más utilizadas en estos productos son el envasado al vacío y las atmósferas modificadas. Sin embargo, últimamente se están barajando diferentes alternativas tales como, la aplicación de la alta presión hidrostática y los antimicrobianos naturales.

En este estudio se ha valorado el incremento de la seguridad alimentaria en jamón cocido elaborado con lactato potásico o nisina, loncheado, envasado al vacío, sometido a alta presión hidrostática (HHP) a 400 MPa 10 min 17°C y conservado en refrigeración durante 3 meses a 1°C ó 6°C.

Los tratamientos más efectivos para *Salmonella* fueron la HHP y la HHP combinada con la nisina. La HHP produjo un descenso inmediato de los recuentos de *Salmonella*, los cuales se mantuvieron hasta el final del periodo de conservación en niveles inferiores a 4 NMP/g. No obstante, sólo en el 50% de las muestras que contenían nisina pudo constatarse la ausencia del mismo. Para *Listeria monocytogenes*, la combinación de la HHP, la presencia de lactato potásico y la refrigeración a 1°C produjo un efecto sinérgico de inhibición del crecimiento del mismo que conllevó una reducción de 7 log frente al lote control no tratado y conservado a 6°C.

## P063 CONTROL BIOLÓGICO DE PODREDUMBRES FÚNGICAS EN POSTCOSECHA DE FRUTA MEDIANTE EL USO DE UN NUEVO BIOFUNGICIDA (*Pantoea agglomerans* EPS125)

Jesús Francés, Anna Bonaterra, Jordi Cabrefiga, M. Carmen Moreno, Esther Badosa, Emilio Montesinos

Institut de Tecnologia Agroalimentària CeRTA-CIDSAV, Universitat de Girona

*Pantoea agglomerans* EPS125 se aisló mediante la técnica de enriquecimiento selectivo a partir de una pera Doyenne du Comice. La cepa es objeto de una patente (WO 02/098233 A1) y se identifica mediante un patrón específico de macrorestricción genómica obtenido mediante electroforesis de campo pulsante (MRFLP-PFGE). Puede producirse a escala semiindustrial por fermentación líquida y se formular como producto deshidratado mediante liofilización, atomización o encapsulación manteniendo la viabilidad durante varios meses en condiciones adecuadas de conservación.

EPS125 es eficaz en la inhibición de infecciones por *Penicillium expansum* en manzana y pera tanto en condiciones de almacenamiento comercial en frigoconservación y atmósfera controlada como en condiciones simuladas de mercado. Además controla también podredumbres causadas por *Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer* en frutos de hueso (ciruela, albaricoque, melocotón, cerezas y nectarinas) y *Botrytis cinerea* en fresas.

EPS125 es eficaz a concentraciones superiores a 10<sup>7</sup> UFC ml<sup>-1</sup> para inóculos bajos y medios de patógeno. Además coloniza, se multiplica y sobrevive en heridas de frutos, mientras que en su superficie presenta una baja supervivencia. Las células de EPS125 coinoculadas con el patógeno en extractos de frutos producen una inhibición significativa de la germinación de las

conidias. Sin embargo, no se observa efecto inhibitorio cuando el antagonista y el patógeno se separan físicamente mediante un filtro de membrana que permite únicamente el intercambio de nutrientes y de metabolitos. Por tanto, la inhibición del patógeno, requiere que se establezca una interacción directa con la cepa sin que haya una contribución significativa de la producción de antibióticos ni de la competencia por nutrientes. Se propone como mecanismo de control biológico del patógeno su exclusión por colonización preferente de las heridas por el agente de biocontrol y por interacción directa.

Actualmente se está estudiando los mecanismos responsables del control biológico mediante mutagénesis por transposones, para lo que se han obtenido un total de 4000 mutantes usando el minitransposón GUS que se están estudiando en pruebas *in vitro* y *ex vivo*.

#### **P064 COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* O157:H7 DURANTE EL CULTIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L, VARIEDAD ROMANA) EN SUELO FERTILIZADO CON ESTIÉRCOL DE BOVINO**

Ma. Refugio Torres-Vitela, Elisa Cabrera-Díaz, Rosa del Carmen Olivares-Cruz, Raúl Montaña-Rosales, Edgar Vinicio Villalpando-Arteaga

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Universidad de Guadalajara, México

Ver resumen O11

#### **P065 VALORACIÓN CUANTITATIVA DEL RIESGO DE LISTERIOSIS EN ALIMENTOS LISTOS PARA CONSUMO EN NAVARRA**

V. Garrido, A. I. Vitas, B. Sesma, M. L. Verbo, E. Alonso, I. García-Jalón.

Dpto. Interfacultativo de Microbiología y Parasitología. Universidad de Navarra

Ver resumen O12

#### **P066 EFECTO DE LA EVISCERACIÓN EN LA ACUMULACIÓN DE AMINAS BIOGENAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN HIELO DE MERLUZA DEL MEDITERRÁNEO (*Merluccius merluccius*)**

Sonia Baixas-Nogueras, Tommaso Lavizzari, Sara Bover-Cid, Teresa Veciana-Nogués, M. Carmen Vidal-Carou

Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona

Ver resumen O13

#### **P067 INCIDENCIA DE *Campylobacter* spp., *E. coli* O157 Y *Yersinia enterocolitica* EN CANALES PROCEDENTES DE ANIMALES DE ABASTO SACRIFICADOS EN MATADEROS DE CASTILLA Y LEÓN**

Susana González Llamazares, José María Zumalacárregui Rodríguez,

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León

#### **INTRODUCCIÓN**

Recientemente ha entrado en vigor la Directiva 2003/99/EC del Parlamento Europeo y del Consejo en donde se establecen medidas de vigilancia de las zoonosis y de los agentes zoonóticos, que deben ser llevadas a cabo en todas las fases de la cadena alimentaria, incluida la fase de producción primaria. En los mataderos, tiene lugar una contaminación de las canales tanto con microorganismos patógenos -responsables de zoonosis- como de alterantes, fundamentalmente a partir del contenido intestinal, pieles, superficies y personal, que hace necesario la realización de controles microbiológicos a la luz de la citada Directiva. Por todo ello, el objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la incidencia de: *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* y *E. coli* O157 en las canales procedentes de animales de abasto sacrificados en mataderos de la CCAA de Castilla y León.

#### **METODOLOGÍA**

Durante el tiempo comprendido entre los meses de Abril a Noviembre de 2003 se analizaron 216 canales -36 de vacuno, 36 de porcino, 72 de ovino y 72 de aves-, obtenidas en 10 mataderos de la CCAA de Castilla y León. Para la toma de muestras se siguió el método no destructivo descrito en la D. C. 2001/471/EC. El aislamiento y detección de *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica* se llevaron a cabo según los métodos ISO 11272, ISO 16654 e ISO 11273, respectivamente.

#### **RESULTADOS**

De las 216 canales analizadas, se detectó la presencia de *Campylobacter* spp. en 12 -11 de aves y 1 de ovino- lo que supone un nivel medio de contaminación del 5,56%, no detectándose su presencia ni en canales de vacuno ni de porcino. Por especies cabe destacar una mayor incidencia de *C. jejuni* con un 4,17% frente a *C. coli* con un 0,93%.

Por otra parte se observó la presencia de *E. coli* O157 en 15 canales, -2 de vacuno, 3 de ovino y 10 de aves- lo que supone un nivel de contaminación del 6,94%. No se detectó la presencia del antígeno H7 en ningún serotipo O157.

Por último se puso en evidencia la presencia de *Yersinia enterocolitica* tan sólo en 1 canal de vacuno lo que supone un nivel de contaminación del 0,46%. Sin embargo, no se encontró este patógeno en ninguna canal de porcino a pesar de que se considera el principal reservorio.

## **P068 SEGURIDAD ALIMENTARIA EN SALAS DE DESPIECE DE CARNE FRESCA: EMPLEO DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA VERIFICACIÓN DEL SISTEMA HACCP**

María del Carmen Delgado Simón, Ana María Rivas Rubio, Virginia Jiménez Balbuena  
Servicio de Salud Pública, Instituto de Salud Pública Comunidad de Madrid, Aranjuez, Madrid

### **INTRODUCCIÓN**

La legislación vigente a nivel europeo y nacional señala la obligatoriedad de la implantación de un sistema de autocontrol basado en los principios del sistema HACCP en las salas de despiece de carnes frescas. Uno de estos principios establece la necesidad de proceder a la verificación para comprobar la efectividad del sistema, con el fin de proteger la salud del consumidor.

### **OBJETIVOS**

Demostrar la importancia de los controles microbiológicos en la verificación de los Prerrequisitos y sistema HACCP en las salas de despiece de carnes frescas.

### **MÉTODOS**

-Revisión bibliográfica con el fin de estudiar los peligros microbiológicos en las carnes frescas.  
-Inclusión de los parámetros microbiológicos establecidos en la legislación vigente y por organismos oficiales como referencia para la verificación.

### **RESULTADOS**

Los controles microbiológicos proporcionan garantías de que se está gestionando adecuadamente la seguridad de las carnes frescas, permitiendo introducir las modificaciones pertinentes en el sistema para evitar las futuras desviaciones del mismo. En concreto, los citados controles facilitan la verificación de los Prerrequisitos: Plan de Limpieza y Desinfección, Buenas Prácticas de Manipulación y Plan de Abastecimiento de Agua. Con la verificación de éstos se consigue una sólida base en la que se asentará el sistema HACCP.

### **CONCLUSIONES**

La calidad microbiológica de las carnes frescas se puede mejorar sustancialmente a través del sistema HACCP y sus Prerrequisitos. El control microbiológico representa una herramienta útil para verificar el buen funcionamiento de los sistemas HACCP.

### **BIBLIOGRAFÍA**

-Martín Bejarano S. Enciclopedia de la carne y de los productos cármicos. Ed. Martín y Macías. 2001.  
-Mortimore S, Wallace C. HACCP: Enfoque Práctico. Ed. Acribia S.A. 2001.

## **P069 INCIDENCIA DE ENTEROBACTERIAS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7 Y *Salmonella* EN MANZANAS GOLDEN DELICIOUS**

Maribel Abadías, Teresa Paula Cañamás, Àngels Asensio, Immaculada Viñas  
Àrea de Postcollita, Centre UdL-IRTA, Lleida

El interés por la contaminación microbiológica de frutas y hortalizas frescas ha crecido durante los últimos años por la aparición de algunos brotes de enfermedades de transmisión alimentaria debidos al consumo de frutas y hortalizas o sus derivados. Algunos de ellos se han descrito en EEUU y fueron causados por el consumo de zumo de manzana no pasteurizado contaminado con *Escherichia coli* O157:H7. Las fuentes de contaminación del zumo no fueron determinadas, pero se sugirieron distintos factores durante la pre- y poscosecha. Actualmente, el creciente consumo de frutas y hortalizas mínimamente procesadas ha despertado un gran interés en conocer la contaminación microbiana de la materia prima y así definir los posibles riesgos y establecer las correctas medidas de prevención y eliminación de microorganismos. El conocimiento de la contaminación microbiana de frutas y hortalizas en general, y de patógenos de transmisión alimentaria en particular, aún está en las primeras etapas de estudio, no existiendo ninguno en manzanas.

El objetivo principal de este trabajo fué la determinación de la incidencia de enterobacterias, coliformes termotolerantes, *E. coli*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* en manzanas Golden Delicious. Para determinar el posible origen de estos microorganismos, se tomaron muestras en tres puntos: después de la cosecha, después de la conservación y manipulación en central y en establecimientos de venta al público. La determinación se hizo por métodos oficiales de análisis. Las cepas de *E. coli* aisladas se enviaron al Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Lugo, España) para determinar su virulencia mediante PCR.

Se analizaron un total de 36 muestras procedentes de 12 campos, 36 de 3 centrales hortofrutícolas y durante 12 meses, 144

muestras de 6 establecimientos distintos. La contaminación por enterobacterias fue muy variable. Las cepas más frecuentemente aisladas pertenecieron al género *Pantoea*. Un 17% de las muestras procedentes de campo, un 22% de las de las centrales y un 10% de las procedentes de establecimientos presentaron contaminación por coliformes termotolerantes, siendo *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* los géneros principalmente aislados. Ninguna de las muestras analizadas presentó *Salmonella* ni *E. coli* O157:H7. No obstante, 3 muestras procedentes de campo, 5 de central y 2 de establecimientos mostraron contaminación por *E. coli*, no presentando ninguno los genes de virulencia de los seis grupos de *E. coli* diarregánicos patógenos para los seres humanos.

## **P070 EVALUACION DE RESULTADOS EN EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE COMIDAS PREPARADAS SEGUN REAL DECRETO 3484/2000**

Asunción López Sevilla<sup>2</sup>, Xavier Lizana Alcazo<sup>1</sup>, Silvia Belsa Miret<sup>2</sup>, Ivan Ortega Diez<sup>3</sup>, Monica Godall Herms<sup>3</sup>, Miriam Cadena Gonzalo<sup>2</sup>, Vanesa Urgatondo Casadevall<sup>2</sup>, Guillermo Cardona Victory<sup>3</sup>, Jacinta Calderón Rodríguez<sup>3</sup>, Marc Tarragó Galceran<sup>3</sup>, Mónica Cervellón Sasot<sup>4</sup>, David Falguera García<sup>4</sup>

1-Gerencia

2-Laboratorio

3-Consultora

4-Administración. Asesoría y Consultoría Sanitaria, S.L.(ACONSA)

Las comidas preparadas constituyen un grupo heterogéneo que, actualmente, está regulado por el Real Decreto 3484/2000 por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas.

Durante el periodo 2002 y 2003, se analizaron en el laboratorio de microbiología de ACONSA un total de 10395 muestras de alimentos procedentes de establecimientos de elaboración y distribución de comidas preparadas (restaurantes, cocinas de hoteles y cocinas de colectividades).

Al 16,3 % (1699 muestras) se les aplicó el criterio microbiológico para grupo A –comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.-; al 10,7% (1120 muestras) se les aplicó el criterio microbiológico para grupo AIFC - comidas preparadas que lleven como ingredientes productos fermentados o curados-; y al 73% (7576 muestras) se les aplicó el criterio microbiológico para grupo B -comidas preparadas con tratamiento térmico-.

Los % de muestras correctas-incorrectas en cada grupo fué:

Grupo A: 36,8% correctas – 62,2% incorrectas.

Grupo AIFC: 97,7% correctas- 2,3 incorrectas.

Grupo B: 70,6% correctas – 29,4 incorrectas.

Del total de muestras incorrectas clasificadas como grupo A, el 93,2% presentaron resultados alterados en alguno/s de los parámetros indicadores, el 6,4% en alguno/s de los testigos de falta de higiene y el 0,4% presentaron alguno de los dos patógenos investigados. En las muestras clasificadas como grupo AIFC los porcentajes obtenidos en cuanto a alteraciones de testigos de falta de higiene y patógenos fueron de 92,3% y 7,7% respectivamente. Del total de muestras incorrectas clasificadas como grupo B los porcentajes de alteraciones en parámetros indicadores, parámetros testigos de falta de higiene y presencia de patógenos fueron de 93,8%, 5,5% y 0,7% respectivamente.

Dentro de la heterogeneidad de este tipo de muestras, las clasificadas como A y AIFC, son las que presentan una matriz más compleja desde el punto de vista microbiológico. La variedad de ingredientes que pueden presentar los diferentes platos incluidos en estos grupos dificulta la interpretación real de la calidad higiénica de los mismos.

En el protocolo de recogida se incluye la toma de datos como: ubicación, fecha de elaboración, temperatura, etc., que se utilizan en la interpretación de los resultados analíticos. También se realiza una revisión del estado higiénico en el que se encuentran las instalaciones (Checklist). Se presentan las correlaciones obtenidas entre los resultados analíticos y los datos resultantes de las revisiones.

## **P071 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA RESPONSABLE DE LA PRESENCIA DE OTA Y OTRAS POSIBLES MICOTOXINAS EN PAN DEL MERCADO NACIONAL**

Francisco Manuel Valle Algarra<sup>1</sup>, Angel Medina Vayá<sup>2</sup>, Gabriela Gonzalez Trujillo<sup>2</sup>, Rufino Mateo Castro<sup>1</sup>, Jose Vicente Gimeno Adelantado<sup>1</sup>, Misericordia Jiménez Escamilla<sup>2</sup>

1-Dpt. Química Analítica, Universitat de València, Burjassot

2-Dpt. de Microbiología i Ecología, Universitat de València, Burjassot

Es conocido desde hace tiempo que todas las cosechas de cereales se encuentran contaminadas en mayor o menor medida con especies fúngicas productoras de micotoxinas. Los hongos implicados pertenecen principalmente a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Alternaria*.

Entre los cereales ocupa un lugar destacado el trigo y sus derivados especialmente el pan. El consumo de pan y otros productos de bollería, pastelería, papillas, etc. es habitual y generalizado entre toda la población especialmente la población infantil. Los niveles de consumo humano de estos productos son superiores a los de cualquier otro producto derivado del resto de cereales. La contaminación del trigo con hongos productores de micotoxinas se consideraba un riesgo debido a la posible producción de estos metabolitos tóxicos, sin embargo ha dejado de ser un riesgo potencial y se ha convertido en un riesgo real. Estudios llevados a cabo en los últimos años en nuestro país (Legarda & Burdaspal, 2001, Alimentaria, pp 89-96) indican

que el 100 % de las muestras de pan comercializadas en España presentan ocratoxina A (OTA).

El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la microbiota contaminante de trigo responsable de la presencia de OTA y otras posibles micotoxinas en pan y otros derivados del trigo.

Se analizaron un total de 38 muestras de trigo. Los resultados obtenidos indicaron que el 100 % de las muestras analizadas están contaminadas con especies del género *Aspergillus*. Dentro de este género todas las muestras presentaron contaminación por *A. flavus/A. parasiticus.*, hongos de la sección *Nigri* fueron aislados en el 20% de las muestras y *A. ochraceus* en el 25% de las mismas. La presencia de estos hongos explica la alta incidencia de OTA en los derivados de este cereal.

*Penicillium* spp fue aislado en el 87%. *Fusarium* spp en el 13%. Hay que destacar la presencia de *F. verticillioides* y *F. graminearum* productores de fumonisinas y tricotecenos y zearalenona respectivamente. *Alternaria* spp fue aislada en el 95% de las muestras.

En base a los resultados obtenidos se están llevando a cabo estudios en nuestro laboratorio encaminados a la optimización de la metodología analítica para la evaluación de OTA y otras micotoxinas en trigo y sus derivados.

## **P072 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN EMPRESAS DEL SECTOR DE TRANSFORMADOS VEGETALES**

Javier Pérez de Juan, Arantxa Azqueta, Montserrat Lana, Ana Martínez, Daniel Rico, Javier Ignacio Jaurequi  
CNTA-Laboratorio del Ebro

### **INTRODUCCIÓN**

Se estudió la contaminación ambiental (aire / superficies) en empresas de transformados vegetales (sectores de conservas, congelados y IV Gama) por su potencial repercusión en la salubridad del producto final.

### **METODOLOGÍA**

Se han muestreado en cinco días distintos 4-6 puntos de las instalaciones de producción en:

- 5 empresas conserveras (campaña del espárrago en junio, tomate en septiembre y pimiento en octubre del 2003).
- 3 empresas congeladoras (septiembre 2003-febrero 2004).
- 2 empresas de IV gama (agosto 2003-febrero 2004).

En cada uno de los puntos se realizaron las siguientes determinaciones:

- Recuento de mesófilos aerobios en superficies mediante placas rodac (Count tact, Biomerieux) e incubación a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 h.
- Medición de bioluminiscencia en superficies de 20 cm<sup>2</sup> por bioluminiscencia (Hy-lite 2, Merck).
- Medición de la contaminación aérea en placas de PCA utilizando muestreador de aire (MAS-100, Merck) e incubación 24 h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **RESULTADOS**

- Los valores medios de contaminación aérea en empresas conserveras oscilaron entre  $2.14 \pm 0.72$  y  $4.41 \pm 0.25$  (log ufc/m<sup>3</sup>); los de contaminación superficial entre  $1 \pm 1$  y  $24 \pm 3$  ufc/cm<sup>2</sup> y los de bioluminiscencia entre  $9 \pm 9$  y 4950 rlu/cm<sup>2</sup>, no observándose diferencias entre distintos puntos salvo una menor contaminación en almacén.
  - Los valores medios de contaminación aérea en empresas congeladoras oscilan entre  $2.07 \pm 0.78$  y  $3.66 \pm 0.49$  (log ufc/m<sup>3</sup>); los de contaminación superficial entre  $0 \pm 1$  y  $15 \pm 5$  (ufc/cm<sup>2</sup>) y los de bioluminiscencia entre  $2 \pm 2$  y  $128 \pm 120$  (rlu/cm<sup>2</sup>). Se observó que la contaminación microbiológica ambiental disminuye según avanza la línea de procesado.
  - En empresas de IV Gama, los valores medios de contaminación aérea oscilan entre  $0.89 \pm 0.78$  y  $2.92 \pm 0.82$  (log ufc/m<sup>3</sup>); los de contaminación superficial entre  $1 \pm 1$  y  $3 \pm 3$  (ufc/cm<sup>2</sup>) y los de bioluminiscencia entre  $5 \pm 4$  y  $180 \pm 407$  (rlu/cm<sup>2</sup>).
- No se observaron diferencias significativas entre empresas del mismo sector:

### **CONCLUSIONES**

- En orden decreciente de contaminación ambiental estarían: conserveras, congeladoras y IV gama. Posiblemente es debido a la menor temperatura ambiente de las dos últimas. En empresas conserveras se ha observado una menor contaminación en la campaña del pimiento, producido en los meses más fríos.
- En superficies, no existe correlación entre el recuento de microorganismos mesófilos aerobios y el valor de bioluminiscencia.
- Los valores de contaminación aérea obtenidos son, en ocasiones, superiores a los valores aconsejados por la bibliografía para establecimientos alimentarios, sin que se hayan observado problemas microbiológicos en la calidad del producto elaborado.

## **P073 MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE MÚLTIPLES MICOTOXINAS EN ALIMENTOS MEDIANTE HPLC-MS**

Félix Núñez Breña, Raquel Acosta Guerrero, María J. Sosa Zuñil, Miguel A. Asensio Pérez, Elena Bermúdez Polo  
Higiene de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres

Diferentes mohos toxigénicos pueden producir toxinas en alimentos mantenidos a temperatura ambiente, como jamón, embutidos y quesos. Existe una gran diversidad de métodos de detección con sensibilidad adecuada para las exigencias legales, pero disponibles para un limitado número de micotoxinas, y no permiten el análisis de varias micotoxinas simultáneamente en estos productos.

El objetivo del trabajo es diseñar una metodología basada en HPLC-MS para la detección e identificación simultánea de diversas micotoxinas en jamón, embutidos y quesos.

Se ha diseñado un método para la separación de 13 micotoxinas producidas por especies de mohos habituales en alimentos: aflatoxinas B1 y G1, ocratoxina A, citrinina, roquefortina, esterigmatocistina, ácidos ciclopiazónico, micofenólico y secalónico, fumitremorgina B, griseofulvina, paxilina y verruculógeno.

El método resultante ha sido de 40 min con fases móviles agua y 0,05% ácido trifluoroacético en acetonitrilo en gradiente a flujo de 0,8 ml/min. Utilizando este método se han elaborado curvas patrón para las micotoxinas con correlaciones superiores a 0,99.

Para su ensayo se añadieron diversas concentraciones de una mezcla de micotoxinas a queso, salchichón y jamón. Las muestras se homogenizaron con 60 ml de 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo:agua (9:1) y 50 ml de hexano. Tras 1 h en agitación se pasaron a embudo de decantación y se separó la fase del acetonitrilo, que se evaporó. El extracto se resuspendió en 0,5 ml de acetonitrilo y se analizó por HPLC-MS. Se detectaron las micotoxinas añadidas en concentraciones inferiores a 1 ppm. A menores niveles (ng/g) no se detectaron en ningún sustrato el ácido micofenólico y la citrinina y en queso y embutido tampoco los ácidos secalónico y ciclopiazónico. Por lo tanto, el método diseñado permite la detección de una gran diversidad de micotoxinas de forma simultánea, aunque debido a los límites que para este tipo de toxinas aparecen en la legislación es necesario optimizar la extracción y purificación para aumentar la sensibilidad con algunas de ellas.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto 2PR02A051, cofinanciado por la Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura y el Fondo Social Europeo. R. Acosta es beneficiaria de una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## **P074 RIESGOS MICROBIOLÓGICOS EN DIFERENTES TIPOS DE ESPECIAS**

Ana M<sup>a</sup> Sánchez Cánovas, M<sup>a</sup> Angeles Castaño Garrido, Gracia Martínez Reina, Isabel M<sup>a</sup> Magaña Martínez, M<sup>a</sup> José Barnés Campos

Laboratorio Microbiología Consejería de Sanidad, Murcia

### **INTRODUCCIÓN:**

Debido a la publicación en el DOCE de fecha 10/1/2004 de una Recomendación de la Comisión de 19/12/2003, relativa a un programa de Control Oficial de Productos Alimenticios para el año 2004. Todos los estados miembros de la UE efectuarán inspecciones y controles, con recogida de muestras y su análisis en los laboratorios.

En el Laboratorio Regional de Salud Pública de la Consejería de Sanidad de Murcia, se ha puesto en marcha dicho programa para "evaluar la seguridad bacteriológica y toxicológica de las especias".

Las especias pueden contener un número elevado de microorganismos. Si no se someten a un tratamiento adecuado, pueden provocar un rápido deterioro del alimento que se quiere realizar.

Se ha determinado que las especias son la fuentes primarias de focos de intoxicaciones alimentarias, cuando se añaden a los alimentos. Esta posibilidad es mucho mayor cuando se utilizan las especias en alimentos que pueden no haber sido sometidos a un tratamiento térmico completo.

### **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Partiendo de la Reglamentación Técnico Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Comercio de Condimentos y Especias (BOE 22/12/84) y posteriores Reales Decretos (31/01/97). Las especias y condimentos estarán libres de microorganismos patógenos o sus toxinas y se tolerarán los siguientes límites: *E.coli* 10 colonias/g; Cl.sulfito-reductores 1000 colonias /g; *Salmonella* Ausencia/25 g.

Y siguiendo con el DOCE L6/31 de 10/01/2004 en el que se determina: Recuento de enterobacterias, *Salmonella*, Recuento de *Bacillus cereus* y Recuento de *Cl.perfringens*.

Se determinaron los microorganismos presentes en ambas legislaciones, excepto Cl.sulfito-reductores.

Para su análisis se han seguido las siguientes normas:

Norma EN-ISO 5552:1997 para Recuento de enterobacterias.

ISO 7932: 1993 para Recuento de *Bacillus cereus*.

ISO 7937:1997 para Recuento *Cl. perfringens*

Para *Salmonella* se ha utilizado el Sistema Mini-Vidas(Biomérieux®)

*E. coli*:Técnica NMP.

## RESULTADOS:

Hemos analizado en este año 2004 un total 85 muestras procedentes de distintas empresas de la Región de Murcia. De los distintos parámetros analizados ninguna muestra sobrepasa los límites establecidos para *E. coli*.

*Bacillus cereus*: Solo una de las muestras pertenecientes a un pimentón ha dado un resultado insatisfactorio (>10.000 ufc/g).

*Clostridium perfringens*: Solo una muestra perteneciente a una raíz de cúrcuma ha dado un resultado insatisfactorio (>1000 ufc/g).

Enterobacterias: Parámetro sobrepasado por el 52'94% de las muestras analizadas.

*Salmonella*: Se ha aislado en el 14'11% de las muestras analizadas y la mayor proporción han sido en Cúrcuma y Pimentón dulce. Está en estudio la tipificación de dichas *Salmonellas*.

Se comprueba que existe una gran proporción de enterobacterias, siendo el mayor peligro la alta presencia de *Salmonella*.

## P075 APLICACIÓN DE UNA FICHA DE CONTROL DE BUENAS PRÁCTICAS DE HIGIENE Y FABRICACIÓN EN PEQUEÑAS INDUSTRIAS DE EMBUTIDOS TRADICIONALES

Silvina Graciela Fadda<sup>1</sup>, Teresa Aymerich<sup>1</sup>, Marta Hugas<sup>2</sup>, Margarita Garriga<sup>1</sup>

1-Microbiología y Biotecnología Alimentarias, IRTA - Centro de Tecnología de la Carne, Monells

2-EFSA, Bruselas, Bélgica

Este trabajo tuvo como objetivo identificar los puntos críticos de control (PCC) y evaluar los pre-requisitos de cada empresa para llevar a cabo un sistema de autocontrol dentro de un plan de APPCC.

Un estudio previo permitió analizar la tipología de los productores de embutidos tradicionales y la elaboración de un perfil de los fabricantes catalanes (Fadda y col. 2004). De 50 productores se seleccionaron 10 para ser estudiados en el presente trabajo. Estos fueron clasificados de acuerdo a su capacidad para llevar a cabo un sistema de autocontrol y a la eficiencia del programa higiénico aplicado en el equipamiento de su empresa. Para ello, se elaboró un cuestionario que contenía dos partes, una con preguntas relativas a infraestructura y posibilidad de implementar un sistema de autocontrol y la otra relacionada con PCC y calidad higiénica del equipamiento y productos. Se asignó una puntuación a cada una de las 105 preguntas. Como criterio se estableció que las fábricas que sumaran 30 puntos o más, en cada una de las partes del cuestionario, fueran clasificadas como "Suficientes".

Todas las fábricas evaluadas obtuvieron puntuaciones superiores al mínimo estipulado. En la evaluación del equipamiento, las cámaras frías y las mezcladoras fueron clasificadas como "muy limpias" (criterio:  $\leq 200$  ufc *Enterobacteriaceae*/100cm<sup>2</sup>) y ausencia de patógenos. Las embutidoras registraron altos niveles de contaminación y se las clasificó como "no limpias" detectándose *L. monocytogenes* en el 29% de las mismas.

Según la clasificación higiénica de sus productos, todas las fábricas obtuvieron la máxima puntuación, lo que indica la ausencia de patógenos de acuerdo a los criterios acordados (*Salmonella*: ausencia en 25 g; *L. monocytogenes*:  $\leq 100$  ufc/g; *S. aureus*:  $\leq 500$  ufc/g).

Las fábricas estudiadas poseían una adecuada infraestructura para la implementación de un sistema de autocontrol y presentaron un programa de higiene eficiente. Sin embargo ciertos puntos deberían ser corregidos: alta temperatura y baja humedad de zonas de recepción y almacenamiento de materias primas, excesivo tiempo de desalado de tripas y presencia de *L. monocytogenes* en algunas máquinas.

La aplicación sistemática de esta ficha ayudará a los productores a controlar más eficazmente los PCC mejorando la calidad higiénica de obradores y productos y en consecuencia la productividad.

### Bibliografía:

Fadda, S.; Aymerich, T.; Hugas, M. y Garriga, M. Eurocarne, 2004, 123:105-112.

## P076 INCIDENCIA DE *Salmonella spp* Y *Campylobacter spp* EN ALIMENTOS Y SU RELACIÓN CON LAS TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS

C. Zigorraga<sup>1</sup>, J.C. Kárkamo<sup>1</sup>, C. Oria<sup>2</sup>

1-Laboratorio de Salud Pública de Guipúzcoa

2-Unidad de control de alimentos, Subdirección de Salud Pública de Gipuzkoa

Los microorganismos zoonóticos que mas frecuentemente están asociados a las toxiinfecciones alimentarias y gastroenteritis en la Comunidad Autónoma Vasca son *Salmonella spp* y *Campylobacter spp*. El reservorio principal de estos microorganismos se encuentra en los animales de producción, siendo los alimentos de origen animal la vía de transmisión mas frecuente de las toxiinfecciones alimentarias. Una de las actividades que conlleva el estudio y seguimiento del riesgo microbiológico a lo largo de la cadena alimentaria, es conocer la prevalencia de estos microorganismos en alimentos de riesgo. Por ello, se ha estudiado la incidencia de estos gérmenes en alimentos de riesgo comercializados en nuestro entorno.

Durante los años 2002 al 2004 se han analizado muestras de huevos, ovoproductos, carne de ave, y derivados cárnicos destinadas al consumo humano.

La incidencia de *Salmonella spp*. en huevos es del 9 al 17%, en carne de aves del 15 al 22%, mientras que en derivados cárnicos la incidencia de *Salmonella* es mayor; obteniéndose aislamientos en el 25 al 35% en las muestras analizadas.

La incidencia de *Campylobacter spp*. en carne de pollo oscila del 64 al 72%, mientras que en los derivados cárnicos la incidencia disminuye casi a la mitad.

Teniendo en cuenta los serotipos de *Salmonella* aislados, el serotipo *enteritidis* ha sido el más frecuente: el 70 % de los huevos contaminados por *Salmonella* correspondían al serotipo *enteritidis*, siendo éste también el serotipo detectado en el 80% de las toxiinfecciones alimentarias ocurridas durante los cinco últimos años en nuestra área. Por otra parte, el huevo y sus derivados han sido los alimentos implicados en el 70 % de las toxiinfecciones alimentarias en este periodo de tiempo.

Los alimentos estudiados presentan un nivel de contaminación elevado de estas bacterias zoonóticas. Tal y como propone la normativa comunitaria en materia de control de infecciones zoonóticas, para disminuir la prevalencia de estos microorganismos en los alimentos se deberán establecer medidas preventivas eficaces encaminadas a evitar la contaminación, desde el origen y a lo largo de la cadena de producción y comercialización.

## **P077 INFLUENCIA DEL MODO DE CRECIMIENTO DE *Listeria monocytogenes* Y *Salmonella spp.* EN SU HIDROFOBICIDAD Y ADHERENCIA A SUPERFICIES DE CONTACTO CON ALIMENTOS**

Ana Belén Araújo Rodríguez, Julia Carballo Rodríguez

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo

### **INTRODUCCIÓN**

*Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* son bacterias patógenas que pueden contaminar alimentos y producir toxiinfecciones alimentarias. Estas bacterias son capaces de adherirse a superficies y, como consecuencia, han sido aisladas de diferentes zonas en industrias de procesamiento de alimentos.

La hidrofobicidad y el modo de crecimiento son características bacterianas que influyen en su adherencia a superficies.

En este estudio se ha investigado la influencia del modo de crecimiento de las bacterias en su hidrofobicidad superficial y en su grado de adherencia a materiales utilizados en la industria alimentaria.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para este estudio se han utilizado tres cepas de *L. monocytogenes* y tres de *Salmonella spp.* aisladas de alimentos.

Todas las cepas fueron incubadas en medio sólido (MS, TSA), medio líquido con agitación (MLCA, TSB) y medio líquido sin agitación (MLSA, TSB).

La hidrofobicidad superficial de las bacterias se determinó mediante el método del ángulo de contacto entre gotas de fluido y capas lisas y compactas de bacterias recogidas en filtros. El resultado obtenido se expresó en grados (°).

Las superficies utilizadas en los experimentos de adherencia fueron acero inoxidable tipo 304, polietilentereftalato (PET) y goma tipo 158, todos de uso común en la industria alimentaria.

Los materiales fueron incubados con suspensiones de bacterias durante 1 hora a temperatura ambiente y el número de bacterias adheridas se determinó mediante recuento en placa tras su desprendimiento de los materiales por sonicación. Los resultados se expresaron como "número de UFC adheridas / mm<sup>2</sup> de material".

### **RESULTADOS**

Las cepas de *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* cultivadas en MS mostraron una menor hidrofobicidad superficial y una mayor adherencia que cuando se cultivaron en ML.

El empleo de agitación durante el cultivo de las bacterias también influyó en las propiedades superficiales, ya que las bacterias crecidas en MLCA resultaron más hidrofóbicas y mostraron un menor grado de adherencia en comparación con las crecidas en condiciones estáticas (MLSA).

### **CONCLUSIÓN**

Las condiciones de crecimiento de las bacterias influyen en sus propiedades superficiales como la hidrofobicidad y, como consecuencia, en su grado de adherencia a superficies sólidas. Un mejor conocimiento de los factores que influyen en la adherencia de bacterias a superficies contribuirá a la prevención de la contaminación de las mismas en la industria alimentaria.

## **P078 SALMONELOSIS FAMILIAR Y TRANSMISIÓN VERTICAL DESDE SUS PROPIAS GALLINAS**

Eduardo Urarte<sup>1</sup>, Gorka Aduriz<sup>2</sup>, Fernando González<sup>1</sup>, Bernardino Moreno<sup>2</sup>, Jon Imanol Esteban<sup>2</sup>, Ana Hurtado<sup>2</sup>, Esther García<sup>1</sup>, Aurora Echeita<sup>3</sup>, Jose Ramon Orive<sup>4</sup>

1-Subdirección de Salud Pública de Alava, Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz

2-NEIKER, Inst. de Investigación y Desarrollo Agrario, Derio-Bizkaia

3-Centro Nacional de Microbiología, Inst. de Salud Carlos III, Madrid

4-Servicio de Ganadería, Diputación Foral de Alava, Vitoria-Gasteiz

En esta comunicación se describe el seguimiento de un brote familiar por *Salmonella* ocurrido el 4/08/03 en una familia alavesa que tradicionalmente mantenía un pequeño gallinero de 18 gallinas en las inmediaciones de su casa rural.

El alimento sospechoso que provocó la intoxicación fue la mayonesa casera que había sido elaborada y consumida al instante, por tres miembros de la misma familia. Una cuarta persona no consumió mayonesa.

Las muestras de pienso (granos de trigo y compuesto comercial), agua de los bebederos y huevos, tomadas el 18/08/03 y analizadas en el laboratorio de la Subdirección de Salud Pública de Alava, resultaron positivas a *Salmonella*. En dos docenas de huevos no se aisló *Salmonella* en la cáscara y sí en el interior.

Se sacrificaron todas las gallinas (18) ponedoras de la casa y tras la necropsia realizada en el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER) el 9/09/03 se tomaron muestras de hígado, ovario y huevos en formación de cada uno de los animales. En tres gallinas se detectó la presencia de *Salmonella* en alguna de las muestras y en una, en todas las muestras analizadas. Esta última presentó recuentos de 4.920 ufc/ml de huevo.

Todas las cepas de *Salmonella* aisladas, en una persona afectada, pienso, agua, huevos, hígado, y ovario, fueron enviadas a tipificar al Centro Nacional de Microbiología-Instituto Salud Carlos III y se identificaron como *Salmonella enterica* subespecie I, serotipo *Enteritidis* 9,12: gm:-, lisotipo 6a.

## **P079 Salmonella Y ANTIBIOTICOS EN HAMBURGUESAS COMERCIALES**

José Luis Caso, Marta Cuesta

Universidad de Oviedo

A lo largo del último trimestre de 2003 se analizaron hamburguesas de ternera y de pollo elaboradas en tres establecimientos de Oviedo pertenecientes a otras tantas cadenas de supermercados. Los análisis consistieron en: 1) detección de posibles antibióticos en la carne; 2) determinación de presencia/ausencia de *Salmonella*; 3) serotipificación de las cepas de *Salmonella* aisladas; y 4) determinación de los fenotipos de resistencia a antibióticos de las mismas.

El bioensayo sobre *B. subtilis* permitió detectar la posible presencia de antibióticos (sin confirmación definitiva) en un 44 % de las muestras, tanto de ternera como de pollo. En todos los casos, los datos sugieren que podría tratarse de tetraciclinas o beta-lactámicos, salvo un caso sospechoso de sulfamidas.

Por otro lado, se ha observado presencia de *Salmonella* en un 33 % de las hamburguesas de ternera y en un 67 % de las de pollo, pero estos porcentajes varían entre los tres establecimientos: en los supermercados A y C solo apareció esporádicamente, mientras que en el B fueron positivas el 100 % de las muestras.

El serotipo predominante es *Typhimurium* (56 %), seguido de *Enteritidis* (25 %), *Agona* (13 %) y *Rissen* (6 %).

Todas las cepas aisladas, tanto de *Salmonella* como de otras enterobacterias, son resistentes como mínimo a tetraciclina, pero la mayoría son multirresistentes (hasta a 7 de los 15 antibióticos ensayados). Por otro lado, hemos encontrado resistencias a 13 de los 15 fármacos, quedando exceptuados únicamente el ciprofloxacino y el imipenem. Como era de esperar, el mayor número de resistencias se da para los antibióticos más antiguos y/o baratos (tetraciclina, beta-lactámicos, sulfamidas, etc.), con algunas excepciones que se pueden explicar por mecanismos de resistencia cruzada. Así, casi un 50 % de los aislados son resistentes a gentamicina, antibiótico poco probable como selector de resistencias, ya que es relativamente caro y se emplea muy escasamente en humanos (vía parenteral y vía tópica) y virtualmente nada en animales; sin embargo, es muy probable que el antibiótico selector haya sido la apramicina, aminoglucósido ampliamente utilizado en veterinaria y zootecnia, que presenta resistencia cruzada con gentamicina y otros antibióticos de la familia.

## **P080 PREVALENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN LA INDUSTRIA DE VEGETALES CONGELADOS. DIFICULTAD DE PROPUESTA DE ESTRATEGIAS PARA SU REDUCCIÓN**

Jorge Flores Ruiz<sup>1</sup>, Eva Andreu Reyes<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Carmen Martínez Graciá<sup>1</sup>, Juan Ángel Carrillo Piñero<sup>2</sup>, Alejandro Nombela Otero<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Periago Castón<sup>1</sup>, Gaspar Ros Berrueto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria

<sup>2</sup>-Lajara Gestión Alimentaria del Mediterráneo, S.L.

### **OBJETIVO**

Detectar y controlar la presencia de *Listeria monocytogenes* en una industria de vegetales congelados en cuyos productos finales se identificó la presencia de este patógeno con una prevalencia del 100% (n= 30). Adoptar medidas correctoras de control y reducción.

### **METODOLOGÍA**

Siguiendo el método FDA se evaluó un total de 57 superficies de trabajo (tomadas con hisopos), 9 subproductos y 10 muestras de agua de distintas zonas de la línea de procesado. En un primer análisis se muestrearon 30 superficies de trabajo, 5 subproductos y 5 muestras de agua. Posteriormente se analizaron las muestras que habían resultado positivas en el primer análisis (12 superficies, 2 subproductos y 3 muestras de agua). Finalmente, se realizó un tercer análisis repitiendo las muestras positivas del segundo (5 superficies, 2 muestras de alimento y 2 muestras de agua). Se aplicaron medidas correctoras de procedimiento, limpieza y desinfección encaminadas a reducir o eliminar los factores favorecedores del asentamiento y multiplicación de *L. Monocytogenes*. Se realizó un seguimiento aleatorio de la producción sobre producto acabado (10 muestras en cada estudio).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el primer análisis se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en el 40 % de las superficies, 100 % de las muestras de alimento y el 75 % de las muestras de agua. En el segundo el 25 % de las superficies positivas en el primer estudio, el 50 % de las muestras del subproducto y el 66% de las muestras de agua fueron nuevamente positivas a la presencia del patógeno. En el tercer y último se detectó una prevalencia del patógeno en el 40 % de las superficies, el 50 % de las muestras de alimento y en el 100% de las muestras de agua. Aunque se evidenció la reducción de la contaminación en ciertos puntos críticos la prevalencia en el producto final siguió siendo del 100%.

### **CONCLUSIONES**

Las medidas adoptadas consiguen una reducción de la presencia de *L. monocytogenes* en superficies, subproducto y agua. Sin embargo, los resultados del tercer análisis ponen de manifiesto la gran resistencia de este patógeno cuando se adhiere a equipos y superficies de trabajo en este tipo de industrias formando "biofilms" y convirtiéndose en focos potenciales de diseminación, para asegurar su eliminación sería necesario verificar la ausencia del microorganismo en las superficies durante un período de tiempo prolongado, lo que resulta complicado por la necesidad de interrumpir la producción.

## **P081 POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Psychrobacter* spp. DE DIFERENTES ORÍGENES**

Isabel García-López, Jose M<sup>a</sup> Rodríguez-Calleja, Jesus Santos Buelga, M<sup>o</sup> Luisa García-López

Dpto de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León

El género *Psychrobacter*, actualmente incluido en la familia *Moraxellaceae* está constituido por cocobacilos Gram-negativos, inmóviles, aerobios estrictos que se encuentran con frecuencia en ambientes naturales y alimentos proteicos refrigerados. Habitualmente se relacionan con la alteración de éstos últimos y, a pesar de que ocasionalmente se han aislado de muestras clínicas, las bacterias de este género se consideran saprofitas no existiendo datos acerca de su capacidad para expresar características habitualmente asociadas con la virulencia. Este trabajo se ha realizado con el fin de investigar posibles factores de virulencia en una colección de cepas de *Psychrobacter* de diferentes orígenes.

La población objeto del estudio estaba constituida por 27 cepas. De ellas, 15 procedían de la Colección Belga (BCCM/LMG) y el resto fueron aisladas por nosotros de carne de conejo y moluscos bivalvos. El origen primero de las cepas de colección era: varias especies de pescado (6), muestras clínicas (3), queso (3), carne de pollo (2) y salchichas irradiadas (1). Las cepas de nuestra colección fueron identificadas por métodos fenotípicos y un ensayo concluyente de transformación.

Se investigaron las siguientes propiedades: actividades proteolítica, lipolítica y elastolítica, producción de sideróforos, capacidad de incorporar rojo Congo y actividad hemolítica frente a eritrocitos de diferentes especies (oveja, conejo, yegua, perro y vaca). Ninguna de las cepas hidrolizó la lecitina, la tributirina ni la elastasa. Todas mostraron actividad lipolítica en Tween 80 a 22°C y un débil efecto sobre este sustrato cuando se incubaron a 4,5°C. La mayoría fueron proteolíticas y todas poseían la capacidad de producir sideróforos y de incorporar rojo Congo. En relación con la hemólisis, lisaron eritrocitos de perro (26 cepas), conejo (25 cepas), oveja (25 cepas) y yegua (24 cepas) pero no de vacuno.

La disponibilidad de hierro es un factor importante en el desarrollo de infecciones. Un número considerable de bacterias Gram-negativas patógenas lo obtienen mediante la producción de sideróforos y/o mediante la producción de hemolisinas que

liberan el hierro unido al grupo hemo. La capacidad de incorporar rojo Congo se utiliza como marcador de virulencia en algunas bacterias patógenas. Estos datos podrían ayudar a explicar la presencia de estas bacterias en muestras clínicas y plantean la posibilidad de que los alimentos actúen como vehículo de las mismas. Este trabajo se ha financiado con el proyecto CICYT AGL2000-1159.

## **P082 INVESTIGACIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Aeromonas* spp. AISLADAS DE AGUA POTABLE Y TRATADA**

Angélica Villarruel-López<sup>1</sup>, Elizabeth Fernández-Rendón<sup>2</sup>, Laura Ofelia Orozco-Hernández<sup>1</sup>, Graciela Castro-Escarpulli<sup>2</sup>, Lydia Mota de la Garza<sup>2</sup>

1-Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Dpto. de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara

2-Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Las enfermedades infecciosas son uno de los principales problemas en países subdesarrollados. Éstas afectan especialmente a la población infantil, siendo la diarrea la manifestación más frecuente. Los mecanismos de patogenicidad de *Aeromonas* no se han establecido con exactitud, sin embargo, se han identificado gran número de estructuras y enzimas extracelulares consideradas factores de virulencia. El objetivo fue investigar el riesgo relacionado a la presencia de cepas de *Aeromonas* spp. productoras de toxinas, en agua potable y agua residual tratada utilizada para riego de áreas recreativas en el Distrito Federal, México. Se analizaron 240 muestras, 144 de tres plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) y 72 de dos plantas potabilizadoras (PP). El muestreo se realizó mediante el hisopo de Moore, el cual se colocó durante 30 min en los contenedores del agua efluente e influente de las plantas seleccionadas. El hisopo se enriqueció en agua peptonada alcalina e incubó a 28°C durante 8 h para las muestras provenientes de los influentes de las PTAR y 24h para el resto de las muestras. Para la investigación de *Aeromonas* se utilizó el agar almidón ampicilina, las placas se incubaron durante 24h a 28°C. Las cepas fueron identificadas por el sistema API 20E y por el método de Vitek. A las cepas de *Aeromonas* obtenidas, se les investigó la producción de hemolisinas, caseinasa gelatinasa y enterotoxinas, esta última por la prueba de asa ligada en rata. Aquellas cepas que presentaron producción de enterotoxina se les realizaron, además, la prueba de Sereny, captación de rojo congo y la resistencia a diferentes concentraciones de cloro residual. Se obtuvieron 76 muestras positivas, de las cuales 46 fueron de muestras provenientes de las PTAR y 30 de las PP. En total se obtuvieron 100 cepas (38 *A. caviae*, 35 *A. hydrophila* y 27 *A. veronii* bv *sobria*), de ellas 90 fueron productoras de caseinasa y gelatinasa, 96 cepas tuvieron actividad hemolítica sobre eritrocitos de carnero y de humano, 30 cepas (17 *A. hydrophila*, 9 *A. caviae* y 4 *A. veronii* bv *sobria*) produjeron enterotoxina. De las 30 cepas enterotoxigénicas, 5 dieron positiva la reacción de rojo congo, dos la prueba de Sereny, las 30 cepas resistieron una concentración de cloro de hasta 1 mg/L durante 20 min. La presencia de cepas toxigenicas en agua destinada para uso y consumo humano, poniendo en riesgo la salud de la población por su capacidad de producir infecciones gastrointestinales y heridas.

## **P083 AISLAMIENTO DE CEPAS ENTEROTOXIGÉNICAS DE *Clostridium perfringens* EN TRES ALIMENTOS CÁRNICOS COCINADOS**

Verónica Navarro-Hidalgo, María de los Angeles Olea-Rodríguez, Alejandro Castillo-Ayala, Ma. Refugio Torres-Vitela  
Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Depto de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, México

La frecuencia de cepas enterotoxigénicas de *C. perfringens*, se realizó en 151 muestras: 50 birria de res, 50 pozole y 51 tamales de picadillo procedentes de la zona metropolitana de Guadalajara, México. La porción analizada fue la carne. A cada muestra, además del *C. perfringens*, (Técnica NMP 333, Saint John), se determinó la microbiota presente: Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Organismos Coliformes, Mohos y levaduras, pH y temperatura. El título de las toxinas de las cepas aisladas se cuantificó por el efecto enterotoxigénico sobre células Vero (Gentry y Darlrymple).

De las 151 muestras estudiadas, en 78 (52 %) se aisló a *C. perfringens*, 44 % en pozole, 50 % en birria y 61 % en tamal. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de detección del patógeno por alimento estudiado. La cantidad de *C. perfringens* osciló entre 2.3 y 5.4 log<sub>10</sub> NMP/g. El promedio de BMA fue de 2.7 para birria, 2.5 para pozole y 1.3 para tamales. Los coliformes no se detectaron en muestras de birria de tamales; el promedio de coliformes osciló entre 1.1 y 4 log<sub>10</sub> UFC/g en el 4 % de las muestras de pozole. Mohos y levaduras no fueron recuperados en ningún tipo de alimento. No hubo correlación entre la cantidad de *C. perfringens* y el recuento de la microbiota asociada.

La temperatura de comercialización de muestras positivas al patógeno osciló entre 35°C y 65°C. El análisis de regresión indicó una correlación significativa (P < 0.01) entre temperaturas debajo de 60°C y la presencia de *C. perfringens* con > 2.0 log<sub>10</sub> NMP/g.

El pH de las muestras osciló entre 5.5 y 6.5, favorable para el crecimiento del microorganismo.

Se aislaron 118 cepas de *C. perfringens*. Fueron dos los efectos enterotoxigénicos observados en las tres variedades de alimentos: efecto citotónico (alargamiento) en 35 % de las cepas, mientras que el 26 % produjo efecto citotóxico (lisis celular) y 9 % de las cepas produjeron ambos efectos. El título del filtrado bacteriano produjo un efecto sobre células Vero a partir de 1:80 a 5,120.

El aislamiento de cepas enterotoxigénicas a partir de alimentos cárnicos cocinados pudiera tener impacto en el aseguramiento de la inocuidad de estos alimentos.

## **P084 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *L.monocytogenes* EN ALIMENTOS Y SUPERFICIES DE TRABAJO/ÚTILES EN LA REGIÓN DE MURCIA EN EL AÑO 2002**

Gracia Martínez Reina, Ana M<sup>a</sup> Sánchez Cánovas, M<sup>a</sup> Angeles Castaño Garrido, Angela Ruíz Hernández, M<sup>a</sup> Dolores Chumilla Valderas  
Laboratorio Microbiología, Consejería de Sanidad, Murcia

### **INTRODUCCIÓN**

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la cadena alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección. En el verano de 2002 la Consejería de Sanidad tuvo conocimiento de varios casos de afectados por *Listeria* en la Región por lo que trató de localizar la existencia de algún alimento común entre ellos por si pudiera tratarse de un brote. Se tomaron muestras de alimentos, similares a los consumidos por los enfermos, en hospitales y empresas de alimentación, así como en superficies de trabajo y útiles.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se analizaron un total de 155 muestras: 52 alimentos, 66 superficies de trabajo y 37 superficies de útiles. Los alimentos analizados fueron: carnes y productos cárnicos (25), queso fresco (10), jamón cocido y paleta cocida (11), otros (6).

Para los análisis se utilizó el sistema VIDAS LMO2 (Biomérieux), ensayo inmunoenzimático, que detecta Presencia/Ausencia de *L. monocytogenes*, con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98%. El ensayo se hizo semicuantitativo mediante la obtención de distintas diluciones de las muestras y posterior análisis.

En la caracterización molecular se aplicó Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE), con las condiciones: Ascl, pulsos 1s-40s, 6V/cm, 23h y Apal, pulsos 0,1s-25s, 6V/cm, 21h.

### **RESULTADOS**

En el análisis de las carnes y productos cárnicos encontramos 10 resultados positivos, con niveles inferiores a 100 ufc/g. En queso fresco se dieron 8 positivos, de los cuales el 50% fue mayor de 1000 ufc/g y en jamón cocido/paleta también se obtuvieron 8 aislamientos, siendo uno de ellos mayor de 1000 ufc/g. En el resto de los alimentos no se detectó la presencia de *L. monocytogenes*. Por otra parte, del total de superficies analizadas un 12% resultaron positivas.

La caracterización molecular mostró que los alimentos y superficies estudiados, tenían la mayoría de ellos idéntico pulstipo (*L. monocytogenes* ser 4b, PFGE 4), mientras que sólo dos de los enfermos analizados dieron dicho pulstipo, por lo que no se pudo demostrar que se tratara de un brote, sino casos aislados.

Las técnicas moleculares permitieron, por tanto, descartar en este caso la existencia de un brote por *Listeria monocytogenes* y por otra parte, la investigación de alimentos llevó a una inspección sanitaria exhaustiva que permitió la detección y eliminación de posibles focos.

## **P085 TÉCNICA PARA AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE *Bacillus cereus* EN MUESTRAS DE ESPECIAS**

M<sup>a</sup> Ángeles Castaño Garrido, M<sup>a</sup> Gracia Martínez Reina, Ana M<sup>a</sup> Sánchez Cánovas, M<sup>a</sup> Dolores Vilella Martínez, Ana M<sup>a</sup> Vivas Gil  
Laboratorio de Microbiología, Consejería de Sanidad, Murcia

### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS:**

*Bacillus cereus*, es un microorganismo que puede producir intoxicaciones alimentarias en humanos.

Los alimentos secos como especias se contaminan fácilmente con sus esporas. No se analiza rutinariamente en el Laboratorio, por lo que su incidencia real puede ser superior a la estimada. Además el cuadro clínico se confunde a menudo con los producidos por *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*.

En los brotes de intoxicación el aislamiento de *B.cereus* no es problema debido a su alto número en el alimento involucrado, sin embargo si está en pequeña cantidad se puede complicar el aislamiento del germen por la presencia de gérmenes antagónicos. Esto se ve potenciado en las especias debido a la gran cantidad de flora acompañante que presentan. Contiene además agentes antimicrobianos naturales que podrían inhibir el crecimiento de *B. cereus* e influir en los recuentos. Otro problema es que el procedimiento de análisis que describe la Norma ISO no es específico sólo para *B. cereus* sino también para otras especies de *Bacillus* próximos pero menos comunes y los análisis de confirmación no los diferencian.

Por todo lo anteriormente expuesto, hemos intentado depurar esta técnica para sortear los obstáculos que nos impedían en aislamiento del germen.

### **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Hemos analizado hasta la fecha 82 muestras de especias. Tomando como base la Norma UNE-EN ISO 7932 de 1998, elaboramos nuestro propio Protocolo Normalizado de Trabajo, que consiste en: Preparar diluciones decimales hasta -6. Inocular 1ml de cada dilución en placas Petri con medio de cultivo selectivo MYP (Mannitol-egg yolk polimixina agar). Incubar a 30°C/24-48 horas. Las colonias sospechosas las confirmamos efectuando numerosas resiembras a otras placas y realizamos las distintas pruebas bioquímicas, de ellas destacamos como concluyentes los API 50 CHB. También nos ayudamos de tinciones micros-

cópicas.

#### RESULTADOS Y CONCLUSIÓN:

Tras un laborioso proceso logramos aislar *B. cereus* en un 75'6% de las muestras. Un 32'9% tienen valores  $\leq 10$  ufc/g. Un 23'1% tienen valores  $\leq 100$  ufc/g. Otro 23'1% tienen valores  $\leq 1000$  ufc/g. El 19'5% presenta valores  $\leq 10.000$  ufc/g. Sólo una muestra registra un resultado insatisfactorio  $> 10.000$  ufc/g (límite máximo establecido por la Legislación), con un recuento de 100.000 ufc/g (1'2%). Aunque encontramos una gran presencia de *B. cereus* en especias, los recuentos no son altos y sólo uno sobrepasa el límite máximo. Los bajos recuentos podrían estar relacionados con las sustancias antimicrobianas citadas anteriormente.

### **P086 INVESTIGACIÓN DE UN BROTE DE TOXIINFECCIÓN ALIMENTARIA POR *Shigella flexneri* A PARTIR DE LA VIGILANCIA ACTIVA EN LABORATORIOS CLÍNICOS DE LOS HOSPITALES DE BARCELONA**

Mercè de Simón<sup>1</sup>, Helena Pañella<sup>2</sup>, Rosa Bartolomé<sup>3</sup>, Beatriz Mirelis<sup>4</sup>, Jordi Vila<sup>5</sup>, M Dolors Ferrer<sup>1</sup>

1- Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona

2-Servei d'Epidemiologia de l'Agència de Salut Pública de Barcelona

3-Servei de Microbiologia de l'Hospital Vall Hebron de Barcelona

4-Servei de Microbiologia de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona

5-Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic de Barcelona

Los brotes de toxiinfección alimentaria por *Shigella* spp., generalmente, son debidos al consumo de alimentos contaminados por una falta de higiene en su preparación a través de un portador. A diferencia de los brotes causados por otros patógenos de transmisión alimentaria, la identificación de los brotes de sigelosis proviene, con frecuencia, de la notificación de los laboratorios clínicos y de la investigación epidemiológica.

En este trabajo se describe la investigación de un brote de gastroenteritis por *Shigella flexneri* a través de una vigilancia activa en los laboratorios de Microbiología de cinco Hospitales de la área metropolitana de Barcelona.

En septiembre de 2003, un Hospital notificó al Servei d'Epidemiologia de l'Agència de Salut Pública de Barcelona cinco casos de gastroenteritis por *S. Flexneri*. Aunque las primeras investigaciones no identificaron ningún origen común entre los casos, la coincidencia témporo-espacial de los aislamientos hizo sospechar la posible existencia de un brote, por lo que se solicitó a los laboratorios de Microbiología de los grandes Hospitales del área metropolitana de la ciudad información sobre los aislamientos de *S. Flexneri* entre los meses de septiembre y octubre de 2003.

Se realizó una encuesta epidemiológica a las personas afectadas, estableciéndose como posible origen de los casos un restaurante de la ciudad de Barcelona. Se definió como caso cualquier persona que desde el 31 agosto al 31 septiembre hubiera comido en el restaurante, y que después de 12 h a 6 d presentara diarrea con fiebre, vómitos i/o dolor abdominal. A los siete manipuladores de alimentos del restaurante se les practicó una serie de tres coprocultivos sucesivos.

Como marcador epidemiológico, en las cepas de *S. Flexneri* se determinó la bioesovar mediante el sistema API 20E y aglutinación en portaobjetos con antiseros específicos, el patrón de sensibilidad frente a 23 antimicrobianos mediante el método de disco difusión y el patrón de restricción obtenido con *XbaI* mediante electroforesis en campo pulsado.

Los resultados de la investigación permitieron detectar, del 31 de agosto al 12 de septiembre de 2003, un brote de toxiinfección alimentaria en Barcelona por una clona de *S. Flexneri*, que afectó a un mínimo de 18 personas. Los casos estuvieron expuestos en días diferentes y la transmisión tuvo lugar probablemente por la ingestión de ensaladas contaminadas por la falta de higiene en su preparación de un manipulador encargado de la preparación de los platos de consumo en frío, que resultó portador asintomático del microorganismo.

### **P087 DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN AGUAS MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL vs RT-PCR CONVENCIONAL**

Alejandro Rodrigo Gil<sup>1</sup>, José Luís Monzó Sánchez<sup>1</sup>, Javier Buesa Gómez<sup>2</sup>, David Tomás Fornés<sup>1</sup>

1-Laboratorio de Bioensayos, AINIA, Paterna (Valencia)

2-Dpt. Microbiología, Fac. Medicina y Hospital Clínico Universitario, Universitat de Valencia

Ver resumen O08

## **P088 INCIDENCIA DE ROTAVIRUS EN MOLUSCOS BIVALVOS ANTES Y DESPUES DE LA DEPURACION**

Oscar Martínez Arias<sup>1</sup>, Juan Manuel Cutrín<sup>2</sup>, Carlos Pereira Dopazo<sup>2</sup>, Jesus Angel Santos<sup>1</sup>, Maria Luisa García López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León

<sup>2</sup>-Microbiología e Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela

Los rotavirus son importantes agentes de gastroenteritis en humanos, siendo los pertenecientes al serotipo A los principales responsables de gastroenteritis víricas en niños. Pertenecen a la familia Reoviridae, y su genoma está formado por 11 segmentos de ARN de doble cadena. Los moluscos bivalvos, debido a que se alimentan por filtración, pueden retener y concentrar en su interior estos virus cuando están presentes en el agua que los rodea. De este modo, el consumo de moluscos bivalvos crudos o sometidos a un tratamiento térmico insuficiente representa un riesgo para la salud. La depuración de los moluscos bivalvos reduce los riesgos sanitarios asociados a algunos grupos bacterianos, pero no parece ser tan eficaz en el caso de los virus, como señalan diversos estudios publicados hasta la fecha.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la incidencia de rotavirus en moluscos bivalvos antes y después de su depuración.

Para ello se analizaron un total de 46 muestras procedentes del litoral de la provincia de Pontevedra, representados por las siguientes especies: mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja japónica (*Venerupis semidecussata*) y berberecho (*Cerastoderma edule*). De estas muestras, 23 correspondían a especímenes pertenecientes a lotes de moluscos antes de depurar, y otras 23 a especímenes de los mismos lotes después de su depuración.

En primer lugar se diseccionaron los hepatopáncreas de 6 moluscos por cada muestra. Tras homogeneizar con PBS, pH 7,5, se realizó una extracción de los virus presentes con cloroformo-butanol, seguida de una precipitación en 24% de PEG 6000. Posteriormente se extrajo el ARN presente en el precipitado resultante utilizando TRIzol LS Reagent® (Invitrogen™). El ARN así obtenido fue sometido a RT-PCR para la amplificación de un fragmento del ARN del gen que codifica para la proteína VP6, seguida de una confirmación mediante Southern blot e hibridación con una sonda específica etiquetada con digoxigenina.

Un total de 8 muestras fueron positivas (17,39%). De ellas, 5 correspondieron a moluscos no depurados y 3 a moluscos depurados. En dos lotes de moluscos se detectó la presencia de rotavirus tanto antes como después de la depuración.

Este resultado pone de manifiesto la presencia de rotavirus en moluscos procedentes de las costas gallegas. Además coincide con otros estudios que ponen de manifiesto que la depuración no es un método eficaz para eliminar virus entéricos de los moluscos bivalvos.

## **P089 EFECTO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, GRASA DE LECHE HIDROLIZADA Y EMULSIONANTES DE USO ALIMENTARIO EN LA SUPERVIVENCIA DE BIOFILMS DE *Pseudomonas***

Belén Orgaz Martín, Juliana Kives Ostronoff, Carmen San José Serrán

Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos, UCM, Madrid

Ver resumen 014

## **P090 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS ALTERANTES DE *Zygosaccharomyces bailii* Y *Z. rouxii* AISLADAS DE FRUTAS CONFITADAS**

Patricia Martorell<sup>1</sup>, Malcolm Stratford<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Teresa Fernández-Espinar<sup>1</sup>, Amparo Querol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Burjassot, Valencia

<sup>2</sup>-Food Processing Group, Unilever R&D (Colworth House), Sharnbrook, Bedford

Para la industria alimentaria, uno de los grupos de levaduras alterantes más problemáticos es el género *Zygosaccharomyces*. Las especies *Z. bailii* y *Z. rouxii* se describen como típicas alterantes de frutas, zumos, salsas, miel, jarabes y refrescos, debido a su capacidad de resistencia a conservantes y elevada osmotolerancia.

En el presente estudio, se ha analizado el comportamiento fisiológico de 5 cepas de *Z. bailii* y 3 cepas *Z. rouxii*, aisladas de frutas confitadas, jarabe, refrescos y salsa de soja. Se han incluido además otras especies alterantes: *Pichia guillemondii*, *Candida magnoliae* y *Z. lentus*. En concreto, se han estudiado aspectos relacionados con la capacidad alterante de dichas levaduras, como el rango de temperatura y pH, osmotolerancia y resistencia a conservantes alimentarios. También se ha analizado la capacidad de adaptación de cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* a altas concentraciones de glucosa y NaCl.

Todas las cepas de *Z. bailii* mostraron una elevada resistencia a ácido acético, sórbico y cinámico, así como a peracético y etanol. La fisiología de las 2 cepas de *Z. bailii* aisladas de fruta confitada fue muy similar, y ambas mostraron una extraordinaria producción de gas en medio YPD (glucosa 1M). Además, de manera inusual, las dos cepas crecieron a 37°C. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos con la caracterización molecular (estudio previo), se puede sugerir que ambos aislados son una misma cepa.

Sin embargo, las dos cepas de *Z. rouxii*, A y B, aisladas de la fruta confitada, mostraron grandes diferencias en su fisiología y resistencia a conservantes: se observó diferente morfología colonial, y la cepa A resultó ser especialmente resistente a ácido benzoico y cinámico. Estos datos, junto con los obtenidos en la caracterización molecular, muestran la distinción entre ambas cepas. Todos los aislados de *Z. rouxii* mostraron una extraordinaria osmotolerancia, pudiendo crecer en medio glucosa 5M. Además, todas las cepas analizadas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* desarrollaron capacidad de adaptación a glucosa.

Este estudio confirma las características fisiológicas de *Z. bailii* y *Z. rouxii*, que les hace potencialmente capaces de crecer y producir alteración en alimentos con baja aw, bajo pH y altos niveles de conservantes.

## P091 ESTUDIO DE POBLACIONES MICROBIANAS EN LA MORCILLA DE LEÓN

Enrique Alfonso Cabeza Herrera<sup>1</sup>, Jose María Zumalacárregui Rodríguez<sup>2</sup>, Javier Mateo Oyagüe<sup>2</sup>

1-Departamento de Microbiología de Alimentos, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona

2-Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León

### INTRODUCCIÓN

La Morcilla de León es un producto típico cuya composición fisicoquímica –elevada actividad de agua, relativamente alto pH entre 5 y 7, gran contenido en nutrientes fácilmente asimilables, etc.– favorece el desarrollo microbiano, siendo su vida útil de 10 a 15 días en condiciones de refrigeración. En este trabajo se han estudiado los principales grupos microbianos presentes en la masa y piel de la morcilla de León.

### METODOLOGÍA

Las muestras de morcilla fueron adquiridas en el mercado minorista local y provenían de nueve industrias cárnicas de la ciudad de León y sus alrededores. En promedio, el tiempo transcurrido tras su elaboración fue de  $6 \pm 4$  días. Los análisis microbianos se realizaron en la masa de la morcilla y en la parte exterior de la piel empleando los siguientes métodos: Flora aerobia mesófila viable (FAMV): ISO 4833, Flora aerobia psicrótrofa viable FAPV: ISO 17410, Mohos y Levaduras (ML): ISO 13681, Esporas aerobias (EA): ISO 7932, esporas anaerobias (EAN): ISO 15213, *Enterobacterias* totales (ET): ISO 5552, bacterias acidolácticas (BAL): ISO 15214, *Brochothrix thermosphacta* (Br:th): ISO 13722, *Pseudomonas* totales (Ps.T): ISO 13720, Enterococos fecales (EF): Pascual y col. (2000), Micrococáceas totales (MT): Cordero y col (2000).

### RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la masa muestran un predominio de FAMV, MT y FAPV. Los valores medios obtenidos en términos de log ufc/g de masa fueron 5,1; 5,0 y 4,7 respectivamente. Otros grupos microbianos importantes fueron Br:th (4,3) y BAL (3,6). El resultado de EAN y EF en masa fue muy bajo (1,7 para los dos casos). Por otra parte, los máximos recuentos en piel correspondieron a FAPV, FAMV, Ps.T, MT. Los valores obtenidos para estos grupos superaron las 4 unidades log ufc/100cm<sup>2</sup> (5,2; 4,9; 4,5 y 4,2 respectivamente).

El análisis de correlaciones entre los diferentes grupos microbianos permitió observar una correlación entre FAMV y MT (0,93), pudiéndose atribuir este hecho a la presencia de géneros aerobios estrictos y facultativos con preferencia a un desarrollo aeróbico dentro de las Micrococáceas (*Micrococcus* spp y *Staphylococcus* spp, respectivamente). También se observó una correlación significativa entre FAPV–Ps.T y FAPV–Br:th de 0,8 y entre ET–FAPV de 0,7. Estos resultados se pueden asociar al carácter psicrótrofo de estos grupos tal y como describen diferentes autores (Gram y col, 2002, Labadie y col, 1994 y Mesclé y col, 1994), además de ser parte de la flora dominante de productos cárnicos almacenados en refrigeración (Gram y col, 2002).

## P092 INCORPORACIÓN A BIOFILMS DE *Enterococcus* DE LECHE CRUDA REFRIGERADA

Juliana Kives Ostronoff, Belén Orgaz Martín, Carmen San José Serrán

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos, UCM, Madrid

Los *Enterococcus* tienen como hábitat natural el tracto intestinal de seres humanos y animales y, por ello, su presencia en alimentos puede estar relacionada con la contaminación fecal. Estos microorganismos pueden incorporarse a la flora contaminante de los pezones de las vacas, pudiendo así pasar a la leche durante el ordeño. Aunque algunas cepas del género sean usadas como cultivos iniciadores o como probióticos, su presencia como contaminante en leche cruda puede ocasionar defectos organolépticos debido a la producción de ácido láctico.

El estudio de la formación de biofilms por parte de estos microorganismos se ha centrado sobre todo en el ámbito médico, donde algunas cepas patógenas oportunistas pueden ocasionar severas infecciones. Se ha planteado aquí el estudio de la adhesión de *Enterococcus* de origen lácteo a superficies en contacto con leche.

Hemos estudiado la fijación a biofilms de los *Enterococcus* presentes como contaminantes en leches crudas, y en leches UHT, donde fueron inoculadas individualmente, a dos niveles distintos, tres cepas aisladas de leche cruda refrigerada. Como soporte para la adhesión se emplearon cupones de vidrio semisumergidos. Los cultivos fueron incubados a 7°C durante 72 horas. En los cultivos de leches crudas, solamente cuando su concentración inicial fue superior a 10<sup>4</sup> ufc/mL, los *Enterococcus* fueron capaces en 72 horas de formar biofilms, alcanzando niveles de población adherida por cm<sup>2</sup> similares a los presentes por mL en la población planctónica. En los cultivos con inóculos de cepas de origen lácteo en leche UHT, todos los *Enterococcus* ensayados fueron capaces de formar biofilms en 72 horas, incluso cuando partían de inóculos de 10<sup>3</sup> ufc/mL, llegando a alcanzar niveles de población adherida de hasta 10<sup>6</sup> ufc/cm<sup>2</sup>. Los *Enterococcus* estudiados individualmente en leche UHT mostraron mayor velocidad de crecimiento a 7°C que el conjunto este género presente en leches crudas.

Los *Enterococcus* presentes como contaminantes en leches crudas, son pues capaces de crecer y formar biofilms a temperaturas de refrigeración, de forma individual o combinados con otras bacterias. Estos biofilms, si no son eliminados debidamente durante la limpieza de los equipos, pueden actuar como fuentes permanentes de contaminación de leche y de productos lácteos.

## **P093 CAPACIDAD ALTERANTE DE *Psychrobacter* spp. EN CARNE DE CONEJO FRESCA E IRRADIADA**

Jose M<sup>a</sup> Rodríguez-Calleja<sup>1</sup>, Margaret F. Patterson<sup>2</sup>, Isabel García-López<sup>1</sup>, María Luisa García-López<sup>1</sup>, Andrés Otero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León

<sup>2</sup>-Food Microbiology, Department of Agriculture & Rural Development, Queen's University, Belfast, United Kingdom

Los miembros del género *Psychrobacter* se aislan con relativa frecuencia de carne fresca almacenada a refrigeración en presencia de aire, constituyendo también la flora residual más importante de este producto y de otros alimentos proteicos cuando se aplican tratamientos de irradiación. Por ambas razones se viene considerando que se trata de una bacteria alterante de la carne no irradiada e irradiada. Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios en los que se investigue su comportamiento en ambas condiciones. Cuando cultivos puros de dos cepas radio-resistentes ( $D_{10} = 2,0$  kGy) de *Psychrobacter* se inocularon en carne de conejo estéril se observó que eran capaces de multiplicarse activamente, incrementando su número hasta 3 unidades logarítmicas por gramo durante 12 d de almacenamiento a 4 °C. Si la inoculación se hacía conjuntamente con dos cepas pertenecientes a especies alterantes (*Pseudomonas fluorescens* y *Brochothrix thermosphacta*), la velocidad de crecimiento y el número máximo de células alcanzados eran significativamente ( $p < 0,01$ ) menores. Tanto *P. fluorescens* como *B. thermosphacta* crecieron más rápido y alcanzaron poblaciones mayores aunque, al final del período de almacenamiento, la cepa de la última especie decreció de forma que no pudo ser detectada entre la población final como tampoco lo fue *Psychrobacter*. Al irradiar (2,5 kGy) carne estéril inoculada con cultivos puros de ambas cepas de *Psychrobacter*, se apreció una inactivación inicial que continuó durante 5-7 d, reanudándose después la multiplicación con incrementos máximos inferiores a 2 unidades logarítmicas por gramo. Cuando se irradió carne estéril inoculada con los cultivos mixtos, una de las cepas de *Psychrobacter* se comportó de forma similar a lo observado en cultivo puro pero la otra precisó 12 días para recuperarse del daño subletal. Aunque la tasa de crecimiento no es el único factor que determina el éxito del desarrollo de una bacteria alterante, nuestros resultados sugieren que *Psychrobacter* es incapaz de formar parte de forma significativa de la flora de la carne fresca, especialmente si *Psychrobacter* está presente, y que tampoco es probable que pueda desempeñar un papel relevante en la alteración de la carne irradiada.

Este trabajo se ha financiado con el proyecto CICYT AGL2000-1159.

## **P094 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE PESCADOS CONGELADOS PRODUCIDOS EN EL ESTADO SUCRE, VENEZUELA**

Sara Centeno, Rossianny Rodríguez

Laboratorio de Microbiología, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela

### **RESUMEN**

En el presente estudio se evaluó la frecuencia de bacterias y hongos, en muestras de ruedas de pescados congelados producidas en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Para ello, se recolectaron 60 muestras, 30 correspondieron a ruedas del pescado llamado sierra y 30 a ruedas de merluza, en tres establecimientos comerciales. Se determinaron las unidades formadoras de colonia por gramo (ufc/g) de bacterias y hongos presentes, mediante el método de las diluciones decimales seriadas. Posteriormente, las diferentes especies microbianas fueron aisladas e identificadas por medio de pruebas microbiológicas tradicionales. Específicamente, se investigaron bacterias aerobias mesófilas, bacterias aerobias psicrótróficas, hongos filamentosos y levaduras. Se obtuvo un recuento significativamente mayor de bacterias aerobias mesófilas en las muestras de merluza ( $1,6 \times 10^6$  UFC/g) con respecto a las muestras de sierra ( $5,2 \times 10^5$  UFC/g). El recuento de las bacterias psicrótróficas resultó significativamente más bajo en las muestras de merluza ( $5,3 \times 10^3$  UFC/g) en comparación con las muestras de sierra ( $1,0 \times 10^4$  UFC/g). Las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia fueron *Micrococcus luteus* y *Micrococcus nishiyaeensis*; sin embargo, debe destacarse la elevada frecuencia de especies relacionadas con el deterioro del pescado como *Pseudomonas* spp y *Shewanella putrefaciens*. Los recuentos fúngicos resultaron de  $1,9 \times 10^2$  UFC/g en las muestras de sierra y de  $2 \times 10^2$  UFC/g en las muestras de merluza. El hongo filamentosos más frecuente fue *Geotrichum candidum* y la levadura que se aisló con mayor frecuencia fue *Rhodotorula* spp.

## **P095 CONTRIBUCIÓN AL DETERIORO DE EMBUTIDOS DE LA LEVADURA *Debaryomyces hansenii* MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE GAS**

Manuel Quirós, María José Valderrama, José M. Peinado, María Isabel de Silóniz

Departamento de Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid

*Debaryomyces hansenii* es una levadura aislada frecuentemente en embutidos crudos curados, en los que su presencia se ha relacionado con la mejora de las características organolépticas (1). Por ello, últimamente se ha contemplado la posibilidad de su adición a los cultivos iniciadores tradicionales (2,3). Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos estudiado un proceso de deterioro de embutidos debido a la contaminación por levaduras. Dicho deterioro consiste en la aparición de gas en el interior de los productos durante la etapa de maduración. En estos embutidos, se aislaron, entre otras levaduras, varias cepas de *D. hansenii* y posteriormente, se comprobó mediante una prueba rápida diseñada al efecto, su capacidad de producción de gas en las condiciones del ensayo (3). Por ese motivo y con el objetivo de confirmar estos resultados previos, en este trabajo se

estudian diferentes parámetros cinéticos de crecimiento y se cuantifica la producción de gas en presencia de diferentes agentes de curado y varias temperaturas en una cepa de *D. hansenii* aislada de embutido deteriorado.

Aunque no en el grado de una levadura típicamente fermentativa como *Sacharomyces cerevisiae*, en todos los casos se ha podido confirmar la producción de gas. Éste presenta un origen exclusivamente fermentativo en presencia de sal o nitrato. Asimismo, como cabía esperar, la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ , h<sup>-1</sup>) disminuye al disminuir la temperatura pero, por el contrario, la tasa de producción de gas ( $q_{CO_2}$ , mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) aumenta al disminuir la temperatura y este efecto es independiente del azúcar utilizado. El Nitrato sódico estimula ligeramente el crecimiento pero no así la producción de gas. Por otro lado, las concentraciones inferiores de NaCl estudiadas estimulan ligeramente el crecimiento y la tasa de producción de gas.

(1) Encinas, J. P. et al. 2000. Yeasts populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54:203-208.

(2) Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 54: 131-149.

(3) Santos-Mendoça, R.G. 2000. Aislamiento, selección y caracterización de levaduras de embutidos con vistas a su utilización como coadyuvante en el proceso de curado. Tesis Doctoral. Valencia.

(4) Wrent et al. 2003. Alteración de embutidos por levaduras productoras de gas. XIX Congreso Nacional de Microbiología

## **P096 SELECCIÓN DE *Penicillium spp.* PRODUCTORES DE PEPTIDOS ANTIFÚNGICOS DE INTERÉS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS Y OBTENCIÓN DE FRACCIONES ACTIVAS**

Raquel Acosta<sup>1</sup>, Laureano Frizzo<sup>2</sup>, Elena Bermúdez<sup>1</sup>, Félix Núñez<sup>1</sup>, Miguel Angel Asensio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Higiene de los Alimentos, Universidad de Extremadura, Cáceres

<sup>2</sup>-Universidad Nacional del Litoral, Argentina

Ver resúmen O15

## **P097 CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Lactobacillus plantarum* TF711 AISLADO DEL QUESO ARTESANAL DE TENERIFE**

Victoria Zárate, David Hernández, Evaristo Cardell

Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife

### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas extracelulares de origen microbiano que poseen propiedades antimicrobianas y tienen interesantes aplicaciones en la industria alimentaria como bioconservantes (inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos y/o alterantes) y como aceleradoras de la maduración de alimentos fermentados (lisando a los microorganismos que forman parte del cultivo iniciador).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la bacteriocina producida por *Lb. plantarum* TF711 aislado a partir del queso artesanal de Tenerife, para determinar su posible utilidad como bioconservante y aceleradora de la maduración de quesos.

### **MÉTODOS**

El espectro de actividad se determinó mediante el test de difusión en agar frente a diversas cepas indicadoras. Para la determinación de la estabilidad frente al pH y la temperatura así como la sensibilidad frente a distintos tratamientos (surfactantes, enzimas y disolventes orgánicos) se evaluó, tras los tratamientos, la actividad antimicrobiana residual.

El modo de acción se determinó añadiendo 5120 UA de la bacteriocina a un cultivo de cepa indicadora tras lo cual se monitorizó la densidad óptica y el número de viables.

El peso molecular se determinó mediante electroforesis en sistema Tricina-SDS-PAGE y posterior revelado del gel para proteínas y para actividad antimicrobiana.

### **RESULTADOS**

La bacteriocina producida por *Lb. plantarum* TF711 mostró un amplio espectro de actividad inhibiendo a lactobacilos, lactococos, *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes* y *Staphylococcus aureus*, y a las enterobacterias *Shigella sonnei* y *Klebsiella pneumoniae*. La bacteriocina fue estable a pHs comprendidos entre 1 y 8, a la congelación, a la refrigeración y a distintos tratamientos térmicos. Además, fue en general insensible a los surfactantes y disolventes orgánicos ensayados. Las enzimas proteolíticas inactivaron a la bacteriocina. Además, la  $\alpha$ -amilasa y la lipasa inactivaron total y parcialmente, respectivamente a la bacteriocina.

El modo de acción resultó ser bacteriostático en las condiciones ensayadas y el peso molecular determinado mediante electroforesis fue de aproximadamente 2,5 kDa, confirmándose la naturaleza peptídica de nuestra bacteriocina.

### **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos durante la caracterización de la bacteriocina de *Lb. plantarum* TF 711 (amplio espectro de actividad, estabilidad en un amplio rango de pH y temperaturas y su resistencia frente a distintos tratamientos), la convierten en una interesante candidata a ser utilizada como bioconservante y/o aceleradora de la maduración en la industria alimentaria.

## P098 BIOCONSERVACIÓN DE SANGRE DE MATADERO CON BACTERIAS LÁCTICAS

Eduard Dàvila Ribot, Nuri Fort Fort, Ester Puig Devesa, Dolors Parés Oliva  
Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona

La sangre porcina que se obtiene en los mataderos industriales es un recurso potencial para la industria alimentaria, pero no se aprovecha principalmente por la elevada contaminación microbiológica que contiene. Proponemos la bioconservación con bacterias ácido-lácticas (LAB) como un método para mejorar la calidad general de la sangre, y obtener a partir de la misma productos para el consumo humano garantizados sanitariamente. En el presente trabajo se estudió el efecto de la inoculación de 12 cepas de LAB sobre las características microbiológicas y físico-químicas de sangre mantenida a 15°C durante 72 horas. Se comprobó un efecto protector de las cepas LAB frente a la microbiota autóctona de la sangre. En primer lugar, el principal indicador del estado de integridad de la sangre, el grado de hemólisis, reveló que la sangre sufría una severa degradación al tercer día de almacenamiento, pero no en el caso de las muestras inoculadas. La acción proteolítica fue más intensa en la sangre control que en la inoculada, pues en ausencia de LAB la concentración de amoníaco era superior y aparecían bandas de proteínas de bajo peso molecular en los perfiles electroforéticos. Los parámetros de textura determinados en geles de plasma sanguíneo termogelificado mostraron cambios importantes en cuanto a la dureza de las muestras control, no así en el plasma de la sangre con LAB. Por otro lado, los recuentos microbiológicos efectuados demostraron cierto poder antagonista de algunas cepas frente a enterobacterias y *Pseudomonas*, las especies a controlar en este sustrato por su potencial patógeno y deteriorante, lo que sugiere que la presencia de LAB puede ser una buena alternativa para mejorar la calidad de la sangre durante su almacenamiento y reducir así la exigencia de su procesado inmediato. Las cepas que se han mostrado más eficaces han sido seleccionadas para ensayos futuros con el objetivo de desarrollar la formulación y el sistema de inoculación más adecuados para una posible aplicación industrial.

## P099 BIOCONTROL OF *Listeria monocytogenes* 4032 IN A HARD TYPE NON-FAT CHEESE BY ENTEROCOCCAL STRAINS PRODUCING ENTEROCIN AS-48

Eva Valdivia<sup>1</sup>, Arantxa Muñoz<sup>1</sup>, Manuel Martínez-Bueno<sup>1</sup>, Ana Rodríguez<sup>2</sup>, Mercedes Maqueda<sup>1</sup>, Antonio Gálvez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Microbiología, Universidad de Granada

<sup>2</sup>-Instituto de Productos Lácteos de Asturias. IPLA-CSIC, Villaviciosa, Asturias

<sup>3</sup>-Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén

In this study we describe the control of strain *Listeria monocytogenes* CECT 4032, a pathogenic food borne bacterium, in milk and in a non-fat hard-type cow's cheese by the enterocin AS-48 producer strains *Enterococcus faecalis* A-48-32 and *Enterococcus faecium* 32-81.

Cocultivation experiments in milk were carried out co-inoculating *L. monocytogenes* (about 4.8 log CFU/ml) and enterococcal strains A-48-32 (5.27 log CFU/ml) or 32-81 (4.92 log CFU/ml). Cheese experiments were performed inoculating milk with commercial starter cultures (8.2 log CFU/ml) and *L. monocytogenes* (5.3 log CFU/ml) (control cheeses) and also with the bacteriocinogenic strains A-48-32 (6.48 log CFU/ml) or 32-81 (6.2 log CFU/ml) (test cheeses). For viable count of different bacteria the appropriate selective and/or differential media were used. AS-48 production in milk and cheese was determined by acid extraction in 0.02 N HCl.

In milk co-inoculated with any of AS-48 producing strains and *L. monocytogenes* a reductions of 4 log units in the counts of *L. monocytogenes* cells were detected after 72 h incubation. In control cheeses inoculated only with starter and *L. monocytogenes*, the latest reached 7.08 log CFU/g and 6.6 log CFU/g after 15 and 30 days of ripening, respectively. However, in cheeses manufactured with the starter along with a mixture of *E. faecalis* A-48-32/*L. monocytogenes*, counts of *L. monocytogenes* decreased by ca. 1.58, 3.9 and 4.4 log CFU/g with respect to control cheeses after 7, 15 and 30 days of ripening, respectively. In cheeses inoculated with *E. faecium* 32-81, counts of listeria decreased by ca. 0.96, 3.33 and 3.62 log units with respect to controls after 7, 15 and 30 days. Growth of *E. faecalis* A-48-32 and *E. faecium* 32-81 was associated to AS-48 production and persistence in cheese. Interestingly, growth of starter cultures was not affected by the presence of Bac<sup>+</sup> strains.

These results clearly indicate that both enterococcal strains produced satisfactory amounts of bacteriocin in cheese, and support the potential use of AS-48-producing strains as culture adjuncts to inhibit *L. monocytogenes* during cheese manufacture and ripening.

## **PI00 INHIBITION OF TOXICOGENIC *Bacillus cereus* IN RICE-BASED FOODS BY ENTEROCIN AS-48**

Antonio Gálvez<sup>1</sup>, María J. Grande Burgos<sup>1</sup>, Hikmate Abriouel<sup>1</sup>, Nabil Ben Omar<sup>1</sup>, Eva Valdivia Martínez<sup>2</sup>, Magdalena Martínez Cañamero<sup>1</sup>, Manuel Martínez Bueno<sup>2</sup>, Mercedes Maqueda Abreu<sup>2</sup>, Rosario Lucas López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Dpto. de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén

<sup>2</sup>-Dpto. de Microbiología, Universidad de Granada

*Bacillus cereus* is a food-poisoning bacterium frequently found in foods. Vegetable-based foods and milk are often contaminated with endospores of this bacterium, which may survive preservation hurdles applied in the food industry. The increased incidence of psychrotrophic strains poses an additional risk for prevalence and propagation of *B. cereus* in foods.

In this study we have investigated the effect of the broad-spectrum bacteriocin AS-48 against the toxicogenic psychrotrophic strain *B. cereus* LWLI in a model food system consisting of boiled rice and in a commercial infant rice-based gruel dissolved in whole milk.

Vegetative cells of *B. cereus* LWLI were able to multiply in boiled rice as well as in rice-based gruel. High cell densities exceeding 10<sup>8</sup> CFU/gram were easily achieved at incubation temperatures of 30°C and 15°C or even at 6°C. Propagation of *B. cereus* LWLI in both types of food was associated with enterotoxin production. Upon addition of a bacteriocin AS-48 concentrate, viable cell counts decreased rapidly over incubation time, depending on the bacteriocin concentration, the temperature of incubation and the food sample. In all bacteriocin-treated food samples, counts of *B. cereus* LWLI were below the detection limits at the end of a 14-days incubation period. Similarly, enterotoxin production was also inhibited by bacteriocin addition. Furthermore, heat sensitivity of endospores increased significantly in the presence of AS-48. Complete inactivation of endospores was achieved by heating for one min at 90°C in boiled rice or at 95°C in rice-based gruel, while such treatments only caused small decreases in viability of endospores when applied in the absence of bacteriocin.

These results strongly suggest that enterocin AS-48 may be a useful biopreservative to control *B. cereus* in rice-based foods.

This work was supported by research project AGL2001-3315-CO2-02.

## **PI01 MONITORIZACIÓN TURBIDIMETRICA DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE *Listeria monocytogenes* A 22DEGREES EN MEDIO ÁCIDO BAJO STRESS OSMÓTICO**

Agatangelo Joaquim Eduardo, Emiliano Jose Quinto, Mohammed Bachrouri, Maria Teresa Mora

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Universidad Autonoma de Barcelona

Las recientes implicaciones de alimentos en brotes de listeriosis humanas crea la necesidad de conocer características y del comportamiento de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. Determinadas técnicas de tratamiento de alimentos, como la fermentación y el "pickling", permiten prevenir el crecimiento microbiano y garantizar la seguridad alimentaria (Presser et al., 1997). El objetivo de este trabajo es realizar la derivación de los parámetros cinéticos del cultivo microbiano a partir de los datos turbidimétricos de densidad óptica (DO).

A partir de diluciones decimales de *Listeria monocytogenes* en BHI ajustado a pH de 4,5 y con 2,5, 3,5, 4,5 y 5,5% de NaCl, se dispensaron alícuotas (200 microlitros) de la dilución -3 (aprox. 1.000.000-10.000.000 ufc/ml) en la placa microtiter. Las lecturas se realizaron cada 900 segundos durante 24 h, con agitación previa (5 segundos), a 595 nanómetros, y a 22 Degrees. La DO fue transformada en log10. Las curvas de crecimiento se ajustaron utilizando la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990) con el programa Excel. De acuerdo con la Ley de Beer-Lambert (Koch 1981; Dalgaard et al., 1994), los parámetros cinéticos (tiempo de detección, tasa de crecimiento exponencial y tiempo de generación) se calcularon según el procedimiento de Zhao et al. (2000).

Las curvas sigmoideas de la DO demostraron que la inhibición del crecimiento fue proporcional a la concentración de NaCl. El progresivo efecto bacteriostático se confirmó por la simultánea disminución de la tasa exponencial de crecimiento (MGR), el aumento de los tiempos de generación (TG) y de detección, y por la ausencia de crecimiento en la máxima concentración de sal. Esto confirma que es adecuado el uso de las curvas sigmoideas de DO para derivar directamente de ellas los parámetros cinéticos de un cultivo bacteriano.

KOCH, A. L. (1981). Growth Measurement. In: P. Gerhardt, R. G. E.; Murray, R.N. Costilow et. al. (Editors), Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. DC.

PRESSER, K. A., RATKOWSKY, D. A., ROSS, T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. Applied and Environmental Microbiology Vol.63, N°6; Pages 2355-2360.

ZHAO, L., TJ., MONTEVILLE, AND SCHAFFNER, D.W. (2000). Inoculum size of *Clostridium botulinum* 56A spores influences time-to-detection and percent growth-positive samples. Journal of Food Science, 65 (8):1369-1375.

ZWIETERING, M. H., JONGENBURGUER, I., ROUMBOUTS, F. M. AND VAN'T RIET, K. (1990). Modelling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental

## PI02 RELACION ENTRE EL TAMAÑO DEL INOCULO Y LA FASE DE LATENCIA DE *Enterobacter aerogenes*

Raquel Velasco de Diego<sup>1</sup>, Carmen Pin Arias<sup>2</sup>, Gonzalo García de Fernando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid

<sup>2</sup>-Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido

La fase de latencia microbiana depende no sólo de factores extrínsecos (condiciones ambientales), sino también de factores intrínsecos al microorganismo, como son el estado fisiológico y otros, como el tamaño del inóculo. No obstante, su influencia no está claramente definida y, además, podrían existir otros condicionantes de la fase de latencia, desconocidos hasta el momento. Todo esto ayuda a entender por qué han fracasado los intentos de la Microbiología Predictiva en modelar este parámetro. El fin de este trabajo es comprobar si la concentración del inóculo influye en la duración de la fase de latencia. El método elegido para ello consistió en la monitorización del crecimiento de *Enterobacter aerogenes* CECT 684 en un equipo Bioscreen C, capaz de medir la turbidez de 200 pocillos simultáneamente. En las placas especialmente diseñadas para este equipo se sembraron distintas concentraciones del microorganismo en TSB con 3% de NaCl añadido y se incubaron a 20°C. Los datos obtenidos se expresaron como "tiempos de detección" (tdet), que representan el tiempo necesario para alcanzar un cierto nivel de turbidez. El tiempo de detección se relaciona con la fase de latencia (lag) mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = (\ln X_{det} - \ln X_0) / (tdet - lag)$$

donde  $X_0$  es el tamaño del inóculo,  $\mu$  la tasa específica de crecimiento y  $X_{det}$  la carga microbiana en el pocillo en el tiempo de detección. Esta concentración se determinó con la ayuda de una recta patrón que relacionaba la turbidez y la concentración celular. Todas las experiencias se hicieron por triplicado.

Se observó con claridad como se prolongaba la fase de latencia conforme disminuía la concentración del inóculo. Así, cuando en un pocillo había menos de 100 células, la fase de latencia media observada fue de unas 18 horas, mientras que en los pocillos con cargas por encima del millón de bacterias, se redujo hasta unas 5 horas. Puede concluirse que es necesario considerar el tamaño del inóculo cuando se pretende modelar el crecimiento de un microorganismo, ya que a distintos inóculos le corresponderán fases de latencia diferentes.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL-2000-0692 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## PI03 RELACION ENTRE EL TAMAÑO DEL INOCULO Y LA FASE DE LATENCIA DE *Listeria monocytogenes*

Gonzalo García de Fernando<sup>1</sup>, Carmen Pin Arias<sup>2</sup>, Raquel Velasco de Diego<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid

<sup>2</sup>-Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido

La experiencia indica que la fase de latencia microbiana presenta una considerable variabilidad como consecuencia de la diversidad de factores que en ella influyen. Unos son bien conocidos (temperatura, pH del medio), pero otros no lo son tanto o se desconoce si realmente influyen, como la concentración del inóculo y, quizás, existan más factores aún por descubrir.

El objetivo de este trabajo es determinar si la concentración del inóculo influye en la duración de la fase de latencia. Para ello se sembraron distintas concentraciones de *Listeria monocytogenes* Scott A en TSB enriquecido en NaCl hasta una  $a_w$  de 0,974 y se incubaron a 20°C en el lector de densidad óptica Bioscreen C, que proporciona datos de "tiempo de detección" (tdet), definido como el tiempo necesario para alcanzar un cierto nivel de turbidez. El tiempo de detección se relaciona con la fase de latencia mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = (\ln X_{det} - \ln X_0) / (tdet - lag)$$

donde  $\mu$  es la tasa específica de crecimiento,  $X_0$  y  $X_{det}$  son las concentraciones celulares inicial y en el tiempo de detección, respectivamente, y lag es la fase de latencia. Todas las experiencias se hicieron por triplicado.

Como era de esperar, se apreció una relación lineal entre el tiempo de detección y la concentración del inóculo. Obviamente, cuánto mayor era el inóculo, antes se alcanzaba una determinada tasa microbiana. Además, al representar las fases de latencia frente al logaritmo neperiano de sus respectivos inóculos se observó una relación lineal entre ambos parámetros y se comprobó que los que contenían un menor número de bacterias tardaban más tiempo en iniciar la multiplicación. Cuando el inóculo se cifraba en menos de 10 bacterias por pocillo, la media de las fases de latencia fue de casi 13 horas, mientras que, en el caso de inóculos entre 1 y 6 millones de microorganismos por pocillo, resultó ser inferior a 3 horas. En conclusión, parece que existe algún tipo de "colaboración" entre las células que les permite iniciar antes el crecimiento cuando su concentración es más elevada.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL-2000-0692 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## PI04 EFECTO DE LA TEMPERATURA, NaCl Y PH EN EL CRECIMIENTO DE LA LEVADURA

### *Pichia anomala*

F.N. Arroyo López, M.C. Durán Quintana, A. Garrido Fernández  
Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla

Los modelos matemáticos han demostrado ser una eficiente herramienta para medir el efecto que los factores ambientales pueden tener sobre el crecimiento microbiano. En el campo de la microbiología predictiva son pocos los estudios que se han desarrollado para levaduras si estos se comparan con los que existen para bacterias, siendo aun más escasos en el ámbito de las aceitunas de mesa.

Se ha estudiado la tolerancia a la Sal (NaCl), Temperatura y pH (HCl) en *Pichia anomala*, una especie de levadura asociada con las fermentaciones de aceitunas de mesa. Para tal finalidad se ha usado como medio de cultivo YMGP líquido y empleado un diseño compuesto central con tres repeticiones en el centro para medir el puro error. Las ecuaciones de Gompertz reparametrizada, Richards-Stannard, Logística y Baranyi-Roberts fueron utilizadas para determinar la velocidad de crecimiento específica ( $U_m$ ) y la duración de la fase de latencia a partir de las curvas de crecimiento (modelo primario). Todos los modelos dan un buen ajuste ( $p < 0.05$ ), pero del análisis gráfico y estadístico de los datos se deduce que las ecuaciones de Gompertz reparametrizada y Richards-Stannard son las más apropiadas. Los parámetros biológicos de crecimiento obtenidos de las distintas ecuaciones fueron ajustados a una superficie de respuesta (RS), modelo secundario. Se observa un descenso significativo de la velocidad de crecimiento ( $U_m$ ) cuando la concentración de sal aumenta y la temperatura disminuye. Así mismo existe un incremento significativo de la duración de la fase de latencia cuando la temperatura y el pH disminuyen y la concentración de sal aumenta. Los efectos de las interacciones fueron complejos y dependientes del modelo empleado. La validación matemática de los parámetros  $U_m$  y Latencia (coeficientes A y B, Baranyi 1999) muestra errores aceptables en valores obtenidos de experimentos independientes. La reproducción de las curvas de crecimiento usando los parámetros  $U_m$  y Latencia obtenidos de la RS de los modelos de Gompertz reparametrizada y Richards-Stannard fueron mejor que en el caso de las ecuaciones Logística y Baranyi-Roberts.

Los resultados de este estudio pueden ser aplicados en las fermentaciones de aceitunas de mesa así como en su almacenaje. Así mismo puede ayudar en la posible comercialización de este producto como refrigerado dada la disminución del  $U_m$  y el aumento de la fase de Latencia a bajas temperaturas

## PI05 INFLUENCIA DE DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA FASE DE LATENCIA DE *Listeria innocua* EN PATÉ

Matilde D'Arrigo Huapaya<sup>1</sup>, Raquel Velasco de Diego<sup>1</sup>, Carmen Pin Arias<sup>2</sup>, Gonzalo García de Fernando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid

<sup>2</sup>-Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido

Los alimentos mínimamente procesados tienen cada vez una mayor demanda. Existe un cierto riesgo de que los patógenos más termorresistentes puedan permanecer viables en estos productos y, en condiciones adecuadas, desarrollarse, y, por tanto, alcanzar una dosis infectiva en un tiempo que dependerá, entre otros factores, de su fase de latencia y del número de supervivientes. Forzosamente, este último parámetro será una cifra exigua, frecuentemente una única célula, porque el número de contaminantes no suele ser elevado y, además, el producto se ha pasteurizado, aunque "suavemente". Por tanto, es imprescindible trabajar con muestras contaminadas con una célula para emular situaciones reales.

La pregunta que tratamos de responder en este trabajo es cómo influyen diferentes tratamientos térmicos en la fase de latencia de *Listeria innocua*, microorganismo que sirve de modelo a su congénere, *L. monocytogenes*.

Se hicieron 4 lotes de paté. Uno de ellos, el control, se inoculó con una solución de *L. innocua* capaz de rendir una célula por 13 g de alimento. El resto se inoculó con una solución 1000 veces más concentrada y se trataron térmicamente a 55, 62 y 65°C durante 25 minutos, 81 y 20 segundos, respectivamente (mismo efecto microbicida). Seguidamente se distribuyeron 13 g de paté en bolsitas de plástico estériles y se incubaron a 10°C. Cada lote contenía 150 bolsitas. Cuando se detectó crecimiento, se procedió al recuento de las listerias desarrolladas y con estos datos se obtuvo una distribución del número de bacterias en un tiempo determinado. Asumiendo que la tasa específica máxima de crecimiento ( $\mu$ ) es igual para todas las bacterias, puede calcularse la fase de latencia de todas ellas y se obtiene, finalmente, la distribución de las fases de latencia (idéntica a la de los recuentos en fase exponencial).

Las distribuciones de las fases de latencia del lote control y los tratados a 62 y 65°C fueron muy similares y se ajustaron a una distribución gamma, mientras que la obtenida a 55°C presentó una desviación estándar menor; aunque también se ajustaba a una distribución gamma. Esta diferencia se debió a que el inóculo en este lote fue considerablemente superior a 1 y, por tanto, la fase de latencia era de una población, no de una única célula y aquella siempre presenta una variabilidad menor.

### AGRADECIMIENTOS

Trabajo subvencionado por la Comisión Europea en su proyecto BACANOVA (QRLT-2000-01145). A Yolanda García Mesa por su enconado esfuerzo y trabajo y su beca FINNOVA

## PI06 ANÁLISIS MOLECULAR POR PCR-DGGE DEL CONTENIDO FECAL DE INDIVIDUOS SANOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON YOGURES TRADICIONALES Y YOGURES TRADICIONALES PASTEURIZADOS

Raimundo García-Albiach<sup>1</sup>, Rosa Del Campo<sup>2</sup>, Daniel Bravo<sup>2</sup>, Alejandra Montesi-Libois<sup>1</sup>, María José Pozuelo de Felipe<sup>1</sup>, Fernando Baquero<sup>2</sup>,

1-Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU, Madrid

2-Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

Ver resúmen ○10

## PI07 IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS DE LACTOBACILOS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS AISLADAS DE KEFIR

Inés Arana, María Ortigosa, Francisco Clemente Ibáñez, Aurora Irigoyen, Paloma Torre

Universidad Pública de Navarra

En los últimos años se están desarrollando numerosos estudios sobre el efecto saludable de las leches fermentadas. Los derivados lácteos obtenidos por fermentación, entre ellos el kéfir, podrían tener efectos beneficiosos en la salud humana cuando se ingieren con cierta asiduidad.

El kéfir se trata de una bebida ácida, ligeramente alcohólica, efervescente que se produce tras la adición a la leche de nódulos de kéfir. Estos están formados por una matriz laminar compuesta en su mayor parte de un polisacárido extracelular denominado kefirán, sobre el cual se fijan asociaciones de bacterias lácticas y levaduras que producen una fermentación láctica y alcohólica respectivamente. Entre los géneros de microorganismos más estudiados como probióticos están los lactobacilos, los cuales predominan en el kéfir.

El kéfir fue elaborado con leche de vaca entera y esterilizada en la cual se introdujeron gránulos en un porcentaje del 1% (p/p). Las muestras fueron almacenadas a 5° C. Se aislaron 20 cepas de lactobacilos a las 24 horas de fermentación y en diferentes tiempos de conservación: 2, 7, 14, 21 y 28 días con el fin de encontrar cepas potencialmente probióticas.

Los recuentos de lactobacilos fueron del orden de 10<sup>8</sup> ufc/mL en el kefir recién elaborado. Durante los primeros 15 días de conservación los niveles disminuyeron aproximadamente 2 unidades logarítmicas, estabilizándose a partir de entonces en torno a 10<sup>6</sup> ufc/mL.

Se identificaron mediante la técnica de REP-PCR cinco especies de lactobacilos: *Lb. kefiri*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. gasseri* y *Lb. fermentum*. De *Lb. gasseri* se identificaron tres cepas con diferente perfil genético y de *Lb. plantarum* fueron dos las cepas con distinto perfil. Estas dos especies potencialmente probióticas se identificaron a lo largo de todo el periodo de conservación estudiado. Sin embargo debido a que el kefir por un lado presenta a los dos días de conservación un alto porcentaje de *Lb. gasseri* y por otro también presenta las mejores características sensoriales, se recomienda su consumo en los dos días siguientes a su elaboración.

## PI08 PROBIOTIC CHARACTERISTICS OF LACTOBACILLI AND BIFIDOBACTERIA STRAINS ISOLATED FROM THE HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT

Baltasar Mayo<sup>1</sup>, Susana Delgado<sup>1,2</sup>, Eilis O'Sullivan<sup>2</sup>, Gerald Fitzgerald<sup>2</sup>

1-Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), Villaviciosa

2-Department of Microbiology, National Food Biotechnology Center, University College Cork, Cork, Ireland

### INTRODUCTION

Based on a long history of safe consumption in fermented products and their natural presence in the human gastrointestinal tract, lactobacilli and bifidobacteria species enjoy a Generally Regarded As Safe (GRAS) status and are the bacteria most utilized as probiotics.

Probiotics have been defined as non-pathogenic microorganisms that, when ingested in adequate amounts, exert a positive influence on the health of the host. The selection criteria for probiotic strains for humans should include a human origin (as some health-promoting effects may be species-dependent), presence of several positive characteristics (resistance to gastric acidity and bile toxicity, colonization of the gastrointestinal tract, inhibition of pathogenic microorganisms, immunoestimulatory effects, good technological properties, etc.) and absence of undesirable traits (such as factors relating to virulence determinants, transmissible antibiotic resistances, etc.).

### OBJECTIVES AND METHODOLOGY

180 bifidobacteria and 61 lactobacilli strains of human gastrointestinal origin (from faeces and mucouse) were subjected to several "in vitro" analyses in order to assess their probiotic potential. All strains were analysed for bile acid resistance and growth at low pH. In selected representative strains, the production of antimicrobial substances, the resistance patterns to several antibiotics, the adherence to human epithelial cell lines, the inhibition of intestinal pathogens and the presence of harmful enzymatic activities were also examined.

## RESULTS

Approximately 40% of the strains were able to grow in 2% bovine bile acid (Oxgall, Sigma). Of these, approximately 25% grew at pH 3.5 in MRS medium acidified with HCl. The production of antimicrobial compounds was found to be a rare property among the intestinal isolates, and only 3-4 bifidobacteria strains inhibited any of the indicators. Most of the observed antibiotic resistance was found to be intrinsic and the level was genus or species dependent. However, particular strains harboured atypical resistances to tetracycline, erythromycin, and/or clindamycin. The ability to adhere to human epithelial cells was shown to be variable and strain dependent. Some of the selected strains inhibited "in vitro" the growth of pathogens. Undesirable enzymatic activities, such as  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -chymotrypsin or N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase, were not detected.

## PI09 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE *Lactobacillus delbrueckii* SUBSP. *lactis* UO 004, UNA BACTERIA PROBIÓTICA

Covadonga Barbés, Soledad Boris, M<sup>a</sup> Fernanda Fernández  
Biología Funcional (Área de Microbiología), Universidad de Oviedo

El uso de las Bacterias del Ácido Láctico en alimentación tiene una larga historia. Su presencia ubicua en el tracto gastrointestinal humano, así como su uso tradicional en alimentos fermentados y productos lácteos sin problemas significativos avalan su seguridad. La mayoría se consideran microorganismos comensales con potencial no patógeno, pero no se puede asumir que los nuevos organismos probióticos compartan esta característica con las cepas tradicionales, teniendo en cuenta que algunas de éstas se han aislado de procesos infecciosos (aunque sólo se han observado en personas que presentaban otras enfermedades de base o inmunodeprimidas). Por lo tanto, su seguridad debe ser verificada de forma individual, sobre todo en el caso de nuevas cepas o de microorganismos modificados genéticamente.

Se han propuesto una serie de ensayos para probar la seguridad de microorganismos probióticos, basados en el estudio de sus propiedades intrínsecas y farmacocinéticas y en la interacción de la cepa con el huésped.

Este trabajo evalúa la seguridad de una nueva cepa, potencialmente probiótica, *Lact. delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004. Esta cepa ha sido aislada a partir de heces de niño y caracterizada en cuanto a sus propiedades probióticas y tecnológicas para su uso en alimentos funcionales. La cepa se adhiere con elevada eficiencia a células Caco-2 y resiste un proceso de digestión simulada, además inhibe el crecimiento "in vitro" de bacterias enteropatógenas.

Se han valorado aspectos muy importantes relacionados con la seguridad, tales como su compatibilidad con la microbiota normal intestinal, su incapacidad para degradar la mucina intestinal o de translocar a través de la barrera intestinal murina, con resultados positivos. Por otra parte, se ha observado que no presenta otras actividades enzimáticas frecuentes en cepas de *Lactobacillus* potencialmente patógenas, como glicosidasas o arilamididasas análogas al factor Xa o la quimotripsina, aunque sí posee proteasas análogas al factor Ca y la kallikreína, menos frecuentes en lactobacilos relacionados con infecciones oportunistas.

Dentro de este estudio de bioseguridad, también se comprobó su sensibilidad a antimicrobianos cuyos mecanismos de resistencia son, con frecuencia, de codificación plasmídica en *Lactobacillus* y, por tanto, transferibles a otros microorganismos (cloranfenicol, eritromicina, rifampicina y vancomicina).

## PI10 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN DE LACTOBACILOS POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS A CÉLULAS INTESTINALES CACO-2

Raquel Rodríguez, Javier Tomillo, Eva Rodríguez, Margarita Medina  
Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid

Uno de los criterios deseables en la selección de nuevas cepas probióticas es la capacidad para adherirse al tracto gastrointestinal humano. Algunas cepas podrían además interferir en la adhesión de patógenos y estimular su eliminación del tracto gastrointestinal infectado.

En el presente trabajo se ha investigado la adhesión a células intestinales Caco-2 de 30 lactobacilos potencialmente probióticos obtenidos a partir de heces de lactantes, así como de 4 lactobacilos aislados de productos comerciales probióticos.

Las bacterias adheridas a las células se detectaron por tinción de Gram y recuento al microscopio. *Lactobacillus rhamnosus* GG aislado de un producto comercial fue utilizado como control positivo y *L. acidophilus* CECT 903 como control negativo.

Se observó una gran variabilidad en el grado de adhesión de los lactobacilos a las células intestinales. Veintiuno de los 30 aislados estudiados presentaron índices de adhesión (bacterias por campo) superiores a los del control negativo *L. acidophilus* CECT 903, con valores comprendidos entre  $12.3 \pm 0.1$  y  $208 \pm 65.3$ . Ocho de los aislados y el aislado comercial *L. reuteri* presentaron valores superiores (entre  $92 \pm 11.8$  y  $303 \pm 67.2$ ) a los obtenidos por *L. rhamnosus* GG ( $86.9 \pm 13.4$ ) considerada como bacteria muy adherente.

Se ha estudiado también la capacidad para excluir competitivamente la unión de *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4782 y *Salmonella choleraesuis* CECT 443 a las células Caco-2 de los aislados que presentaron los valores más altos de adhesión y de 2 lactobacilos comerciales.

*L. rhamnosus* PRO 344 y *L. rhamnosus* GG redujeron significativamente ( $P < 0.05$ ) la adhesión de *S. choleraesuis*. Sin embargo, ninguno de los aislados redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) la adhesión de *E. coli* O157:H7 a las células intestinales.

## PII1 ECOFISIOLOGÍA DE LOS MOHOS PRODUCTORES DE OCRATOXINA A EN UVA

Vicente Sanchis Almenar, Neus Bellí Martí, Antonio J. Ramos Girona, Sonia Marín Sillue  
Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina que está suscitando un interés creciente en los últimos años debido a su alta toxicidad y a su presencia en gran número de alimentos. Desde 1996 se viene estudiando la contaminación por OTA en zumos de uva y vinos. Recientes estudios coinciden en destacar los *Aspergillus* de la sección *Nigri* (*Aspergillus* negros) como los principales causantes de los niveles de OTA encontrados en uva, mosto y vino. El conocimiento de la ecofisiología de estos hongos es muy importante y de ello derivan nuestros estudios, cuyo principal objetivo es determinar la influencia de distintos parámetros en el crecimiento y producción de OTA por cepas aisladas de uva de vinificación.

Tanto *A. carbonarius* como el agregado *A. niger* fueron capaces de crecer en todo el intervalo de temperaturas ensayado (10-37°C), siendo el óptimo 30-37°C, en medio sintético con composición similar a la de la uva. En general, las velocidades de crecimiento incrementaron al hacerlo la actividad de agua (aw), estando el óptimo entre 0,95 y 0,98 aw. Finalmente, se obtuvieron modelos de crecimiento en función de los parámetros ensayados para cada grupo dentro de esta sección.

Las altas aw también favorecieron la producción de OTA por estos hongos, siendo 0,95-0,995 aw y 15-20°C las condiciones más favorables para *A. carbonarius*, el máximo productor de OTA en uva. En otro estudio con *Aspergillus* negros, se detectó la máxima acumulación de OTA a los pocos días de incubación a 25°C (5 días para *A. carbonarius* y 7-13 días para el agregado *A. niger*)

Experimentos *in vitro* sobre granos de uva, demostraron que las uvas dañadas previamente a la incubación, presentaron mayores niveles de OTA que las no dañadas. Las altas humedades relativas fueron también condiciones favorables a la acumulación de OTA en las uvas.

La mayor incidencia de *Aspergillus* negros en uva se produce antes de la cosecha. En esta época del año y de acuerdo con los resultados de los estudios ecofisiológicos, se deduce que las altas temperaturas y aw junto con cualquier daño producido por insectos o durante la cosecha, pueden favorecer el crecimiento y la formación de OTA por estas especies. Por todo ello, las medidas preventivas que se puedan tomar en este punto tendrán gran importancia para reducir la exposición del consumidor a esta toxina.

## PII2 INDUCCIÓN RÁPIDA (< 2 H) DE RESISTENCIA A NISINA EN *Streptococcus thermophilus* INIA 463 DURANTE SU CRECIMIENTO EN LECHE

Marta Ávila, Sonia Garde, Manuel Nuñez  
Tecnología de Alimentos, I.N.I.A., Madrid

La nisina, un lantibiótico con efecto antimicrobiano, es la bacteriocina mejor caracterizada de las producidas por bacterias lácticas. Es sintetizada por algunas cepas de *Lactococcus lactis* y se emplea en la industria alimentaria principalmente como conservante frente a microorganismos alterantes y patógenos. Entre otras aplicaciones de las bacteriocinas se encuentran aquellas basadas en su efecto lítico para conseguir acelerar la maduración de quesos (Garde et al., *Biotechnol. Lett.* 19: 1011, 1997; Morgan et al., *J. Dairy Sci.* 80: 1, 1997).

La aparición de variantes resistentes a una bacteriocina en cepas inicialmente sensibles constituye una importante limitación de su uso. *Streptococcus thermophilus* INIA 463 es una cepa empleada en elaboración de queso, sensible a nisina, que se lisa durante la maduración por la nisina producida por una cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* añadida como adjunto (Garde et al., *J. Agr. Food Chem.* 50: 3479, 2002). Sin embargo, cuando la misma cepa se inoculó en leche desnatada en un cultivo mixto con *L. lactis* subsp. *lactis* TAB 75, productor de nisina, observamos que sí era capaz de crecer. En el presente trabajo estudiamos la inducción de la resistencia a nisina en *Streptococcus thermophilus* INIA 463.

*Streptococcus thermophilus* INIA 463 adquirió la resistencia a nisina en menos de 2 h tras su exposición a concentraciones inhibitorias subletales de esta bacteriocina (1-3 UI/ml) en leche desnatada. La adición de 20 UI/ml provocó un descenso de 4 unidades logarítmicas en la población de un cultivo que no había sido expuesto previamente a nisina, mientras que no se observó ningún descenso en el caso del cultivo expuesto a nisina durante 2 h. Se descartó una posible transferencia de genes de inmunidad como responsable de la resistencia. No se detectó la presencia de enzimas específicos ni intra ni extracelulares que degradaran la nisina en la variante resistente de *Streptococcus thermophilus* INIA 463. La resistencia a nisina fue causada por la presencia de la misma bacteriocina, mediante la inducción en las células de un mecanismo de resistencia. El empleo de microscopía electrónica de transmisión reveló que la variante resistente de *Streptococcus thermophilus* INIA 463 presentaba una pared celular engrosada con respecto a la cepa salvaje, por lo que la resistencia parece estar asociada con ciertos cambios en la pared celular. La resistencia a nisina se perdía después de un pase (4 h de crecimiento) en leche desnatada libre de nisina.

## PI13 ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DE TIRAMINA EN *Lactococcus lactis* IPLA 655

Daniel M. Linares, María Fernández, Miguel A. Álvarez  
Instituto de Productos Lácteos de Asturias

Ver resumen O09

## PI14 CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO PRS1 DE *Oenococcus oeni*

Juan Manuel Mesas Mesas<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Carmen Rodríguez Pérez<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Teresa Alegre Arribas<sup>3</sup>

1-Dep. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología (Tecnología de Alimentos)

2-Dep. de Fisiología Vegetal

3-Dep. de Microbiología y Parasitología, Escuela Politécnica Superior, Lugo

La bacteria láctica *Oenococcus oeni* es la principal responsable de la fermentación maloláctica en un elevado número de vinos (Versari et al., 1999). Por esta razón se ha investigado la presencia de plásmidos que puedan servir como vehículos de clonación para la manipulación genética de esta bacteria. El hallazgo de tales plásmidos (Alegre et al., 1999; Mesas et al., 2001) ha abierto la posibilidad de desarrollar vectores de clonación para *O. Oeni*. El objetivo del presente trabajo ha consistido en la caracterización de pRS1 por comparación del crecimiento frente a condiciones de stress de la cepa silvestre portadora del plásmido y de una cepa curada carente del mismo.

*O. Oeni* RS1, cepa portadora del plásmido pRS1 (Alegre et al., 1999) y su cepa curada, RS1C7 carente de pRS1, (Mesas et al., 2004) fueron sometidas a crecimiento en medio líquido MRS frente a las condiciones de stress más frecuentes en el vino, hábitat natural de *O. Oeni*, determinando diferencias de crecimiento por medida de densidad óptica a 600 nm.

De entre los distintos agentes estresantes ensayados pH, temperatura, SO<sub>2</sub>, etanol, metales, ácido tánico y aromas propios del vino como geraniol y linalol, únicamente el SO<sub>2</sub> a bajo pH y el geraniol dieron de forma repetitiva una mayor inhibición del crecimiento de la cepa curada que de la cepa parental.

Estos resultados parecen indicar que pRS1 podría estar implicado en la defensa de su hospedador frente a condiciones de stress provocadas por la presencia de sustancias antioxidantes propias del vino o de la vinificación como el geraniol y el SO<sub>2</sub>. Alegre, M.T., Rodríguez, M.C. and Mesas, J.M. (1999). Nucleotide sequence analysis of pRS1, a cryptic plasmid from *Oenococcus oeni*. Plasmid, 41: 128-134.

Mesas, J. M., Rodríguez, M. C. and Alegre, M.T. (2001). Nucleotide sequence analysis of pRS2 and pRS3, two small cryptic plasmids from *Oenococcus oeni*. Plasmid, 46: 149-151.

Mesas, J. M., Rodríguez, M. C. and Alegre, M.T. (2004). Plasmid curing of *Oenococcus oeni*. Plasmid, 51: 37-40.

Versari, A., Parpinello, G. P. and Cattaneo, M. (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: A review. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 23: 447-455.

## PI15 INHIBICIÓN DE *Escherichia coli* Y *Aspergillus flavus* EN CEBADA Y EN PIENSO DE ACABADO MEDIANTE DIVERSOS ADITIVOS

M.Ángeles Calvo, Carles Adelantado, Carlos Shiva

Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la capacidad inhibidora de diversos aditivos: ácido propiónico, ácido fórmico, aceites esenciales y mezcla de ambos productos adicionados a cebada en grano y pienso en polvo a fin de controlar la presencia de *Escherichia coli* FVB467 y *Aspergillus flavus* (FVB= Facultad de Veterinaria de la U.A.B.)

Se dispusieron 100 gramos de cada alimento en matraces y se autoclavaron a 121°C por 20 minutos, la cantidad de matraces preparados fue la necesaria para hacer lectura de 0 horas (blancos) 7 y 14 días.

La mitad de los matraces se inocularon con 1,5ml de una suspensión de *Escherichia coli* y otra con *Aspergillus flavus*. A la par se adicionaron los aditivos a los diversos matraces, los productos fueron a adicionados a las siguientes proporciones, ácido propiónico, fórmico y los productos mezcla de aceites esenciales y ácidos a 2000 ppm; y los aceites esenciales a a 1000ppm, tras la adición se homogenizaron bien con el contenido.

Los matraces cerrados e inoculados y los controles blanco, se incubaron a temperatura ambiente (20-25°C) por 14 días, para mantener la humedad se adicionó 1,5 ml de agua desionizada estéril en el día 3 y 8.

Los resultados muestran que en el caso de la cebada los productos que inhibieron al 100% *Escherichia coli* a los 7 días fueron ácido fórmico y a los 14 días uno de los aceites esenciales, mientras que inhibieron al 100% el crecimiento de *Aspergillus flavus* al día 7, el ácido fórmico y el propiónico; precisando la mezcla de aceites esenciales con ácidos de 14 días para obtener el 100% de inhibición.

En el caso del pienso de acabado en polvo, frente a *Escherichia coli*, las reducciones fueron de casi un logaritmo, para casi todos los aditivos, sin llegar al 100% de inhibición pero en el caso de los matraces inoculados con *Aspergillus flavus*, no hubo reducciones significativas con respecto al pienso control sin inocular.

## **PI16 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD EN LA PRODUCCIÓN E INMUNIDAD DE BACTERIO- CINAS EN CEPAS DE *Enterococcus* DE DIFERENTES ORÍGENES**

Rosa Del Campo<sup>1</sup>, Patricia Ruiz-Garbajosa<sup>1</sup>, Carmen Tenorio<sup>2</sup>, Rufino Jiménez-Díaz<sup>3</sup>, Alfonso Navas<sup>4</sup>, Carmen Torres<sup>2</sup>, Fernando Baquero<sup>1</sup>

1-Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

2-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño

3-Instituto de La Grasa, CSIC, Sevilla

4-Museo de Ciencias Naturales, Madrid

El objetivo de este trabajo fue investigar la diversidad de las bacteriocinas en cepas del género *Enterococcus*, separando la producción de la inmunidad. Para ello, se realizó un test de producción a un total de 720 cepas aisladas de diferentes ecosistemas, utilizando un panel de 33 cepas indicadoras (20 *Enterococcus*, 4 *Listeria*, 3 *Staphylococcus*, 1 *Escherichia*, 1 *Bacillus*, 1 *Leuconostoc*, 2 *Lactobacillus*, y 1 *Pediococcus*). De esta forma se seleccionaron las 100 cepas de *Enterococcus* con espectro de producción más amplio y cuyos halos de inhibición fueron mayores (52 aislados de heces de individuos sanos, 24 de heces de animales, 20 aislados clínicos y 4 cepas de aguas residuales). Mediante electroforesis en campo pulsado y su posterior análisis informático se estudió la relación clonal de estas cepas. Estas 100 cepas se utilizaron ahora como cepas productoras e indicadoras a la vez, a fin de comprobar si producían o no la misma bacteriocina, calculando para ello el coeficiente de similitud de Dice para los fenotipos de producción e inmunidad y utilizando también un análisis estadístico de correspondencia factorial en el que se combinaban las variables cuantitativas y cualitativas. Resultados: En el grupo de las 100 cepas seleccionadas se observó mayor producción en la especie *E. faecalis* (57%) que en *E. faecium* (50%) u otras especies del género *Enterococcus* (8%). Sin embargo, estas proporciones pueden invertirse si se considera el origen de las cepas. Por otro lado, se observaron patrones de inmunidad similares en cepas cuyo patrón de producción era muy diferente, sugiriendo la posible transferencia de genes de inmunidad como mecanismos de resistencia. Además, el análisis factorial sugiere una única estructura fenotípica tanto para la inmunidad como para la producción. Finalmente, el campo pulsado mostró la diseminación de clones particulares entre distintos ecosistemas. Conclusión: La producción de bacteriocinas en el género *Enterococcus* es un hecho común, si bien existen diferencias cuando se considera el origen de la cepa. La producción de estas sustancias y los mecanismos de inmunidad desarrollados son inherentes al género y su diversidad no proviene de la adquisición de elementos ajenos.

## **PI17 PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA MUNDTICINA A PARTIR DE CEPAS DE *Enterococcus faecium* AISLADAS DE HECES DE TORO, TRUCHA Y CERDO**

Rufino Jiménez-Díaz<sup>3</sup>, Rosa Del Campo<sup>1</sup>, Carmen Tenorio<sup>2</sup>, José Luis Ruiz-Barba<sup>3</sup>, Fernando Baquero<sup>1</sup>, Carmen Torres<sup>2</sup>

1-Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

2-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño

3-Instituto de La Grasa, CSIC, Sevilla

La mundticina KS es una bacteriocina del grupo IIa caracterizada previamente por Kawamoto *et al.* (2002) en Tailandia a partir de una cepa de *Enterococcus mundtii* de origen ambiental, no habiéndose encontrado en ninguna otra especie de *Enterococcus*. En este trabajo, se ha logrado purificar una bacteriocina parecida a la mundticina a partir de tres cepas de *E. faecium* aisladas en las heces de un cerdo, una trucha y un toro, respectivamente, recogidas en diferentes lugares de la Comunidad de La Rioja. Los estudios de electroforesis en campo pulsado demostraron que las tres cepas pertenecían a un mismo clon. Para la detección fenotípica de la producción de bacteriocinas se utilizaron 33 cepas indicadoras de diferentes géneros y especies (20 *Enterococcus*, 4 *Listeria*, 3 *Staphylococcus*, 1 *Leuconostoc*, 2 *Lactobacillus*, y 1 *Pediococcus*). Las tres cepas de *E. faecium* presentaron un amplio espectro de actividad antimicrobiana con gran actividad inhibidora frente a las 4 especies del género *Listeria* y las bacterias lácticas estudiadas, así como frente a 18 de las 20 cepas de *Enterococcus*. La purificación de la bacteriocina se llevó a cabo empleando una estrategia previamente descrita, consistente en la precipitación con sulfato de amonio de los sobrenadantes de cultivo libres de células, cromatografía de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y fase reversa C<sub>2</sub>/C<sub>18</sub>. Por degradación de Edman de los péptidos purificados se obtuvo una secuencia 88% idéntica a la mundticina KS descrita anteriormente. Sin embargo, resultados preliminares sugieren que la organización del locus de la mundticina en estas cepas es diferente a la descrita en la cepa original. Por otro lado, utilizando cebadores específicos, se pudo constatar la presencia del gen L50A (*ENTI*) en el ADN de estas tres cepas de *E. faecium* pero no la del gen L50B (*ENTJ*). Los resultados anteriores sugieren la diseminación de clones específicos de *Enterococcus* entre animales geográficamente distantes, así como la posibilidad del intercambio de los genes de la producción/inmunidad de bacteriocinas entre distintas especies de *Enterococcus*.

## **PI 18 EFECTO DEL PH EN LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A POR *Aspergillus ochraceus* 2948**

Meritxell Ventura, Maribel Mayans, Ivan Anaya, Lluís Comellas, Montserrat Agut  
Institut Químic de Sarrià (IQS), Barcelona

### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

La ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario de *Aspergillus ochraceus*. Las amplias condiciones medioambientales que permiten el crecimiento de esta especie fúngica justifica tanto su ubicuidad geográfica como la posibilidad de detectar OTA en una gran diversidad de sustratos. La invasión fúngica puede producirse durante cualquiera de las etapas de producción, procesado, transporte o almacenamiento del alimento, es por ello, que es importante controlar los parámetros que afectan al crecimiento y posterior producción de OTA para minimizar el efecto de contaminación de alimentos. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del pH sobre la producción de OTA al desarrollar *A. ochraceus* en caldo extracto de levadura y sacarosa (15%) durante 14 días a 30 °C.

### **MÉTODOS**

Para el estudio del efecto del pH en la producción de OTA, *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 fue incubado en agar patata glucosa a 27 °C durante 7 días. Se ajustaron 50 ml de caldo extracto de levadura y sacarosa (15%) a distintos pHs usando en cada caso el tampón correspondiente (2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14) y posteriormente cada uno de ellos fue inoculado con 1 ml de una suspensión de conidios (10<sup>7</sup> conidios/ml). Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 14 días.

Trabajos experimentales consultados apuntan que la presencia de determinados aminoácidos contribuye a la producción de OTA, para ello, el pH óptimo de producción se ajustó usando un tampón sin glicina y con glicina.

La cuantificación de la producción de OTA se realizó mediante HPLC usando una columna narrow-bore de fase inversa C18 con detector de fluorescencia tras una etapa previa de filtración y extracción en fase sólida (1).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

No se observa crecimiento fúngico a los pHs de 2 y 14. La máxima producción de OTA se produce a un pH de 10.1 detectándose 5 ng/mL de OTA en el medio de cultivo. La concentración de OTA a los otros pHs de estudio han resultado ser del orden de 0.2 ng/ml y de 2 ng/ml al pH de 12. Según bibliografía consultada la producción de OTA debería ser óptima al pH de 5.6, lo que se confirmará en estudios posteriores.

La presencia de glicina en el medio no influye significativamente en la producción de OTA.

### **BIBLIOGRAFÍA**

(1) M.Ventura, M. Agut, F. Broto-Puig, L. Comellas. Determination of ochratoxin A using solid-phase extraction and narrow-bore HPLC with fluorescence and ESI-MS detector. *Afinidad* (2003), 60 (506), 382-386.

## **PI 19 MÉTODO COLORIMETRICO DE MICRODILUCION EN PLACA APLICADO A CONCENTRACIONES MÍNIMAS BACTERICIDAS DE ACEITES ESENCIALES, ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SUS COMBINACIONES SOBRE BACTERIAS**

Carlos Shiva Ramayoni, Carles Adelantado, Maria Paz Vilaplana, Maria Angels Calvo Torras  
Departament de Sanitat y d'Anatomía Animals, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra

La técnica de microdilución en placa se aplica para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos naturales de plantas. El objetivo este estudio es evaluar la actividad bactericida de una mezcla de aceites esenciales, ácidos orgánicos y combinaciones de ambos, tomando como referencia la técnica descrita por Eloff (1998)

Los microorganismos utilizados fueron: *Salmonella typhimurium* FVB576, *Escherichia coli* FVB467 y *Staphylococcus aureus* FVB13. (FVB= Facultad de Veterinaria de la U.A.B.).

Los productos a evaluar fueron: una mezcla de aceites esenciales (IPR) obtenidos por destilación por vapor a partir de plantas de la familia Rutaceae, ácido fórmico, ácido propiónico y un producto que contenía una mezcla de IPR y ácidos orgánicos (PI)

Las microplacas empleadas poseen 96 pocillos. El medio utilizado ha sido caldo triptonsoja (TSB). En la primera serie de pocillos se deposita el producto a evaluar; a 32000 ppm, (100µl) y en los otros pocillos de la placa 50 µl de TSB. Se preparan diluciones seriadas a partir de la primera serie de pocillos y a continuación se adicionan 50 µl de una concentración del microorganismo (100.000 UFC/ml), reduciéndose la primera dilución de los productos a 16000 ppm. (Volumen final para todos los pocillos de 100 µl), la fila 12 se deja para controles positivos y negativos. El IPR parte con una concentración inicial final de 4000 ppm. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Se incuban a 35°C en aerobiosis, por 18-24 horas. Finalizada la incubación, se adiciona 40 µl de una solución de sales de violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT) (Sigma), a una concentración de 0,2mg/ml INT. Se mantiene a 35°C entre 30 a 60 minutos y se procede a la lectura de resultados. La solución de sales es un indicador de actividad biológica dado que sus componentes actúan como aceptores de electrones y son reducidos, desencadenando color cuando hay actividad de los microorganismos y quedando incoloro en caso contrario.

Este método de microdilución permite una rápida visualización de resultados de inhibición por el color rojo que se desarrolla mientras exista crecimiento bacteriano, factor que facilita la interpretación de resultados y evita errores de lectura derivados del color de los extractos naturales que producen turbidez o color oscuro del medio

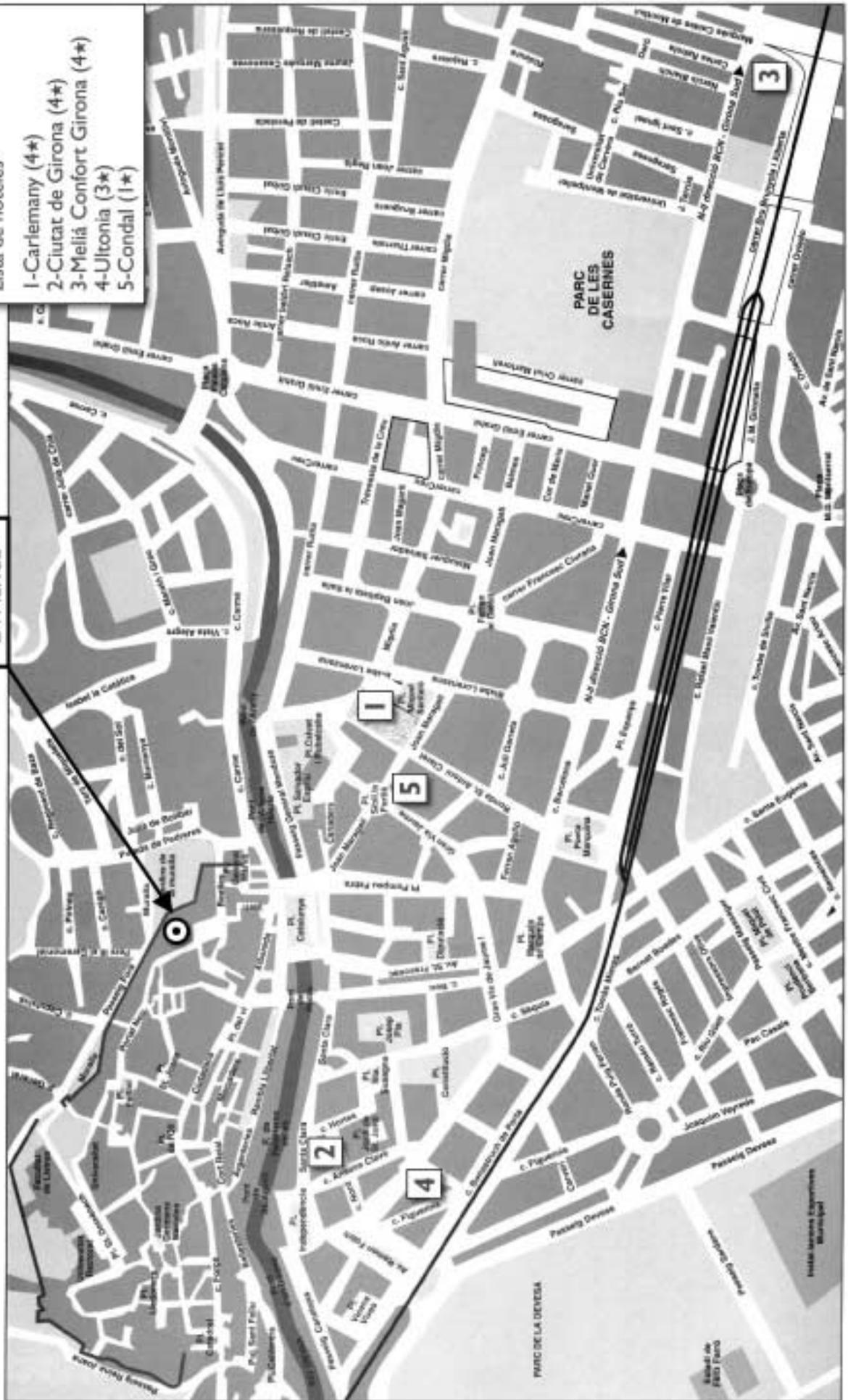




**CENTRE CULTURAL LA MERCE**

**Lista de horeles**

- 1-Carlemany (4★)
- 2-Ciutat de Girona (4★)
- 3-Meliá Confort Girona (4★)
- 4-Ultonia (3★)
- 5-Condal (1★)





## ÍNDICE DE AUTORES



**A**

Abadias, Maribel P069  
 Abrioue, Hikmate P009, P100  
 Acosta, Raquel O15, P073  
 Adelantado, Carles P043, P115, P119  
 Aduriz, Gorka P078  
 Agut, Montserrat P045, P118  
 Albisu, Marta P010  
 Alcón, Cristina P041  
 Aledón, Laila P011  
 Alegre, M<sup>a</sup> Teresa P114  
 Allaert, Corrie P044  
 Alonso, Mercedes O02, P059  
 Álvarez, Miguel A. O09  
 Álvarez, Pablo P004  
 Anaya, Iván P045, P118  
 Andrade, María Jesús P028  
 Andreu, Eva P080  
 Aparicio, David P033  
 Arana, Inés P107  
 Aranda, Emilio P013, P028  
 Araújo, Ana Belén P077  
 Arroyo, F.N. P104  
 Arroyo, Teresa P025  
 Asensio, Àngels P069  
 Asensio, Miguel A. O02, O15, P073  
 Ávila, Marta P112  
 Ayala, Fernando P050  
 Aymerich, Teresa MR3, O03, P016, P017, P034, P036, P062, P075  
 Aznar, Rosa O06  
 Azqueta, Arantxa P072

**B**

Bachrouri, Mohammed P101  
 Badosa, Esther P063  
 Baixas-Nogueras, Sonia O13  
 Bañeras, L. P038  
 Baquero, Fernando O10, P116, P117  
 Barba, Victor P031  
 Barbés, Covadonga P109  
 Barnés, M<sup>a</sup> José P074  
 Barrera, Oriol P057  
 Barrio, Eladio P006  
 Bartolomé, Rosa P086  
 Bellí, Neus P111  
 Belsa, Silvia P070  
 Ben Omar, Nabil P009, P100  
 Benezet, Andrés P061  
 Benito, Amparo P041  
 Benito, María José P014  
 Bermúdez, Elena O02, O15, P073  
 Berrada, Houda P046  
 Bilbao, Ainhoa P026  
 Bonaterra, Anna P063  
 Boris, Soledad P109  
 Bosch, Albert MR4  
 Bosch, E. P038  
 Botas, Marina P061  
 Bover-Cid, Sara MR4, O13

Bravo, Daniel O10, P012  
 Breccia, Marika P015  
 Buesa, Javier O08

**C**

Cabellos, Juan Mariano P025  
 Cabeza, Enrique Alfonso P091  
 Cabeza, María Concepción O05  
 Cabrefiga, Jordi P063  
 Cabrera-Díaz, Elisa O11  
 Cadena, Miriam P070  
 Calderón, Jacinta P070  
 Calvo, María Àngels P043, P115, P119  
 Cambero, Isabel O05  
 Cantalejo, María Jesús P040, P060  
 Cañamás, Teresa Paula P069  
 Carballo, José O04  
 Carballo, Julia P077  
 Carbó, Rosa P015  
 Cardell, Evaristo P097  
 Cardona, Guillermo P070  
 Carrillo, Juan Ángel P080  
 Casado, Eva P028  
 Caso, José Luis P079  
 Castaño, M<sup>a</sup> Angeles P074, P084, P085  
 Castells, Miren P051  
 Castillo-Ayala, Alejandro P083  
 Castro-Escarpullí, Graciela P082  
 Cava, Ramón P059  
 Centeno, Sara P094  
 Cervellón, Mónica P070  
 Chumilla, M<sup>a</sup> Dolores P084  
 Clavijo, Claudia P040, P060  
 Clemente, Francisco P107  
 Cobos, Àngel P055, P056  
 Colín, Blanca P014  
 Comellas, Lluís P045, P118  
 Córdoba, Juan José MR3, P028, P059  
 Córdoba, María de Guía P013, P014  
 Crespo, Pilar P033  
 Cuesta, Marta P079  
 Cutrín, Juan Manuel P088

**D**

D'Arrigo, Matilde P105  
 Dàvila, Eduard P098  
 De la Hoz, Lorenzo O05  
 De la Osa, José María P061  
 De Silóniz, María Isabel P095  
 De Simón, Mercè P086  
 Del Campo, Rosa O10, P116, P117  
 Del Valle, Luís P015  
 Delgado, María del Carmen P068  
 Delgado, Susana P108  
 Deulofeu, J. P038  
 Díaz, Amalia P053  
 Díaz, Olga P055, P056  
 Díaz, Virginia O04  
 Dueñas, María Teresa P029  
 Durán, M.C. P104

**E**

Echávarri, José Federico P050  
 Eche, Francisco Javier P042  
 Echeita, Aurora P078  
 Eduardo, Agatangelo Joaquim P101  
 Elez, Pedro P053  
 Elvira, Luis P042  
 Esteban, Jon Imanol P078  
 Etxebarria, Argizka P033

**F**

Fadda, Silvina P016, P075  
 Fajardo, Carmen P005  
 Falguera, Davis P070  
 Fernández, Ana P050  
 Fernández, M<sup>a</sup> Pilar P010  
 Fernández, M<sup>a</sup> Fernanda P109  
 Fernández, Manuela P007  
 Fernández, María O09  
 Fernández, Norman P024  
 Fernández-Espinar, M<sup>a</sup> Teresa P090  
 Fernández-Rendón, Elizabeth P082  
 Fernández-Salguero, José P052  
 Ferrer, M. Dolors P086  
 Figueras, Ferran P043  
 Fitzgerald, Gerald P108  
 Flores, Jorge P080  
 Flórez, Ana Belén P020  
 Fort, Nuri P098  
 Francés, Jesús P063  
 Frizzo, Laureano O15  
 Fueyo, José María P027  
 Furones, Dolores MR4

**G**

Gálvez, Antonio P009, P099, P100  
 Garay, Esperanza O06  
 García, Ana P024  
 García, Esther P078  
 García, Gonzalo P102, P103, P105  
 García, María Luisa O05, P057, P088  
 García, Mercedes P026  
 García-Albiach, Raimundo O10  
 García-López, Isabel P081, P093  
 García-López, María Luisa P032, P081, P093  
 Garde, Sonia P112  
 Garrido, A. P104  
 Garriga, Margarita O03, P016, P017, P034, P036, P062, P075  
 Garrofé, Robert P044  
 Gil, M<sup>a</sup> del Mar P025  
 Gimeno, José Vicente P011, P071  
 Godall, Monica P070  
 Gómez, Rafael P052  
 Gómez-Ullate, Yago P042  
 González, Amaia P030  
 González, Gabriela P071  
 González, Fernando P078  
 González, Sara Susana P006

González, Susana P067  
González-Hevia, María Ángeles O07, P027  
González-Jaén, María Teresa P030, P031  
González-Salgado, Amaia P031  
Goossens, Bart CF  
Grande, María J. P100  
Grèbol, Narcís MR2

## H

Hernández, Alejandro P013  
Hernández, David P097  
Hernández, Marta P021  
Herranz, Beatriz P007  
Herrero, Ana O07  
Hidalgo, Pilar P005  
Hierro Paredes, Eva P007  
Hill, Colin MR2  
Hoz Perales, Lorenzo P007  
Hugas, Marta O03, P062, P016, P017,  
P034, P036, P075  
Hurtado, Ana P078

## I

Ibarburu, Idota P029  
Iglesias, José Ramón P042  
Infante, Teresa P047  
Irastorza, Ana P029  
Irigoyen, Aurora P107

## J

Jaurequi, Javier Ignacio P072  
Jiménez, Francisco O04  
Jiménez, Misericordia P011, P031, P071  
Jiménez, Virginia P068  
Jiménez-Díaz, Rufino MRI, P116, P117  
Jofré, Anna P034, P062  
Jordano, Rafael P039  
Jurado, Miguel P030, P031

## K

Kárkamo, J.C. P076  
Kives, Juliana O14, P092

## L

Lana, Montserrat P072  
Lavizzari, Tommaso O13  
León, Agustín P054  
Linares, Daniel M. O09  
Lizana, Xavier P070  
Llanos, Antonio P032, P057  
Lomas, M<sup>a</sup> Carmen P050  
López, Asunción P070  
López, Isabel O01  
López, Paloma P029  
López-Errasquín, Elena P031, P030  
Lucas, Rosario P009, P100

## M

Magaña, Isabel M<sup>a</sup> P074  
Maifreni, Michela P015  
Maldonado, Rogelio P037  
Mañes, Jordi P046  
Maqueda, Mercedes P099, P100  
Marcos, Begonia O03  
Marín, Sonia P051, P111  
Martín, Olga MR2, P053  
Martín, Alberto P013, P014  
Martín, Belén P017, P034, P036  
Martín, María Cruz O07, P027  
Martínez, Ana P072  
Martínez, Antonio P058  
Martínez, Gracia P074, P084, P085  
Martínez, Joaquín V. P023  
Martínez, José P035  
Martínez, M<sup>a</sup> Carmen P080  
Martínez, Manuel P100  
Martínez, Magdalena P009, P100  
Martínez, Noelia O07  
Martínez, Oscar P088  
Martínez-Blanch, Juan Fco. O06  
Martínez-Bueno, Manuel P099  
Martorell, Patricia P090  
Mateo, Rufino P011, P071  
Mateo, Javier P091  
Matesanz, Javier P042  
Mayans, Maribel P118  
Mayo, Baltasar P004, P020, P108  
Medina, Angel P011, P071  
Medina, Luis M. P039  
Medina, Margarita P012, P110  
Mendoza, María Carmen O07, P027  
Mesas, Juan Manuel P114  
Mirelis, Beatriz P086  
Montaño-Rosales, Raúl O11  
Montero, Francisco P042  
Montesi-Libois, Alejandra O10  
Montesinos, Emilio P063  
Monzó, José Luís O08, P041  
Mora, María Teresa P101  
Mora, Regla P047  
Moreno, Bernardino P078  
Moreno, M. Carmen P063  
Moreno-Arribas, Victoria O01  
Mota de la Garza, Lydia P037, P082  
Muñoz, Arantxa P099

## N

Nájera, Gabriela P037  
Navarro-Hidalgo, Verónica P083  
Navas, Alfonso P116  
Navas, Jaime P023  
Navas, Jesús P029  
Nombela, Alejandro P080  
Notermans, Servè C.I.  
Núñez, Félix O02, O15, P059, P073  
Núñez, Manuel P112

## O

O'Sullivan, Ellis P108  
Ocio, M<sup>a</sup> José O06  
Olabarria, Garbiñe P026  
Olarte, Carmen P050  
Olea-Rodríguez, María de los Ángeles P083  
Olivares-Cruz, Rosa del Carmen O11  
Olmo, Nieves P061  
Ordóñez, José Antonio P007  
Ordóñez, Juan Antonio O05  
Orgaz, Belén O14, P092  
Oria, C. P076  
Orive, José Ramón P078  
Orozco-Hernández, Laura Ofelia P082  
Ortega, Ivan P070  
Ortigosa, María P107  
Ortiz, Sagrario P023  
Otero, Andrés P032, P057, P093

## P

Palacios, Noemí P008  
Palop, María de los Llanos P022  
Pando, Rosa P008, P024  
Pañella, Helena P086  
Parés, Dolors P098  
Patiño, Belén P030, P031  
Patterson, Margaret F. P093  
Pedregal, Eva P061  
Peinado, José M. P095  
Pereira, Carlos P088  
Pérez, Fernando P061  
Pérez, Francisco P013, P014  
Pérez, Francisco José P010  
Pérez, Rubén P009  
Pérez de Juan, Javier P072  
Periago, M<sup>a</sup> Jesús P080  
Picinelli, Anna P008  
Picó, Yolanda P046  
Picón, Antonia P012  
Pin, Carmen P102, P103, P105  
Pino, Antonio P052  
Pinto, Beatriz O06  
Pla, María P021  
Polo, Carmen O01  
Poulain, Vanesa P058  
Pozuelo, María José O10  
Prados, Francisco P052  
Priego, Rafael P039  
Puig, Ester P098

## Q

Querol, Amparo P006, P024, P090  
Quinto, Emiliano José P101  
Quirós, Manuel P095

## R

Ramos, Antonio J. P051, P111  
Reguera, Juan Ignacio P054

Resa, Pablo P042  
Rico, Daniel P072  
Rivas, Ana María P068  
Rivas, Alejandro P058  
Rodicio, María Rosario O07, P027  
Rodrigo, Alejandro O08  
Rodrigo, Dolores P058  
Rodrigo, Miguel P058  
Rodríguez, Ana MRI, P099  
Rodríguez, Eva P110  
Rodríguez, Irene O07  
Rodríguez, Iris P047  
Rodríguez, M<sup>a</sup> Carmen P114  
Rodríguez, Mar P028  
Rodríguez, Raquel P110  
Rodríguez, Roberto P008  
Rodríguez, Rosianny P094  
Rodríguez-Calleja, José M<sup>a</sup> P081, P093  
Rodríguez-Lázaro, David MR3, P021  
Rojo, Beatriz O01  
Román, Ángeles P055, P056  
Romeo, Miguel P026  
Ron, Alfredo P042  
Ros, Gaspar P080  
Rubio, Virginia P030  
Ruíz, Ángela P084  
Ruiz-Barba, José Luis P117  
Ruiz-Capillas, Claudia O04  
Ruiz-Garbajosa, Patricia P116  
Ruiz-Larrea, Fernanda O01  
Ruiz-Rueda, O. P038

## S

Saavedra, Dania P047  
Sáez, María Damiana P033  
Sala, Nuria P044  
Sampedro, Lorena P042  
San José, Carmen O14, P092  
San Vicente, Juan Carlos P026  
Sánchez, Ana M<sup>a</sup> P074, P084, P085  
Sánchez, Beatriz P028  
Sánchez, Isabel P022  
Sanchis, Vicente P044, P051, P111  
Santos, Jesús A. P032, P081, P088  
Sanz, Susana P050  
Sepulcre, Francesc P015  
Seseña, Susana P022  
Shiva, Carlos P043, P115, P119  
Siloniz, Maria Isabel P035  
Simón, Belén P005  
Soriano, José Miguel P046  
Sosa, María J. O02, P073, P059  
Stratford, Malcolm P090  
Suárez, Belén P008, P024

## T

Talon, Régine MRI  
Tarragó, Marc P070  
Tenorio, Carmen O01, P116, P117  
Tomás, David O08, P041

Tomillo, Javier P110  
Torre, Paloma P107  
Torres, Carmen O01, P116, P117  
Torres, Mercè P044  
Torres-Vitela, Ma. Refugio O11, P083  
Turati, Rosa P047

## U

Urarte, Eduardo P078  
Urgatondo, Vanesa P070

## V

Vaderrama, María L. O01  
Valderrama, María José P035, P095  
Valdivia, Eva P099, P100  
Valle, Francisco Manuel P011, P071  
Vázquez, Covadonga P031, P030  
Veciana-Nogués, Teresa O13  
Velasco, Raquel P102, P103, P105  
Ventura, Meritxell P045, P118  
Vidal-Carou, M. Carmen O13  
Vila, Jordi P086  
Vilaplana, Maria Paz P119  
Vilella, M<sup>a</sup> Dolores P085  
Villalpando-Arteaga, Edgar Vinicio O11  
Villarruel-López, Angélica P082  
Víñas, Inmaculada P069  
Vioque, Montserrat P052  
Vivas, Ana M<sup>a</sup> P085

## W

Werning, Maria Laura P029  
Wrent, Petra P035

## Z

Zárate, Victoria P097  
Zarazaga, Myriam O01  
Zigorraga, C. P076  
Zumalacárregui, José María P067, P091  
Zúñiga, Manuel P058



Organiza:

