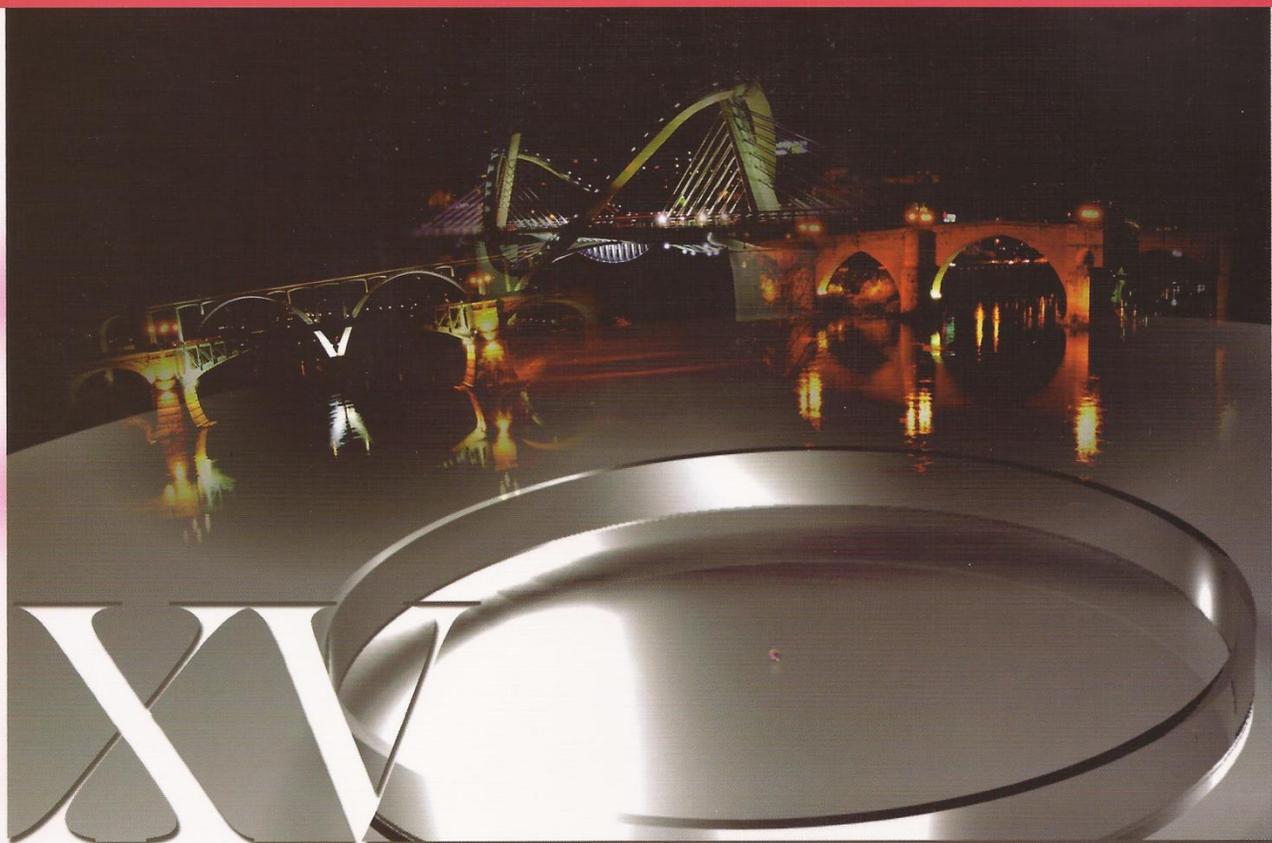


LIBRO DE RESÚMENES



Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Ourense, 11-13 de septiembre de 2006



LIBRO DE RESÚMENES

Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Ourense, 11-13 de septiembre de 2006

Facultad de Ciencias de Ourense
Universidad de Vigo

Editores:

Inmaculada Franco

Francisco Javier Carballo

Impresión:

Imprenta Deputación de Ourense

ISBN: 84-931616-4-0

Depósito legal: OU-84/2006

Acoger un congreso científico de carácter nacional es siempre una magnífica noticia, pues a la calidad e importancia de los asuntos tratados se añade la relevancia de los científicos, investigadores y profesores que participan en él y a los que nos honramos en acoger.

En las tres jornadas que durará este encuentro se van a analizar muchos aspectos de gran sensibilidad social, relacionados con la seguridad alimentaria.

Para la Diputación de Ourense es un placer asumir la publicación en un libro de los resúmenes de las conferencias inaugural y de clausura, mesas redondas, comunicaciones, etc, esperando que sea una herramienta útil para el desarrollo de este congreso.

Quisiera, finalmente, transmitir mi felicitación personal a los miembros del comité organizador por el trabajo desarrollado y hacerles llegar a todos los participantes una cordial bienvenida, con el deseo de que disfruten de la tradicional hospitalidad de los ourensanos.

José Luis Baltar Pumar
Presidente Diputación Ourense

ÍNDICE

CARTA DE BIENVENIDA	9
COMITÉS	11
PROGRAMA	17
CONFERENCIA INAUGURAL, MESAS REDONDAS, CONFERENCIA DE CLAUSULA	23
<i>Conferencia inaugural</i>	25
<i>Mesa redonda I</i>	29
<i>Mesa redonda II</i>	38
<i>Mesa redonda III</i>	45
<i>Mesa redonda IV</i>	51
<i>Conferencia de clausura</i>	61
COMUNICACIONES ORALES	69
<i>Microbiología sanitaria</i>	71
<i>Microbiología de las fermentaciones. Bacterias lácticas y probióticas</i>	77
<i>Microbiología de la conservación. Destrucción e inhibición microbianas</i>	83
COMUNICACIONES POSTER	89
<i>Microbiología sanitaria</i>	91
<i>Microbiología de las fermentaciones. Bacterias lácticas y probióticas</i>	127
<i>Microbiología de la conservación. Destrucción e inhibición microbianas</i>	151
<i>Metodología</i>	173
ÍNDICE DE AUTORES	175

CARTA DE BIENVENIDA

Estimados colegas y amigos,

En nombre del Comité Organizador, bienvenidos a Ourense. Es para nosotros un motivo de placer y satisfacción el acogeros en nuestra ciudad.

Quiero, en primer lugar, agradecer a la Sociedad Española de Microbiología y al Grupo de Microbiología de los Alimentos la invitación que nos han cursado para organizar en Ourense el XV Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos.

El Congreso, siguiendo el formato de los últimos celebrados, con una duración de dos días y medio, ha sido estructurado con una conferencia inaugural, cuatro mesas redondas, tres sesiones orales, tres sesiones de póster y una conferencia de clausura. Los temas abordados en las conferencias inaugural y de clausura, así como en las mesas redondas programadas, han sido elegidos en base a tres criterios: actualidad, relevancia científica y originalidad, evitando redundar en las temáticas tratadas en los últimos Congresos Nacionales de Microbiología de los Alimentos. Los conferenciantes y ponentes invitados son todos ellos profesionales y autoridades científicas de reconocido prestigio en el campo de la Microbiología Alimentaria.

Hemos intercalado, además, un programa lúdico de visitas, en las que tendréis ocasión de contemplar los lugares más emblemáticos, tanto de la ciudad de Ourense como de su provincia.

Finalizo agradeciendo sinceramente a la Excma. Diputación Provincial de Ourense, al Ayuntamiento de Ourense, a la Universidad de Vigo, a la Xunta de Galicia, y a todas aquellas personas, empresas e instituciones que nos han ayudado durante este último año y han hecho más fácil nuestra labor.

Espero y deseo que vuestra estancia en Ourense sea agradable y provechosa.



Francisco Javier Carballo García
Presidente del Comité Organizador

COMITÉS

COMITÉ DE HONOR

Excmo. Sr. D. Emilio Pérez Touriño

Presidente da Xunta de Galicia

Excmo. Sra. Doña María José Rubio Vidal

Conselleira de Sanidade, Xunta de Galicia

Excmo. Sr. D. Alfredo Suárez Canal

Conselleiro do Medio Rural, Xunta de Galicia

Ilmo. Sr. D. José Luis Baltar Pumar

Presidente de la Excmo. Diputación Provincial de Ourense

Ilmo. Sr. D. Manuel J. Cabezas Enríquez

Alcalde de Ourense

Ilmo Sr. D. Gonzalo Flores Calvete

Director Xeral de Investigación, Tecnoloxía e Formación Agroforestal

Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia

Ilmo. Sr. D. Antonio Oca Fernández

Director Xeral de Producción, Industrias e Calidade Agroalimentaria

Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia

Ilmo. Sr. D. Ramón Medina González-Redondo

Director Xeral de Saúde Pública

Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia

Ilmo. Sr. D. Salustiano Mato de la Iglesia

Director Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación

Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia

Excmo y Magfco. Sr. D. Domingo Docampo Amoedo

Rector de la Universidad de Vigo

Excmo. Sr. D. Carlos Hardisson Rumeu

Presidente de la Sociedad Española de Microbiología

Excmo. Sr. D. Miguel Ángel Asensio Pérez

Presidente del Grupo de Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología

Excmo. Sr. D. Filemón Rodríguez Rodríguez

Presidente del Consejo Gallego de Colegios de Veterinarios

COMITÉ CIENTÍFICO

Carlos Alonso Calleja (Universidad de León)
Ana Bernardo Álvarez (Universidad de León)
Santiago Condón Usón (Universidad de Zaragoza)
Lorenzo de la Hoz Perales (Universidad Complutense de Madrid)
Carmen de la Rosa (Universidad Complutense de Madrid)
José Fernández-Salguero Carretero (Universidad de Córdoba)
María Luisa García López (Universidad de León)
Marta Hugas Maurici (IRTA-EFSA)
Francisco Xavier Malcata (Universidad Católica Portuguesa)
José Martínez Peinado (Universidad Complutense de Madrid)
Margarita Medina Fernández-Regatillo (INIA)
María Ángeles Mosso Romeo (Universidad Complutense de Madrid)
Manuel Núñez Gutiérrez (INIA)
Juan Antonio Ordóñez Pereda (Universidad Complutense de Madrid)
Miguel Prieto Maradona (Universidad de León)
Ana Rodríguez González (IPLA, CSIC)
Vicente Sanchis Almenar (Universitat de Lleida)
Juan Evaristo Suárez Fernández (Universidad de Oviedo)
Jesús Ventanas Barroso (Universidad de Extremadura)

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente

Francisco Javier Carballo García

Vicepresidenta

M^a Inmaculada Franco Matilla

Secretario

Juan Antonio Centeno Domínguez

Tesorera

Sidonia Martínez Suárez

Vocales

Silvia Delgado Alonso
María del Camino García Fontán
Juan José Gómez Fernández
José Manuel Lorenzo Rodríguez
José Martínez Grande
María Villar Suárez

PROGRAMA

DOMINGO 10 DE SEPTIEMBRE

16.00-20.00 Recogida de documentación en la sede de la Secretaría del Congreso.

20.00 Recepción en la Universidad.

LUNES 11 DE SEPTIEMBRE

9.00-11.00 Inauguración Oficial.

Conferencia inaugural: **Virus entéricos en moluscos bivalvos: un reto en seguridad alimentaria**

Dr. Jesús López Romalde, Universidad de Santiago de Compostela.

11.00-11.30 Pausa-café

11.30-13.30 **Mesa redonda I**

PREDICCIÓN DE LA SEGURIDAD SANITARIA DE LOS ALIMENTOS HIGIENIZADOS Y ESTERILIZADOS.

Moderador: Dr. Santiago Condón Usón, Universidad de Zaragoza.

Modelos predictivos

Dr. Enrique Palou García, Universidad de las Américas, Puebla, México.

Modelización de la inactivación microbiana por tecnologías tradicionales

Dr. Pablo Fernández Escámez, Universidad de Cartagena.

Modelización de la inactivación microbiana por nuevas tecnologías

Dr. Javier Raso Pueyo, Universidad de Zaragoza.

13.30-14.30 **Sesión de posters I/Sesión informativa de la Comisión de Normalización y Validación (CNV)**

14.30-16.00 Almuerzo

16.00-18.00 **Mesa redonda II**

EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS.

Moderador: Dr. Miguel Prieto Maradona, Universidad de León.

Industrial Microbiological Risk Assessment - Some case Studies

Dr. Phil Voysey, The Microbiology Department, Campden & Chorleywood Food Research Association, Station Road, Chipping Campden, Gloucestershire, U.K.

La aplicación de la evaluación de riesgos microbiológicos realizada por JEMRA en la toma de decisiones a nivel internacional

Dra. María Lourdes Costarrica, Food Quality and Standards Service, Food and Nutrition Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Evaluación de riesgos sobre peligros biológicos en la Unión europea

Dra. Marta Hugas, Scientific Co-ordinator BIOHAZ Panel, European Food Safety Authority (EFSA).

18.00-19.00 **Sesión oral I**

19.00 Recepción en el Excmo. Ayuntamiento de Ourense / Visita a la ciudad.

MARTES 12 DE SEPTIEMBRE

9.00-11.00 **Mesa redonda III**

FÁBRICAS CELULARES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

Moderador: Dr. Francisco Xavier Malcata, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.

Extremophiles as cell factories

Dr. Antonio Ventosa, Universidad de Sevilla.

Production of biological ingredients by bacteria

Dr. Jeroen Hugenholtz, NIZO, Holanda.

Microalgae as a source of ingredients for consumer products

Dra. Ana Carvalho, Escola Superior de Biotecnología, Porto, Portugal.

11.00-11.30 Pausa-café

11.30-12.30 **Sesión oral II/Workshop** -*Solución para los patógenos alimentarios: Sistema BAX. Al alcance de la Industria.*-

12.30-13.30 **Sesión de posters II**

13.30-14.30 Asamblea Socios SEM

14.30-16.00 Almuerzo

16.00-17.00 **Sesión de posters II / Workshop** -*Parte 1: "Phenotypic Microarrays" de BIOLOG : Nueva tecnología de alto rendimiento para la evaluación de las relaciones genotipo-fenotipo y Parte 2 : Sistemas de expertisis para la identificación microbiana y fungica.*-

17.00-22.00 Visita guiada a la provincia de Ourense

22.00 Cena de clausura

MIÉRCOLES 13 DE SEPTIEMBRE

9.00-11.00 **Mesa redonda IV**

LA PREVENCIÓN Y CONTROL SANITARIO DE LAS TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS.

Moderador: D. José Ignacio Arranz Recio. Director Ejecutivo de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

Programas de control sanitario de las industrias de alimentación

D. Jesús Martín Ruiz. Jefe de Área de Veterinaria y Salud Pública. Subdirección General de Coordinación de Alertas Alimentarias y Gestión del Control Oficial. Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

Protocolos de actuación sanitaria frente a los brotes de enfermedades de origen alimentario

Doña Odorina Tello. Directora del Centro Nacional de Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

La prevención y control sanitario de las toxiinfecciones alimentarias: el modelo de Galicia

D. Xurxo Hervada Vidal. Subdirector Xeral de Epidemiología e Sistemas de Información. Dirección Xeral de Saúde Pública. Consellería de Sanidade. Xunta de Galicia.

11.00-11.30 Pausa-café

11.30-12.30 **Sesión oral III**

12.30 Conferencia final: **Las bacterias lácticas: ¡¡ Están para comérselas !!**
Dr. Juan Evaristo Suárez Fernández, Universidad de Oviedo.

Entrega del Premio al mejor poster

Entrega del Premio a la mejor comunicación oral

Clausura

CONFERENCIA INAUGURAL
MESAS REDONDAS
CONFERENCIA DE CLAUSURA

CONFERENCIA INAUGURAL

VIRUS ENTERICOS EN MOLUSCOS VBIVALVOS: UN RETO EN SEGURIDAD ALIMENTARIA

Jesús L. Romalde

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela.

La importancia creciente de los moluscos como proteína de consumo, junto con la estabilización de la producción pesquera mundial, ha llevado a un desarrollo importante de este campo de la Acuicultura. En los últimos años, y debido al amplio mercado de este producto, no sólo se ha incrementado notablemente el volumen de producción de moluscos bivalvos en nuestro país, si no que ha aumentado también la cantidad de importaciones, tanto intracomunitarias como procedentes de terceros países. El incremento en el consumo conlleva un problema sanitario asociado, ya que en el medio acuático, donde se desarrollan estos organismos, se pueden encontrar más de 100 especies distintas de virus infecciosos para el ser humano, que normalmente se transmiten vía fecal-oral y que se denominan genéricamente “virus entéricos”.

La contaminación viral de los moluscos

La prevalencia de los virus entéricos en el ambiente atiende a varias causas, pero fundamentalmente a la contaminación humana por aguas fecales, ya que las partículas virales son vertidas al medio en las heces de los individuos afectados, donde se encuentran en elevadas cantidades y a la contaminación de origen animal. A través de aguas residuales y de vertidos difusos, estos virus acceden a todo tipo de aguas superficiales, donde representan un serio riesgo sanitario.

Los moluscos son organismos filtradores habiéndose demostrado que el flujo que atraviesa su tracto digestivo puede alcanzar los 20 litros en una hora. Como consecuencia de este flujo se retienen todo tipo de partículas sólidas, muchas de las cuales son flóculos sedimentarios que pueden transportar partículas virales adheridas, o bien partículas virales libres. Así, los moluscos actúan a modo de concentradores virales naturales. Aunque esta bioacumulación es pasiva (los virus entéricos no se multiplican en el interior del molusco), las partículas víricas se pueden acumular en diferentes órganos y tejidos del molusco donde permanecen estables durante largos periodos de tiempo. El hecho de que muchos de estos moluscos se consuman crudos o sólo mínimamente cocinados es una de las causas de que estas partículas virales lleguen perfectamente viables a los consumidores y sean capaces de producir enfermedad.

Todo lo anteriormente descrito explica por que estos organismos filtradores actúan a modo de vectores en la transmisión de enfermedades como hepatitis infecciosa, causada por el virus de la hepatitis A (HAV), gastroenteritis (principalmente causadas por Norovirus [NV]), etc. Este hecho está, además, potenciado por el crecimiento de moluscos en áreas típicamente contaminadas por la influencia del hombre, lo cual implica un riesgo serio para la salud pública y la necesidad de una vía de prevención de esta transmisión.

Generalmente los moluscos asociados a los brotes y epidemias virales, provienen de zonas contaminadas, pero no es infrecuente que procedan de áreas de agua de “buena calidad”, según las exigencias sanitarias actuales que incluyen para aguas de cultivo de

moluscos, únicamente normativas en cuanto al número de *Escherichia coli*. Por ello, una de las líneas de investigación que más se ha potenciado se dirige al desarrollo de técnicas para una detección viral eficaz, tanto a partir agua y sedimentos como de tejidos de organismos.

Control sanitario

Como ya se ha comentado, la normativa europea en vigor sobre control sanitario de moluscos destinados a consumo se basa en la determinación de los niveles de *E. coli* presentes en carne y líquido intervalvar. Según los criterios de los Reglamentos del Consejo de las Comunidades Europeas de 2004 (852/2004, 853/2004 y 854/2004), la calidad sanitaria de los moluscos se fija según una clasificación de las zonas de producción en función del número de *E. coli*, de la siguiente forma: i) Zonas A: para consumo humano directo. Moluscos con menos de 230 *E. coli* por 100 g de carne y líquido intervalvar; ii) Zonas B: Moderadamente contaminados, moluscos con menos de 4600 *E. coli* por 100 g de molusco. Sólo se pueden destinar a consumo después de tratamiento en un centro de depuración o tras su reinstalación en una zona A; y iii) Zonas C: Fuertemente contaminados, moluscos con menos de 46000 *E. coli* por 100 g de carne y líquido intervalvar. Se podrían destinar a consumo tras un largo período de reinstalación en una zona limpia.

Sin embargo, diversos trabajos han demostrado que no existe una buena correlación entre la presencia viral y bacteriana, siendo la persistencia viral mucho más elevada que la bacteriana, tanto en moluscos, como en el medio ambiente. Por tanto, el uso de *E. coli* como indicador de presencia viral no es fiable.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha realizado diferentes estudios sobre la prevalencia de diferentes virus entéricos en poblaciones naturales y cultivadas de moluscos en Galicia (NO España). Los análisis realizados mostraron que no existía correlación entre la contaminación bacteriana y viral. Únicamente pudo encontrarse dicha relación en áreas muy contaminadas, normalmente asociadas a zonas con elevada concentración de población. Los resultados obtenidos en estos dos estudios son similares a los descritos por otros autores, e indican la necesidad de utilización de nuevos indicadores más fiables o bien de realizar análisis específicos de contaminación viral. En este sentido, es importante señalar que en los reglamentos antes mencionados se recoge la necesidad de estandarización de metodologías adecuadas para el control virológico de moluscos bivalvos, así como su futura inclusión en las normativas.

Depuración

El método tradicional utilizado para prevenir la posible contaminación bacteriana o viral de moluscos es el de depuración, consistente en la colocación del molusco en agua no contaminada o limpia durante 48 horas como término medio, se basa en capacidad autopurgante de los moluscos por sus características de organismos filtradores. Un gran número de trabajos publicados en los últimos años han demostrado que las reducciones en el número de bacterias (*E.coli*) y virus (particularmente HAV) tras el proceso de depuración no están muy relacionadas. Teniendo esto en cuenta, parece que la efectividad de la depuración necesita ser evaluada por separado para cada grupo de patógenos.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo estudios comparativos de las dinámicas de depuración de diferentes microorganismos en mejillón, incluyendo *E. coli* y bacteriófagos RNA F+, como ejemplo de microorganismos indicadores, y los virus HAV y NV. Los resultados mostraron la falta de correlación entre los niveles de *E. coli* y bacteriófagos, así como entre los niveles de ambos indicadores y la presencia viral, lo que indica la existencia de dinámicas de eliminación diferentes y la necesidad de más estudios para determinar las condiciones idóneas del proceso de depuración para que pueda asegurarse un producto de calidad virológica destinado a consumo. Además, se ha observado que en algunos casos se incrementaban los niveles de contaminación tras el proceso de

depuración, lo que puede deberse a malas prácticas operacionales durante el mismo. Es necesario por tanto un mayor control del funcionamiento de las plantas depuradoras de moluscos.

Papel de las importaciones y otras operaciones comerciales en la transmisión de virus entéricos

En los últimos años se ha demostrado la importancia de las operaciones comerciales internacionales en la transmisión de patógenos asociados al consumo de determinados alimentos. Un buen ejemplo de la implicación de estas operaciones en la aparición de brotes epidémicos es el brote de hepatitis A ocurrido en España que ha podido asociarse al consumo de almejas coquinas (*Donax* sp.) importadas de Perú, que es una zona endémica para esta enfermedad. Los primeros casos del brote se registraron en Septiembre de 1999 y se dio por finalizado a finales del mismo año. El número de personas afectadas fue de 188, todas en la Comunidad Valenciana, en las que se observaron varios casos de gastroenteritis, vómitos, dolores abdominales y fiebre. Los análisis virológicos realizados mediante métodos moleculares a partir de tejidos de las almejas implicadas demostraron la presencia del HAV en el 75% de las muestras. En base a estas evidencias, las autoridades sanitarias autonómicas y estatales procedieron a la inmovilización de 176 Tm de coquinas en la Comunidad Valenciana y de 12,5 Tm en el resto de España.

A partir del brote de hepatitis A ocurrido en la Comunidad Valenciana, y pese a no existir legislación al respecto, las autoridades sanitarias españolas adoptaron como medida preventiva el análisis sistemático de las importaciones de moluscos, principalmente almejas (*Donax* sp. y *Tapes* sp.) y zamburiñas (*Argopecten* sp.), para la detección del HAV. Nuestro laboratorio en la Universidad de Santiago realizó entre noviembre de 1999 y mayo de 2001 el análisis virológico específico para el virus de la hepatitis A de un total de 16 importaciones de moluscos bivalvos procedentes de Sudamérica llegadas a distintas Comunidades Autonómicas españolas. Además, se analizaron las muestras inmovilizadas en la Comunidad Valenciana asociadas con el brote de hepatitis A ocurrido en septiembre de 1999. De las 16 importaciones analizadas, en 3 de ellas se demostró la presencia del HAV mediante la técnica de RT-PCR (amplificación del ácido nucleico viral extraído de tejidos de molusco) combinada con hibridación de los productos de amplificación con sondas específicas para el virus. De estas importaciones, dos se correspondieron con lotes de almeja fina mientras que la tercera consistía en un envío de vieira. Por otro lado, el análisis de las muestras pertenecientes a las partidas de almeja inmovilizadas asociadas con el brote epidémico de Valencia reveló que el 50% de las mismas estaban contaminadas con el HAV, lo que constituye una nueva evidencia de que el origen del brote fueron, efectivamente, estas almejas importadas.

Es importante mencionar que todas estas importaciones consistían en moluscos congelados, proceso de conservación que en principio podría eliminar algunos microorganismos. Sin embargo, en el caso de los virus entéricos, y concretamente del HAV, este proceso prácticamente no presenta ningún efecto debido a la elevada resistencia a la congelación (las partículas virales permanecen estables dentro de los tejidos del molusco).

Métodos de detección

Los procedimientos clásicamente empleados para la detección de virus en muestras clínicas, como el uso de cultivos celulares o los métodos serológicos, presentan grandes limitaciones para su utilización en la detección de virus a partir de muestras de moluscos o de aguas de cultivo. Estos métodos no poseen suficiente sensibilidad para detectar bajas concentraciones virales (que pueden ser suficientes para ocasionar un brote epidémico) y, además, muchos de estos virus no son cultivables "in vitro".

Actualmente, los métodos clásicos se reemplazan por otras técnicas más sensibles, disponibles gracias al desarrollo biotecnológico, como son el uso de sondas marcadas de ácidos nucleicos o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El desarrollo y

perfeccionamiento de estas técnicas tiene como objetivo un control rutinario de la calidad virológica, superando las dificultades de detección de estos virus, si bien tienen la desventaja de ser métodos puramente cualitativos, es decir, que sólo permiten determinar la presencia/ausencia de contaminación. En los últimos años existe una tendencia al desarrollo de métodos cuantitativos, como la PCR en tiempo real, que permitirán no sólo la detección de un determinado tipo viral en las muestras de moluscos, sino determinar el número de partículas virales presentes en una muestra. La posibilidad de cuantificación abre las puertas a la posible inclusión de estos métodos en la legislación, tras determinar la dosis infectiva de cada uno de los patógenos virales y, por consiguiente, los límites admisibles para cada uno de ellos. Todo ello proporcionará un nivel de seguridad de cara a la salud pública, previniendo la transmisión de este tipo de virus.

Consideraciones finales

La transmisión de virus entéricos al hombre puede ser minimizada si se establece y estandariza un control virológico de los moluscos destinados a consumo, tanto en lo que se refiere a las áreas de cultivo de estos organismos como en la etapa de puesta en el mercado.

En este sentido, la inclusión de dicha posibilidad en los Reglamentos actuales de la Unión Europea constituye el primer paso para poder erradicar un importante problema de la Salud Pública, que redundará, asimismo, en un beneficio para el sector de la Acuicultura.

MESA REDONDA I

PREDICCIÓN DE LA SEGURIDAD SANITARIA DE LOS ALIMENTOS HIGIENIZADOS Y ESTERILIZADOS

Moderador: *Dr. Santiago Condón Usón, Universidad de Zaragoza.*

MODELACIÓN, PREDICCIÓN Y VALIDACIÓN DEL CRECIMIENTO, INACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS: ESTADO DEL ARTE Y PERSPECTIVAS

Enrique Palou

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas, Puebla. Cholula,
Puebla 72820. México. enrique.palou@udlap.mx*

La microbiología predictiva une a la microbiología e ingeniería de alimentos con matemáticas y estadística a fin de proveer descripciones y predicciones del comportamiento microbiano en sistemas alimenticios. La microbiología predictiva puede ser utilizada para modelar el crecimiento, supervivencia y/o muerte de microorganismos en función de los principales factores de conservación de alimentos. Especialmente cuando estos factores son utilizados de manera conjunta. La modelación en microbiología de alimentos no es nueva. Sin embargo, el mérito primordial de la microbiología predictiva es que con relativamente pocos datos bien utilizados y correctamente validados se pueden predecir nuevas situaciones. La microbiología predictiva puede proveer de manera rápida, información necesaria para la toma de decisiones en el análisis de riesgos, aseguramiento de la calidad, desarrollo de productos y procesos, análisis de datos y la planeación de ensayos de laboratorio.

La conservación de alimentos se basa en la inactivación de microorganismos o en el retraso y prevención de su crecimiento, por lo tanto los métodos de conservación utilizados operan a través del manejo de los factores que controlan o definen el crecimiento y/o supervivencia de los microorganismos. Un gran número de factores afecta el crecimiento microbiano, sin embargo se pueden destacar algunos de los más importantes en términos de la respuesta microbiana ante variaciones en ellos. Entre estos factores se encuentran, el pH, la actividad de agua del medio, la temperatura, la presencia de inhibidores y la composición de la atmósfera. Cuando estos factores se utilizan de manera combinada en algún método de conservación de alimentos, la respuesta microbiana no puede predecirse sobre la base de la respuesta cuando un solo factor estaba presente, generalmente ocurren situaciones sinérgicas, por lo que se requiere de una menor intensidad de los factores cuando éstos se aplican en forma simultánea. Así por ejemplo es bien conocido el requerimiento de tiempo-temperatura para el tratamiento térmico de un alimento de bajo pH, o de baja actividad de agua. La microbiología predictiva surge como una respuesta a la necesidad de conocer el comportamiento microbiano ante situaciones de combinación de factores de preservación en distintos niveles de aplicación y para distintos microorganismos.

La hipótesis en que se basa la microbiología predictiva es que la respuesta de los microorganismos a diversos factores de conservación es reproducible, se ve afectada por estos factores, y es posible predecirla a partir de observaciones hechas bajo condiciones

definidas y controladas. Estas observaciones pueden ser resumidas en forma de expresiones matemáticas, las cuales permiten predecir la respuesta microbiana ante condiciones no evaluadas, pero dentro del intervalo de los niveles de las variables estudiadas. El empleo de varios factores en la formulación de métodos de conservación de alimentos puede actuar de manera aditiva, sinérgica o antagónica sobre la inhibición/inactivación microbiana. La evaluación de la respuesta microbiana bajo estas combinaciones de factores permite la descripción, modelación y predicción del comportamiento microbiano en alimentos. Mundialmente se ha enfatizado la generación de modelos predictivos de la respuesta de microorganismos patógenos, especialmente bacterias y particularmente aquellas relacionadas con infecciones e intoxicaciones. Los modelos generados y reportados en la literatura predicen la respuesta de estos patógenos bajo diferentes condiciones ambientales. Si bien es importante conocer la respuesta de microorganismos patógenos, es también de suma importancia conocer la respuesta de algunos microorganismos deteriorativos relacionados con la descomposición microbiana de alimentos. Son muy pocos los reportes en donde se describa, modele y prediga el comportamiento de microorganismos deteriorativos. Al contar con modelos para ambos tipos de microorganismos, los modelos predictivos serían extensivos y comprensivos para aquellos microorganismos importantes en alimentos. Si se conociera la respuesta de diferentes microorganismos, patógenos y deteriorativos, bajo condiciones ambientales y composicionales comparables, entonces se podría elegir al microorganismo más resistente como el organismo “blanco” para esa combinación alimento-método de conservación.

Se han propuesto varias clasificaciones de los modelos en microbiología predictiva. Primeramente se clasifican en modelos mecanísticos y modelos empíricos aunque existen también los denominados modelos semi-mecanísticos. Otra clasificación utilizada es aquella en que existen modelos que describen el crecimiento y modelos que describen la inactivación microbiana. Dentro de estas categorías se encuentran modelos que pueden ser primarios, secundarios o terciarios. Los modelos primarios son aquellos que describen el cambio en la población microbiana en función del tiempo. Ejemplos de modelos primarios son la función de Gompertz para crecimiento exponencial, y los modelos de primer-orden para describir la inactivación térmica. Los modelos secundarios describen la respuesta microbiana en términos de los parámetros de los modelos primarios y del efecto de los cambios en las condiciones ambientales como pueden ser la temperatura, el pH, o la actividad de agua. Ejemplos de modelos secundarios son el modelo de Arrhenius y el modelo de la raíz cuadrada. Los modelos terciarios son rutinas de software para computadora que convierten a los modelos primarios y secundarios, en programas amigables para los usuarios. Estos programas calculan o predicen las respuestas microbianas en condiciones ambientales que no fueron inicialmente evaluadas y permite las comparaciones entre microorganismos, entre ambientes y por lo tanto permiten elegir a él o los microorganismos problemáticos o blanco de ataque en situaciones específicas de formulación-procesamiento-conservación de alimentos.

Las tendencias en microbiología predictiva han seguido dos caminos, los modelos cinéticos en donde se modela-predice la velocidad y alcance (límite) de crecimiento de microorganismos de interés; y los modelos probabilísticos en donde los modelos se han construido para predecir la “probabilidad” de un evento, que hasta hace poco había sido la germinación de las esporas bacterianas o la producción y concentración de toxina bacteriana producida después de un determinado periodo de incubación. Existe en la actualidad otra tendencia dentro de los modelos probabilísticos, que es el utilizar la regresión logística, en donde la respuesta del microorganismo se toma como binaria o dicotómica, crece o no crece, respuesta positiva o negativa. Con este enfoque se puede predecir la probabilidad de que el evento ocurra, es decir que el microorganismo se desarrolle, alcance un nivel determinado, produzca toxina, etc. Dado que los patógenos crecen en la mayoría de los alimentos, la pregunta primordial a responder es si los patógenos crecerán hasta un nivel significativo o importante antes de que la flora deteriorativa presente en alimento cause que el producto sea rechazado por el consumidor. Existe por lo tanto la necesidad de describir y por lo tanto modelar y poder predecir sistemáticamente el comportamiento de tipos representativos de microorganismos

deteriorativos a fin de que los modelos secundarios y terciarios puedan entonces comparar el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorativos y contestar a la pregunta planteada anteriormente. Para algunos de los patógenos que tienen muy bajas dosis infecciosas como lo son *Listeria*, *Yersinia* y *Clostridium botulinum*, el criterio debería ser crece/no-crece y la flora deteriorativa tendría poco significado a menos que su crecimiento reduzca el pH del medio y/o produzca una bacteriocina.

Se debe enfatizar que los modelos predictivos son, como su nombre lo indica, herramientas valiosas para hacer predicciones y son la base para establecer la planificación de programas como el de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP). Actualmente, como los modelos predictivos han evolucionado del laboratorio de investigación básica, a ser utilizados por la industria y las agencias reguladoras, se deben considerar como estimadores iniciales de la conducta microbiana y servir de guías por evaluar problemas potenciales. Los modelos predictivos NO reemplazan completamente la evaluación y comprobación del comportamiento microbiano, ni el buen juicio del microbiólogo experimentado. No es todavía posible depender solamente de los modelos para determinar la seguridad de los alimentos y su procesamiento. Las pruebas de laboratorio siguen siendo necesarias para determinar inequívocamente el destino de los microorganismos inicialmente presentes y/o el crecimiento, supervivencia o muerte de los patógenos que pueden relacionarse con el alimento. Sin embargo, los modelos pueden proveer información muy útil para la toma de decisiones durante la fabricación y conservación de alimentos en las siguientes situaciones: a) prever consecuencias de eventos fuera-de-proceso; b) identificar fallas en las cadenas de almacenamiento y/o distribución; c) ayudar a indicar y conocer las fechas de caducidad en términos de descomposición microbiana; d) identificar puntos críticos en programa HACCP; e) prever consecuencias de reformulaciones; f) funcionar como herramientas educativas; g) ahorrar recursos, tiempo y dinero ya que pueden reducir el trabajo de laboratorio, guiando los planes de pruebas de reto microbiano así como de ensayos de almacenamiento. Realizaremos una revisión crítica del estado actual en microbiología predictiva con miras a señalar oportunidades y necesidades de investigación.

MODELIZACIÓN DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA POR TECNOLOGÍAS TRADICIONALES

Pablo S. Fernández, Alfredo Palop, Paula M. Periago, Antonio Martínez¹

Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena. Unidad Asociada UPCT-IATA (CSIC).

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Valencia. Unidad Asociada UPCT-IATA.

La optimización y validación de los tratamientos térmicos es esencial para garantizar la seguridad (inocuidad) y estabilidad microbiológica de los alimentos, a la vez que se proporciona a los consumidores productos que satisfagan sus necesidades nutritivas y organolépticas. Los procesos de conservación térmica se han basado en que la inactivación de microorganismos sigue una cinética exponencial. Es decir, que el número de microorganismos viables se reducen exponencialmente con el tiempo de exposición a una temperatura letal, lo que se conoce como orden logarítmico de muerte.

En base a ello, se puede calcular el tiempo necesario para inactivar a la décima parte una población de células viables, lo que se conoce como valor D (tiempo de reducción decimal) y la variación de este valor con la temperatura de tratamiento, a través de las curvas de destrucción térmica o TDT, que proporcionan el valor z, que indica la resistencia relativa de un microorganismo a diferentes temperaturas (Stumbo, 1973).

Los procesos térmicos de los productos de baja acidez se han evaluado a nivel industrial en base a los valores F_0 , como tiempo de calentamiento equivalente expresado en minutos. Para ello, se ha de integrar de forma numérica o gráfica el acúmulo de letalidad durante el tratamiento térmico en el punto más frío del envase, considerando una temperatura de referencia de 121°C y un valor z de 10°C, característicos de las cepas proteolíticas de *Clostridium botulinum*, el patógeno de referencia de alimentos esterilizados de baja acidez. El registro de temperatura en el envase es la información clave para determinar el nivel de inactivación alcanzado y, por tanto, la estabilidad microbiológica del producto final. No obstante, no siempre están disponibles estos datos, ya que los sistemas de registro sólo se pueden situar en determinadas partes de los equipos de esterilización (autoclaves) y dan información de un solo punto, que podría no ser la mejor información de la transferencia de calor en el producto en su conjunto (Brown y col., 1984).

Por todo ello, para poder evaluar los procesos térmicos es necesario contar con una información lo más completa posible de todo el producto que se esteriliza, para lo que se debe evaluar la precisión y validez de los valores D y z de microorganismos capaces de sobrevivir a estos tratamientos y su eficacia para predecir el impacto del calor en condiciones industriales (con perfiles de calentamiento no isotérmico) sobre el nivel de seguridad y estabilidad microbiológica final alcanzada en el producto.

Existen numerosos ejemplos de microorganismos (esporulados o no) que siguen una cinética de inactivación exponencial, al menos durante varios ciclos logarítmicos (Figura 1). Aunque aparecen desviaciones de esta cinética, si se cumple la misma para una amplia fracción de la población microbiana, es posible emplearlos para la validación de los procesos térmicos aplicados mediante los cálculos clásicos. Si la desviación es importante (una proporción significativa de los microorganismos es resistente al tratamiento) la integración mediante valores D y z no sería adecuada, ya que no describiría la realidad biológica, lo que podría conducir a tratamientos insuficientes y no seguros. En este caso, es necesario encontrar otras herramientas de modelización (Periago y col., 2004).

Se ha llevado a cabo con éxito la validación de procesos de esterilización basados en valores D y z de microorganismos indicadores, correlacionándolos con procesos de

inactivación no isotérmicos que reproducen las condiciones de esterilización industriales (Tabla 1). Al aplicar condiciones no isotérmicas, se obtuvo una reducción de los recuentos de esporos muy próxima a las predicciones obtenidas, por lo que los cálculos proporcionaron una buena descripción del perfil de inactivación. En base a estos resultados, se puede concluir que la estimación de la supervivencia de los microorganismos basada en valores de F_0 que simulan los perfiles de calentamiento industriales pueden ser predichos de forma realista a partir de los datos isotérmicos (valores D y z). No obstante, para poder optimizar los procesos industriales es necesario contar con un microorganismo indicador adecuado, que siga una cinética de inactivación exponencial y que presente una resistencia térmica adecuada para la intensidad del tratamiento de esterilización en evaluación. Además, se deben establecer y conocer las limitaciones del empleo de un determinado microorganismo, es decir, a qué valores de pH, intervalo de temperaturas e intensidad de tratamiento en las que es útil, para evitar predicciones alejadas de la realidad.

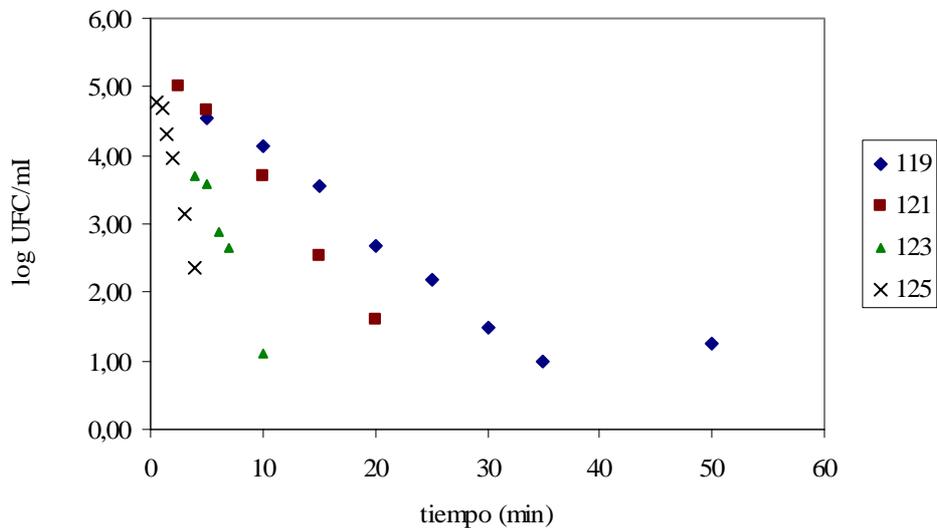


Figura 1. Curva de supervivencia de endosporos de *Bacillus sporothermodurans* IC4 en sopa, a las temperaturas de tratamiento indicadas.

Tabla 1. Perfil de calentamiento en condiciones no isotérmicas e integración de la letalidad equivalente, evaluado con endosporos de *Bacillus sporothermodurans* IC4 suspendidos en agua destilada.

Temp (°C)	Tiempo (min)	LOG UFC/mL	Predicción UFC/mL	F ₀ equivalente (min)
75	0	6,03		
95	7,69	5,61	5,85	0,00
115	15,38	5,79	5,80	0,24
117	16,15	5,85	5,76	0,43
119	16,92	5,64	5,69	0,76
121	17,69	5,40	5,57	1,36
123	18,46	5,19	5,36	2,41
123	20,46	4,26	4,65	5,97
123	22,46	3,35	3,94	9,52
123	24,46	2,15	3,23	13,08

Brown, K. L., C. A. Ayres, J. E. Gaze, and M. E. Newman. 1984. Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/algininate particles. *Food Microbiol.* 1:187-198.

Stumbo, C. R. 1973. *Thermobacteriology in Food Processing*. Academic Press, New York.

Periago, P.M., van Zuijlen, A., Fernández, P.S, Klapwijk, P.M., ter Steeg, P.F., Corradini, M. G. y Peleg, M. 2004. Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data. *Int.J. Food Microbiol.* 95: 205-218.

MODELIZACIÓN DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA POR NUEVAS TECNOLOGÍAS

Javier Raso Pueyo

*Área de Tecnología de los Alimentos. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza.*

El principal objetivo de la industria alimentaria es introducir en el mercado alimentos seguros y que respondan a las demandas de los consumidores. El procedimiento más efectivo de garantizar la calidad y seguridad de los alimentos es utilizar materias primas de elevada calidad microbiológica y nutritiva y evitar las posibles contaminaciones que se pueden producir durante su procesado y distribución. Sin embargo, la enorme cantidad de potenciales fuentes de contaminación microbiana imposibilita la prevención del acceso de los microorganismos a los alimentos y provoca que sea necesario el empleo de procedimientos para el control de su crecimiento o para su inactivación.

Aquellos procesos de la industria alimentaria que causan la inactivación de los microorganismos juegan un papel determinante para garantizar la seguridad y estabilidad de los alimentos. A pesar de las indudables ventajas de los sistemas de conservación basados en la destrucción de los microorganismos, el tratamiento térmico es, prácticamente, el único método utilizado por la industria alimentaria con este propósito. Sin embargo, el calor, además de inactivar a los microorganismos y a otros agentes de alteración como los enzimas, afecta a las propiedades sensoriales y nutritivas de los alimentos. Debido a estos negativos efectos, algunos alimentos procesados térmicamente no cumplen con las expectativas de los consumidores actuales, que demandan alimentos en los que el procesado apenas afecte a sus características originales.

En los últimos años, se han investigado numerosas tecnologías alternativas a los tratamientos térmicos. Todas ellas tienen en común su capacidad para inactivar las formas vegetativas de los microorganismos a temperaturas inferiores a las utilizadas para el procesado térmico de los alimentos. De entre ellas, los pulsos eléctricos de alto voltaje y las altas presiones hidrostáticas son las más prometedoras como alternativa a la pasteurización térmica de los alimentos. Su capacidad para inactivar microorganismos sin afectar a las propiedades de algunos alimentos ha sido demostrada. Sin embargo, su aplicación industrial requiere solucionar una serie de obstáculos tanto tecnológicos como relacionados con la seguridad microbiológica de los alimentos procesados.

Las nuevas tecnologías de inactivación microbiana tienen que garantizar un nivel de seguridad de los alimentos similar o superior al que se obtiene con los métodos tradicionales de procesado. Por lo tanto, el objetivo de la pasteurización de los alimentos por estas tecnologías debe ser inactivar todos los posibles microorganismos patógenos que potencialmente puede vehicular el alimento y reducir la carga de los microorganismos alterantes con objeto de prolongar el tiempo de conservación. Para conseguirlo, es imprescindible cuantificar la inactivación de los microorganismos, tanto patógenos como alterantes, de interés en los alimentos con el fin de establecer los parámetros que aseguren que el producto procesado cumple con los requisitos establecidos por las autoridades sanitarias.

La microbiología predictiva es una herramienta fundamental para cuantificar la inactivación microbiana. El cálculo de la intensidad de los tratamientos térmicos en la primera mitad del siglo pasado fue la primera aplicación de la microbiología predictiva en la industria alimentaria. A partir de los estudios de la resistencia al calor de los microorganismos se establecieron las condiciones de procesado que garantizan la seguridad y estabilidad de los alimentos. A lo largo de los años, las garantías sanitarias que ofrecen los productos procesados térmicamente han demostrado la efectividad de estos

cálculos en la práctica. Por lo tanto, al igual que en el caso de los tratamientos térmicos, es necesario realizar un trabajo similar consistente en la obtención de datos sobre la resistencia microbiana a las nuevas tecnologías, la descripción de la cinética de inactivación por estos tratamientos y el desarrollo de modelos matemáticos que permitan predecir el comportamiento de los microorganismos durante su procesado.

Debido a que no existe una correlación entre la sensibilidad de los microorganismos al calor y a las nuevas tecnologías de inactivación, es necesario identificar las especies patógenas más resistentes que van a limitar la intensidad de los tratamientos. Por otro lado, como los mecanismos responsables de la muerte de los microorganismos por estas nuevas tecnologías son distintos a los del calor, es necesario la obtención de datos experimentales para establecer la influencia de los principales parámetros que caracterizan a estos tratamientos (presión, intensidad de campo eléctrico, etc.) así como de los factores medioambientales en la resistencia microbiana a las nuevas tecnologías de inactivación. Para el desarrollo de los modelos, estos datos experimentales deben de ser sólidos, no deben estar afectados por artefactos metodológicos y además deben ser repetibles.

En las primeras investigaciones sobre la capacidad de las nuevas tecnologías para inactivar a los microorganismos los datos, generalmente, fueron analizados, al igual que en el tratamiento térmico, considerando que la muerte seguía una cinética de primer orden. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que esta cinética se observa cuando las gráficas de supervivencia no atraviesan más de 3 o 4 ciclos logarítmicos. En aquellos estudios en los que se consigue mayor número de ciclos logarítmicos de inactivación las gráficas de supervivencia se suelen caracterizar por presentar una forma cóncava. Es decir, la velocidad de inactivación es más rápida en los primeros momentos, y posteriormente va disminuyendo a medida que se prolonga el tiempo de tratamiento. En la literatura, es posible encontrar distintas ecuaciones alternativas a la cinética de primer orden capaces de describir este tipo de gráficas de supervivencia. De entre todas ellas, recientemente una ecuación basada en la ecuación de Weibull es la más comúnmente utilizada debido a su sencillez y flexibilidad. Se trata de una ecuación con dos parámetros, el parámetro de escala, que está relacionado con la intensidad del tratamiento, y el parámetro de forma, cuyo valor depende de si la gráfica de supervivencia es cóncava, convexa o lineal. Este modelo, a diferencia de la cinética de primer orden que considera que todos los individuos de la población presentan la misma resistencia, asume la existencia de una distribución de resistencias dentro de la población microbiana. Sin embargo, esta distribución de resistencias no se ha demostrado experimentalmente por lo que su existencia no es más que una hipótesis sobre los mecanismos de inactivación. Este un aspecto que requiere más investigación con objeto de desarrollar modelos basados en los mecanismos responsables de la inactivación microbiana.

Para poder predecir la inactivación microbiana en un rango de condiciones de tratamiento es necesario desarrollar modelos secundarios que relacionen los parámetros de los modelos primarios con las condiciones de tratamiento. Un criterio a considerar a la hora de elegir un modelo primario para describir la inactivación microbiana es que permita desarrollar modelos secundarios sencillos a partir de los parámetros de este modelo primario. El modelo de Weibull presenta la ventaja frente a otros modelos primarios de poder establecer relaciones lineales entre los parámetros de tratamiento como la intensidad del campo eléctrico o la presión y el logaritmo del parámetro de escala del modelo. En estos casos, a partir de la inversa de la pendiente que relaciona estos parámetros es posible establecer un parámetro similar al parámetro z del tratamiento térmico que permite establecer como el cambio de presión o de intensidad del campo eléctrico afecta a la resistencia microbiana. Además, también se han desarrollado modelos secundarios mediante técnicas de regresión múltiple para relacionar como varían los parámetros del modelo con la intensidad del campo eléctrico y algún parámetro medioambiental como el pH del medio de tratamiento.

El objetivo de esta presentación es revisar los últimos avances realizados en el desarrollo de modelos matemáticos para predecir la inactivación microbiana mediante las

altas presiones hidrostáticas y los pulsos eléctricos de alto voltaje, dos de las nuevas tecnologías de inactivación microbiana que más se han desarrollado en los últimos años. En ella, se destacará la utilidad de la microbiología predictiva en el desarrollo de nuevos procesos para obtener alimentos seguros y de elevada calidad sensorial y nutritiva. Para ello, se mostrará como las predicciones de la letalidad de los tratamientos mediante nuevas tecnologías obtenidas a partir de los modelos matemáticos sirven para identificar las especies microbianas patógenas más resistentes y que son, por lo tanto, las que van a limitar la intensidad de los tratamientos. Se destacará como estos modelos permiten cuantificar la influencia de distintos factores sobre la resistencia microbiana a estas nuevas tecnologías. Finalmente, también se mostrará como la microbiología predictiva sirve para establecer tratamientos de letalidad equivalente sobre los microorganismos limitantes, aspecto fundamental para el diseño y construcción de equipos y para realizar análisis de costes para establecer aquellas condiciones de procesado más económicas que garanticen la seguridad del alimento.

MESA REDONDA II

EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS

Moderador: *Dr. Miguel Prieto Maradona, Universidad de León.*

“INDUSTRIAL MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT – SOME CASE STUDIES”

Phil Voysey & Keith Jewell

CCFRA, Station Road, Chipping Campden, Gloucestershire, U.K.

Carrying out a risk assessment as a formal process has been performed in a systematic way in disciplines such as Insurance, Nuclear Energy, and Engineering for some years, but it is only relatively recently been considered in Microbiology. One reason for this is that the hazard tends not to be a stable entity in microbiology, unlike other disciplines. Growth, death, spore-production and toxin-production are all activities, which require special techniques to incorporate them into the risk assessment.

This talk aims to give a brief description of the discipline of Microbiological Risk Assessment (MRA), and how it fits into the overall process of Risk Analysis. The talk will focus on how industry can make use of MRA and the differences between their approach compared to that of government

To this end, the presentation will describe two “Industrial Microbiological Risk Assessments” (IMRAs) performed over the last five years, as part of a CCFRA initiative to investigate and demonstrate the value of the MRA process to industry.

1. *C. botulinum* in modified atmosphere packed sliced chicken roll
2. *Salmonella* in dry powders

The authors experience is that IMRAs are qualitatively different in intent and execution from “governmental” MRAs, and the lessons learned are being incorporated into a revised version of the CCFRA guide to IMRA. (Voysey 2000)

One of the IMRAs described was “fully” quantitative, and one quantitative enough for its purpose. Although each IMRA was modelled upon the 2000 CCFRA guide, and thus on the Codex principles (Codex Alimentarius Commission 1999), none met all of the criteria of a Codex MRA. IMRAs do not estimate “the probability of an adverse health effect”, the Codex definition of risk. Instead, they estimate the presence and/or level of a hazard at some time before consumption. Consequently, in Codex terms they are not estimating risk. If anything, they are estimating exposure.

IMRAs address specific purposes, often much more specific than governmental MRAs; this makes them easier! Because they address relatively short term business needs, they are time and resource limited, often explicitly excluding generation of new data, and content to provide the best answer possible within the constraints.

Experience indicates that a formal, detailed, written, **Statement of Purpose** is essential. The Codex (Codex Alimentarius Commission 1999) Statement of Purpose step “may require a preliminary investigation phase”, which the authors address as an “**outline MRA**”. This includes a detailed definition of the scope, including a detailed process description,

probably summarised as a flow diagram. The outline MRA typically results in a reduced scope and a simplified flow diagram representing those steps to be studied in detail. For early steps, these characteristics are usually contamination frequencies and levels. For later steps, they are usually degrees of kill or growth. Depending on the specific objectives and the data available, it may be possible to estimate contamination relatively late in the process, and avoid detailed description and modelling of earlier steps.

For an IMRA, in contrast to a governmental MRA, the product and process are very specific, and there is often monitoring data directly relevant to the particular product and process. The availability of such data, and the specific objectives, directly controls the information collection and modelling needed.

1. ***C. botulinum*** in modified atmosphere packed sliced chicken roll

For the chicken roll process there was no monitoring data on initial contamination with *C. botulinum*, so this had to be estimated from the literature, with consequent high uncertainty in its application to this specific process.

Temperature-time data was available throughout the process, including heat penetration data during the important cook-cool step. This allowed detailed quantitative modelling of time-temperature histories.

The mathematical model of time to toxin production was based on a synthesis of work in the literature. The different literature models substantially agreed over the range in which there was data. There was substantial model uncertainty on the effect of atmospheric composition. There was no data on bacterial properties specific to this product, so parameters were estimated from the literature, with consequent large uncertainties. Monitoring data was available for most relevant product and process parameters, times, temperatures, pH, salt content etc.

Variability was assessed by Monte Carlo modelling. Uncertainty was assessed by a novel optimisation technique, using genetic algorithms. Uncertainty in absolute estimates of product safety was so large as to make the estimates largely useless. However, because the Statement of Purpose had emphasised the importance of differences, and this had been reflected in the computer modelling, the uncertainty in differences was much smaller.

The effects of specified changes in storage times and temperatures were shown to be small, allowing firm decisions that such changes were not justified.

The uncertainty in the effects of atmospheric composition was so large that even concentrating on differences did not adequately reduce the uncertainty in the effects of changes considered. The IMRA did not provide the information needed for a decision on this point. Although not specifically required, the IMRA demonstrated that the effects on safety of changes in salt levels would be large. This could be expected to influence product development.

2. ***Salmonella*** in dry powders

This IMRA addressed the handling of lactose, used as an ingredient in confectionery manufacture.

For comparison, granulated sugar (sucrose) was treated as an intrinsically low risk product, not requiring any special handling. In contrast, skimmed milk powder (SMP) needed high care procedures to reduce the risk to an acceptable level. Lactose is a sugar, like sucrose, but a milk derived product, like SMP. The IMRA was required to inform a decision on the handling of lactose. This would have substantial cost implications.

A great deal of monitoring data was available on the three processes considered, especially on times and temperatures. Some effort was spent describing the processes and their variations, and collecting relevant data. However, as the iterative process elaborating the Outline MRA and further detailing the Statement of Purpose proceeded, it became clear that only one stage of each process needed to be studied in this IMRA.

Sucrose was intrinsically safe because, even if salmonellae were present, after a very short period of storage, they could not be recovered. SMP required high care because, if it were contaminated with salmonellae, the bacteria could survive for long periods, and could infect the consumer.

The difference between sucrose and SMP, justifying the difference in handling, was in the difference in risk associated with the handling regimes. Sucrose was intrinsically low risk, and would have a similarly low risk whether subject to a high care regime or not. SMP would have a substantially higher, probably unacceptable, risk if not treated as high care. With respect to lactose, the IMRA was required to clarify that difference.

The effect of a high care categorisation was simply to reduce the risk of contamination after production, during storage and transport.

The question became simple, if salmonellae contaminated lactose, could they be recovered after a short period of storage. If so, removal of a high care regime would increase the contamination frequency, and thus the risk. If not, additional contamination consequent on removal of the high care regime would not result in increased risk.

Conclusions

- Neither of these IMRAs would be considered as MRAs by a strict reading of the Codex guideline; neither estimated effects on health. This is a common feature of IMRAs.
- Neither of these IMRAs used a quantitative dose-response model, although in each case some model was implicit.
- The chicken roll IMRA included steps representing purchase and consumer transport and storage, but this was purely formal, not pretending to be an accurate representation. The scope of the dry powders MRA stopped at use of the ingredient by the confectionery manufacturer! Neither IMRA included consumption. This much reduced scope is a common feature of IMRAs.
- The omissions from a “Codex MRA”—dose-response, consumer behaviour— result in a much reduced uncertainty
- We have indicated that none of our IMRAs are fully compliant with a Codex MRA, however the Codex guide provides an invaluable structure.

References

- Codex Alimentarius Commission. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. CAC/GL-30. 1999. Tertiary Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. CAC/GL-30.
- Voysey, P.A. 2000. "Guideline No. 28. An introduction to the practice of microbiological risk assessment for food industry applications." *Campden & Chorleywood Food Research Association*.

RESULTADOS DE LAS CONSULTAS MIXTAS FAO/OMS DE EXPERTOS SOBRE EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS (JEMRA) Y SU APLICACIÓN EN LA GESTIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS A NIVEL INTERNACIONAL

Maria de Lourdes Costarrica y Sarah Cahill

Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias, Dirección de Nutrición y Protección del Consumidor, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia.

Las JEMRA desempeñan funciones de asesoramiento científico basado en los riesgos en relación con peligros microbiológicos en los alimentos, destinadas principalmente a atender las necesidades relacionadas con las actividades de gestión de riesgos del Codex Alimentarius, órgano encargado de establecer normas internacionales en el sector de la inocuidad y la calidad de los alimentos. Tal asesoramiento científico se ofrece también libremente para su uso y aplicación por los países miembros, en particular aquellos que no se encuentran en condiciones de emprender sus propias evaluaciones científicas. Si bien las JEMRA se iniciaron apenas en el año 2000, hasta la fecha han emprendido evaluaciones de riesgos sobre una variedad de patógenos bien conocidos, a saber, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. y *Vibrio* spp. y más recientemente sobre el peligro microbiológico emergente, *Enterobacter sakazakii*. Aunque, en realidad, el hecho de emprender una evaluación de riesgos plantea numerosos desafíos en cuanto a la disponibilidad de datos, el uso apropiado de los mismos, los enfoques respecto de los modelos utilizados, etc., tal vez un desafío todavía más fundamental es cómo utilizar los resultados de tal análisis y evaluación en profundidad para mejorar la forma en que abordamos los peligros que derivan de los alimentos. Esta cuestión ha constituido el tema de varias reuniones FAO/OMS de expertos. Para ilustrar la aplicación de la evaluación de riesgos, en este documento se presentan los resultados de dos evaluaciones de riesgos realizadas por las JEMRA, las relativas a *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo y a *Enterobacter sakazakii* en los preparados en polvo para lactantes, y se muestra cómo pueden utilizarse en el proceso de adopción de decisiones en materia de gestión de riesgos.

La evaluación de riesgos realizada por las JEMRA sobre *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo se centró en responder a tres preguntas específicas formuladas en el ámbito del Codex, en que se había venido trabajando durante varios años para elaborar directrices internacionales al respecto. Pero dado que se llegó a una situación de punto muerto en los trabajos, en particular sobre la cuestión de los criterios microbiológicos, se pidió que se emprendiera la evaluación de riesgos para ayudar a resolver la cuestión. La evaluación de riesgos tenía por objeto estimar el riesgo de enfermedad proveniente de *L. monocytogenes* para diferentes grupos de población así como el riesgo de enfermedad asociado con diferentes concentraciones del patógeno en los alimentos, además de las diferencias de riesgo relacionadas con los alimentos que favorecen la proliferación de *L. monocytogenes* en comparación con los que no la favorecen. La evaluación de riesgos se centró en cuatro alimentos listos para el consumo, en el intervalo desde el punto de venta al detalle al punto de consumo, ya que se consideró que este planteamiento era suficiente para proporcionar una respuesta al Codex, además de viable, teniendo en cuenta los recursos disponibles. Por lo que respecta a los resultados, la evaluación de riesgos proporcionó información sobre las susceptibilidades de diferentes grupos de población a la *L. monocytogenes* y concluyó que casi todos los casos de listeriosis derivan del consumo de una cantidad elevada del patógeno. Así pues, evitando que se formen elevadas concentraciones de contaminación en el punto de consumo es como se obtienen los mayores efectos en la reducción de la listeriosis. Se destacó también que la mayoría de los casos de listeriosis están relacionados con el consumo de alimentos que no

se ajustan a las normas actuales (p. ej. la ausencia de 100 ufc/g en 25 g, etc.) y se ilustró la función que desempeña la observancia de las normas vigentes en la reducción de riesgos. Este último aspecto constituye un buen ejemplo del tipo de información fácilmente accesible que pueden utilizar los gestores de riesgos para introducir cambios. Se subrayó asimismo que el debate relativo a los criterios aplicables a *L. monocytogenes* en los alimentos no debería referirse a cuáles criterios deben utilizarse, sino más bien a cómo asegurar la observancia de cualesquiera criterios que se establezcan.

El modelo de evaluación de riesgos de *E. sakazakii* se ha elaborado como instrumento para evaluar los efectos de los planes de muestreo en la reducción de riesgos y proporcionar un medio para evaluar diferentes prácticas de preparación y utilización de preparados en polvo para lactantes, a fin de determinar su influencia sobre los riesgos. Por ejemplo, se ha observado que la modalidad con que se preparan los preparados en polvo para lactantes y las condiciones en que se utilizan varían ampliamente. Por otra parte, no es posible ni práctico esperar que los preparados se preparen en las condiciones óptimas para reducir los riesgos en todas las situaciones. Así, este modelo permite a los gestores de riesgos comparar muchas situaciones hipotéticas diferentes (hasta la fecha se han evaluado más de 200) para ver los efectos de las actuales condiciones de preparación sobre los riesgos y examinar las capacidades de reducción de riesgos de otras posibles condiciones viables.

Si bien el presente documento se centra principalmente en examinar en qué forma pueden utilizarse los resultados de las dos evaluaciones de riesgos mencionadas, cabe señalar que la evaluación de riesgos puede servir también para otros fines. Pueden incluirse entre ellos la clasificación de los riesgos y la identificación de los sectores en que es necesario realizar nuevas investigaciones científicas y sobre el terreno. El documento proporcionará asimismo algunos ejemplos de tales aplicaciones.

EVALUACIÓN DE RIESGOS SOBRE PELIGROS BIOLÓGICOS EN LA UE

Marta Hugas

*European Food Safety Authority, Scientific Panel on Biological Hazards,
Largo N. Palli 5/A, 43100 Parma – Italy
E-mail: marta.hugas@efsa.europa.eu*

El grupo de expertos científicos sobre peligros biológicos (BIOHAZ Panel) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria proporciona consejo científico a la Unión europea mediante evaluaciones de riesgo. El ámbito de actuación del Panel BIOHAZ abarca los peligros biológicos relacionados con la seguridad de los alimentos y las enfermedades de origen alimentario incluyendo las zoonosis de origen alimentario, las encefalopatías espongiformes transmisibles, microbiología de los alimentos, higiene alimentaria y gestión de residuos asociados. Desde la fundación de la EFSA y de sus grupos de expertos científicos hasta la actualidad (Mayo 2003- Mayo 2006), el Panel BIOHAZ ha emitido casi 50 dictámenes científicos basados en la evaluación de riesgos.

Dejando aparte los temas de BSE/TSE, los dictámenes en el ámbito del Panel de BIOHAZ podrían ser clasificados de acuerdo con los temas siguientes:

- Identificación de categorías de alimentos y/o de los procesos de fabricación y de preparación de alimentos que podrían poner en peligro la salud pública para un determinado peligro biológico: (e.g. *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. y *Campylobacter* in alimentos).
- La identificación de peligros microbiológicos para un alimento en concreto (e.g. riesgos microbiológicos en leches maternas y leches de continuación).
- La Evaluación de métodos de inspección carnica con vistas a su posible simplificación (e.g. revisión de procedimientos de inspección carnica para corderos, cabras y vacuno; especificaciones de congelación para la inactivación de cepas de *Trichinella* y *Cysticercus* tolerantes al frío).
- La evaluación de medidas de control y de mitigación del riesgo (e.g. efecto de los nitritos y nitratos en productos carnicos; ventajas y desventajas del lavado de huevos; ventajas y desventajas del posible uso de antimicrobianos y vacunas para el control de *Salmonella* en la pirámide de producción aviar).
- La evaluación de riesgo de un peligro a lo largo de la cadena alimentaria (e.g. *Salmonella* en la producción suina)
- La evaluación de riesgo como parte de autorizaciones de productos (e.g. evaluación de la eficacia de sustancias para su uso como descontaminantes de las superficies de productos de origen animal).
- La evaluación de riesgo de subproductos animales (e.g. la seguridad biológica del tratamiento térmico de abono).

El Panel BIOHAZ estructura y desarrolla sus dictámenes siguiendo las líneas guía establecidas por el *Codex Alimentarius* en los cuatro principios de la evaluación de riesgos: a) identificación de peligros, b) evaluación de la exposición c) caracterización de peligros y finalmente d) caracterización del riesgo. La mayoría de los dictámenes se basan en evaluaciones de riesgo cualitativas o semi-cuantitativas.

Actualmente, la EFSA esta preparando una estrategia en el área de la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos (QMRA) a nivel europeo teniendo en cuenta: i) las expectativas de las partes interesadas, ii) las ventajas y desventajas de la aplicación de QMRA a nivel Comunitario, iii) los recursos disponibles a nivel comunitario y en los

estados miembros y iv) las experiencias internacionales. Sin duda, el desarrollo de una estrategia para llevar a cabo QMRA a nivel de la Unión Europea (UE) es un reto cuando al mismo tiempo hay que tener en cuenta algunas dificultades como la necesidad de más tiempo y recursos, el riesgo de duplicar recursos y las diferentes situaciones geográficas y (e.g. hábitos nutricionales, productos locales y la variabilidad en prevalencias para un peligro concreto). La interacción efectiva entre los evaluadores del riesgo y los gestores del mismo es asimismo un factor esencial a tener en cuenta. Coordinación, comunicación, trabajo en equipo y la formulación de una pregunta clara y bien estructurada son entre otros los elementos claves para planear y llevar a buen término una buena evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos a nivel de la UE.

MESA REDONDA III

FÁBRICAS CELULARES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Moderador: Dr. Francisco Xavier Malcata, Universidade Católica Portuguesa,
Porto, Portugal

LOS MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS COMO FÁBRICAS CELULARES

M. C. Márquez y A. Ventosa

*Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/
Profesor García González, s/n, 41012 Sevilla. cmarquez@us.es*

Hasta hace algunos años, los científicos pensaban que la vida sólo podía existir en un número muy limitado de ambientes. Sin embargo, se han encontrado formas de vida en prácticamente todos los rincones del planeta que se han explorado. Actualmente se sabe que todos los ambientes considerados "inhabitables" por el ser humano son colonizados por otros organismos que son perfectamente capaces de adaptarse a esos nichos ecológicos (escasez de agua, altas temperaturas, frío, etc). Son los llamados organismos "extremófilos", los cuales no sólo toleran sino que, incluso, requieren para crecer condiciones físicas y químicas insoportables para los seres humanos y la mayoría del resto de los seres vivos.

En los últimos años los organismos extremófilos están siendo ampliamente estudiados, poniéndose de manifiesto que la diversidad taxonómica existente en dichos ambientes extremos no es tan reducida como se pensó en un principio (Ventosa y col., 1988). La mayoría de los extremófilos conocidos hasta el momento son procariotas pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*, aunque también existen algunos representantes eucariotas (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Los microorganismos extremófilos se clasifican en diferentes grupos en función de sus requerimientos para crecer de forma óptima. Uno de los grupos más interesantes desde el punto de vista biotecnológico son los termófilos, que son aquellos que crecen óptimamente a temperaturas superiores a los 45°C, y los hipertermófilos, con temperaturas óptimas superiores a los 80°C, como es el caso de *Pyrolobus fumarii*, que crece óptimamente a 106°C, pudiendo crecer hasta los 113°C. En la naturaleza, temperaturas tan altas sólo se encuentran en algunas áreas muy restringidas, que suelen estar asociadas, generalmente, a fenómenos volcánicos. Muchas fuentes termales tienen temperaturas próximas a la de ebullición del agua y las fuentes hidrotermales submarinas (fumarolas) pueden alcanzar los 150-500°C. Otros microorganismos, los psicrófilos, prefieren el frío, siendo capaces de crecer óptimamente en océanos cuya temperatura media oscila entre 1-3°C, como es el caso de la bacteria *Polaromonas vacuolata* con una temperatura óptima de crecimiento de 4°C, siendo incapaz de multiplicarse por encima de 12°C.

Otro grupo significativo de extremófilos son los halófilos, que viven en ambientes con elevada salinidad como suelos salinos, lagos salados y salinas. Estos microorganismos se caracterizan porque requieren para crecer NaCl, si bien el óptimo varía con el organismo; utilizándose los términos de halófilos débiles, moderados o extremos, para describir a los

halófilos con requerimientos bajos (1-3%), moderados (3-15%) o altos (15-30%) de NaCl, respectivamente (Kushner y Kamekura, 1988). Los microorganismos que habitan en estos medios están adaptados a la salinidad y normalmente también a una alcalinidad elevada.

Otros extremófilos de gran interés son los que habitan los medios ácidos o alcalinos, los acidófilos viven en hábitats con un pH inferior a cinco, mientras que los alcalófilos prefieren un pH superior a nueve. Los microorganismos alcalófilos se encuentran generalmente en hábitats muy básicos como lagos alcalinos y suelos muy carbonatados. Sin embargo, los procariotas alcalófilos mejor estudiados han sido bacterias aerobias no marinas, muchas de las cuales son especies del género *Bacillus*. También existen microorganismos capaces de soportar presiones atmosféricas muy altas, resistentes a elevadas concentraciones de metales, a altos niveles de radiación, o los microaerófilos, que toleran una pequeña cantidad de oxígeno (Van den Burg, 2003).

Los microorganismos extremófilos están estructuralmente adaptados a nivel molecular para sobrevivir y desarrollarse en estos ambientes extremos. Desde que se inició su estudio, los extremófilos han sido considerados como un grupo de organismos con un enorme potencial biotecnológico debido a su capacidad para producir una serie de compuestos, como proteínas, enzimas y solutos compatibles, entre otros, de gran interés en distintos tipos de industrias, tales como la de los alimentos, bebidas, detergentes, textil o papelera. Las enzimas producidas por estos microorganismos, llamadas extremoenzimas, funcionan bajo condiciones extremas (temperaturas extremadamente altas o bajas, o a pH muy ácidos o alcalinos, con altas concentraciones de sal, etc.). Debido a que muchos procesos industriales operan mejor a temperaturas elevadas, las extremoenzimas de los hipertermófilos están siendo estudiadas, cada vez más, como biocatalizadores en distintas aplicaciones industriales y también en muchas técnicas en la investigación que requieren enzimas. Ejemplos de enzimas termorresistentes y de gran importancia aplicada son las DNA polimerasas aisladas de los microorganismos termófilos *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus* o *Thermococcus litoralis*. Estas enzimas, conocidas como *Taq*, *Pfu* o *Tli* polimerasas, respectivamente, se usan para la automatización de los pasos repetitivos que tienen lugar en la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), una técnica muy importante para la amplificación de secuencias específicas de DNA. Además de estas enzimas, se han aislado y caracterizado proteasas, amilasas, celulasas, pululaninas y xilanasas extremadamente termoestables de varios hipertermófilos. Dichos biocatalizadores termorresistentes así como las extremoenzimas crioactivas de psicrófilos, las activas en presencia de altas concentraciones de sal, o las activas a pH alto o bajo, sin ningún género de dudas serán cada vez más utilizados en la industria, en situaciones en las que se requiera una actividad biocatalítica en condiciones extremas.

Los microorganismos halófilos constituyen otro grupo de extremófilos con un enorme potencial biotecnológico (Ventosa y Nieto, 1995). Además de su utilización en procesos industriales tales como el tratamiento de residuos, producción de bacteriorrodopsina, ectoína y otros solutos compatibles o de β -caroteno, poseen un amplio rango de posibles aplicaciones que están actualmente en desarrollo, tales como la producción de polisacáridos y enzimas extracelulares (Béjar y col., 1998; Mellado y col., 2005). Su participación en la elaboración de diversos alimentos fermentados ha sido menos estudiada, si bien se ha descrito la implicación de microorganismos halófilos en la elaboración de diversas salsas de soja y de pescado utilizadas frecuentemente en los países orientales.

La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria se obtienen a partir de organismos termófilos; sin embargo y a pesar de sus múltiples ventajas, la aplicación de estas enzimas está restringida debido a su inestabilidad en condiciones extremas de temperatura, pH o fuerza iónica. Por otro lado, el cultivo a gran escala de extremófilos presenta muchos inconvenientes debido a las condiciones de cultivo que requieren para crecer. Por este motivo, actualmente la mayoría de extremoenzimas utilizadas en la industria son recombinantes. Los genes que codifican estas enzimas se están expresando en hospedadores mesófilos, como es el caso de *E. coli*, que a su vez han sido modificados

genéticamente con el fin de optimizar la producción de las mismas (Cherry y Fidantsef, 2003).

A medida que se vaya comprendiendo mejor la fisiología, enzimología y bioquímica de estos organismos y se avance en el conocimiento de los mecanismos utilizados por los mismos para proteger sus estructuras celulares, se irán desarrollando nuevas metodologías que permitirán la producción de nuevas “extremo-moléculas” o bien la adaptación de las existentes a nuestras necesidades específicas, haciendo que los procesos biotecnológicos en los que los extremófilos o sus productos están implicados resulten más rentables.

Bibliografía

- Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C. & Quesada, E. 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strain of the species *Halomonas eurihalina*. *J. Biotechnol.* 61: 135-141.
- Cherry, J.R. & Fidantsef, A.L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 438-443.
- Kushner, D.J. & Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. *En: Halophilic Bacteria*, vol. I, F. Rodríguez-Valera (ed.). Boca Raton: CRC Press. pp. 109-140.
- Ventosa, A., Sánchez-Porro, C., Martín, S. & Mellado, E. 2005. Halophilic Archaea and Bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. *En: Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. N. Gunde-Cimerman, A. Oren & A. Plemenitas (eds.). Springer: Berlin. pp. 337-354.
- Rothschild, L.J. & Mancinelli, R.L. 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1101.
- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 213-218.
- Ventosa, A. & Nieto, J.J. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 85-94.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. & Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 504-544.

MICROALGAE AND FOODS

Ana P. Carvalho & F. Xavier Malcata

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal (apcarvalho@mail.esb.ucp.pt, fxmalcata@esb.ucp.pt)

“Microalgae” is a non-taxonomic term used to describe a diverse group of microscopic organisms - either prokaryotic (cyanobacteria) or eukaryotic (algae), usually photosynthetic, and unicellular or filamentous.

From an economic point of view, microalgae can be viewed as microorganisms able to “harvest the sun” and thus transform radiant energy into highly valuable products, at the expense of (theoretically) inexpensive natural resources. Indeed, they are able to synthesize, accumulate and excrete a large variety of metabolites using just water, carbon dioxide and mineral salts as nutrients, and light as energy source.

Interest in algal cultures began in the 50's - soon after the World War II, in attempts to devise inexpensive sources of protein able to replace those from animal sources, which were obviously difficult to obtain by the time. The advent of the oil crisis in the 70's led researchers to investigate microalgae also as sources of biomass for methane production; more recently, advances have been focused on the production of valuable chemicals taking advantage of their secondary metabolites.

The aforementioned evolution in goals relating to R&D in microalgae has thus addressed two major issues: (i) the need for alternative sources of some products, scarce because of political or economic causes; and (ii) the desire of more profitable biotechnological processes, with low production costs but high-added value products. However, the nature of those products has varied with time, in response to different market demands.

Microalgal biodiversity is paramount, with numbers between 200,000 and several million species, compared *e.g.* with only *ca.* 250,000 species of higher plants. Therefore, their potential applications are in principle rather diverse, ranging from biomass (with a market of about 5,000 t/yr of dry matter, able to generate a turnover of *ca.* 1.0×10^9 €/yr) to specific metabolites. Nowadays, a broad list of applications of microalgal cultures is described in the literature. In terms of food industry applications, the most important product of microalgal biotechnology (in volume and value) is still microalgal biomass itself. During the late decades 75% of microalgal biomass production was indeed used for the manufacture of powders, tablets or capsules. The main species in stake encompass *Spirulina*, *Chlorella* and *Dunaliella*. Algal biomass – following spray drying, sun drying or compression to form pastilles, is mostly sold for the human health food market. From the various attempts to explain the health-promoting effects of microalgae, the most likely is a general immune-modulating effect.

Microalgae are also used to produce valuable compounds employed in food industry such as functional ingredients; among those are food-colouring pigments (most of which also possess antioxidant activity) and polyunsaturated fatty acids. When compared with algal powders, functional foods produced with microalgal ingredients are much more attractive in sensory terms and putative diversity, since they combine both microalgal health benefits and attractiveness to the consumer; these products are explored below to some extent.

Food supplemented with microalgal biomass may have other positive influences such as prebiotic effects and mineral fortification. When the prebiotic effects of *Spirulina* biomass were investigated, both in a plain form and in a functional food application, results

revealed positive effects on intestinal bacteria, regarded as beneficial. All *Spirulina* strains stimulated the growth of various lactobacilli species, namely *Lactobacillus acidophilus*.

Polyunsaturated fatty acids

Of particular interest are omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3-PUFA), which obtained their name from the position of the double bond nearest to the methyl terminus of the molecule. Among the ω -3 family, two PUFA deserve particular attention, owing to their major role in the human body: the eicosapentaenoic acid (EPA) and the docosahexaenoic acid (DHA). DHA is an important structural fatty acid in such nervous tissues as the brain and the retina, whereas EPA has important inhibitory effects on platelet coagulation. Although these are not classified as essential fatty acids, certain human groups such as premature and ill people, are unable to synthesize them; even in normal people, due to age, smoking, alcohol intake and poor fitness habits, the enzymatic system does often malfunction, which leads to inadequate extents of biosynthesis. Accordingly, a direct intake of such fatty acids is generally recommended. Although fish is the most common source of those PUFA for incorporation in functional foods, it is not devoid of problems: fish oils exhibit strong odour and taste, as well as oxidative instability; there are also increasing concerns associated with limited and unpredictable supply, aggravated by the potential chemical contamination when harvest takes place in near-shore environments. All these factors have constrained the use of fish oil as a functional food ingredient, and have accordingly promoted search for alternative sources. In fact, and despite their relatively high content in those compounds, fish do not synthesize ω -3 PUFA to significant levels, but instead acquire them by eating zooplankton, which in turn had been previously fed with microalgae. Therefore, in order to circumvent these problems, microalgae have been claimed to be alternative sources: some microalgae are indeed rich in PUFA, and their content can, to a certain degree, be modulated by varying the culture conditions, thus allowing a more constant production rate, irrespective of weather conditions and geographical location.

Nowadays, a broad range of products artificially enriched in ω -3 PUFA is marketed by distribution chains, from fruit juices to meat, eggs, bread, pasta, cookies and milk. It is interesting to notice that the advent of these new sources of ω -3 PUFA brought about novel ways of incorporating such ingredients in foods: besides extracting and purifying microalgal oil through a procedure similar to that employed with fish oils, microalgae can also be used as a whole, since the oil is naturally encapsulated inside the cells. These dried whole-cells can be directly added to animal feed, thus contributing to the increase in the proportion of ω -3 PUFA in both the resulting meat and other animal products (*e.g.* eggs). This process offers several advantages, namely the reduction in processing costs, due to elimination of the expensive steps of extraction and purification of the oil, and the circumvention of legal restrictions regarding incorporation of fermentative-based ingredients in food products.

Food-colouring products

Although synthetic pigments traditionally used by food industry still continue on the rise, the increasing consumer preference for natural food additives has been changing this status. The major pigments produced by microalgae include chlorophyll *a*, *b* and *c*, β -carotene (a yellow pigment from *Dunaliella*), phycocyanin (a blue pigment from *Spirulina*), xanthophylls and phycoerythrin (a red pigment from *Porphyridium*). The industrial production of β -carotene and astaxanthin (using *Haematococcus*) are case studies of success. Apart from their colouring effect, these pigments also possess antioxidant properties, which enable the human body to mediate the harmful effects of free radicals, which are implicated in several diseases. β -carotene is one of the leading food colorants in the world, applied to a range of food and beverage products such as margarine, cheese, fruit juices, baked goods, dairy products, canned goods and confectionary.

References

- Carvalho, A.P.; Malcata, F.X. 2003. *Recent Res. Develop. Biotechnol. Bioeng.* 5: 1-11
- Carvalho, A.P.; Malcata, F.X. 1996. *World Ingrid.* March-April: 22-26
- Dufossé, L.; Galaup, P.; Yaron, A.; Arad, S.M.; Blanc, P.; Murthy, K.N.C.; Ravishankar, G.A. 2005. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 389-406
- Eonseon, J.; Polle, J.E.W.; Lee, H.K., Hyun, S.M., Chang, M. 2003. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 165-174
- Lorenz, R.T.; Cysewski, G.R. 2000. *TIBTECH* 18: 160-167
- Kay, R.A. 1991. *Critical Reviews Food Sci. Nutrition* 30: 555-573
- Margalith, P.Z. 1999. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 431-438
- Pulz, O.; Gross, W. 2004. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635-648
- Vilchez, C.; Garbayo, I.; Lobato, M.; Vega, J.M. 1997. *Enzyme Microbial Technol.* 20: 562-572
- Walker, T.L.; Purton, S.; Becker, D.K.; Collet, C. 2005. *Plant Cell Rep.* 24: 629-641

MESA REDONDA IV

LA PREVENCIÓN Y CONTROL SANITARIO DE LAS TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS

Moderador: *D. José Ignacio Arranz Recio. Director Ejecutivo de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.*

PROGRAMAS DE CONTROL SANITARIO DE LAS INDUSTRIAS DE ALIMENTACIÓN

Jesús Martín Ruiz

*Jefe de Área de Veterinaria de Salud Pública, Subdirección General de Coordinación de Alertas Alimentarias y Programación del Control Oficial
Agencia Española de Seguridad Alimentaria*

El objetivo de la nueva legislación alimentaria es el establecimiento de un alto nivel de protección de la salud de los consumidores, velando por la seguridad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria, lo que origina un planteamiento global integrado desde la producción al consumo (desde la granja a la mesa)

Para conseguir este objetivo la DG SANCO ha establecido una nueva base legal que es el Reglamento (CE) 178/2002 y una serie de reglas nuevas en concordancia con esta última norma que es el conocido como Paquete Higiene.

La citada norma establece que la responsabilidad principal del cumplimiento de la legislación alimentaria es de los operadores económicos. Estos tienen las siguientes obligaciones o preceptos que cumplir:

- Seguridad: Comercializar alimentos seguros
- Responsabilidad: Alimentos que se producen, transforman y distribuyen sean seguros.
- Trazabilidad: Identificar proveedores y clientes
- Transparencia: Informar a autoridades competentes si alimentos no son seguros
- Emergencia: Retirar alimentos no seguros
- Prevención: Tener bajo control los puntos críticos de sus procesos
- Cooperación: Con autoridades competentes para reducir riesgos

Para conseguir lo anteriormente citado tendrán que aplicar o adaptar los siguientes sistemas y análisis o medidas:

- Procedimiento basado en los principios de Análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC), con sus prerequisites.
- Cumplimiento de los criterios microbiológicos de los productos alimenticios

- Cumplimiento de requisitos relativos al control de temperatura de productos alimenticios
- Mantenimiento de la cadena del frío
- Usar procedimientos adecuados para alcanzar objetivos fijados
- Muestreo y análisis

En relación con los criterios microbiológicos el Reglamento (CE) 2073/2005 establece dos tipos de criterios, los de seguridad alimentaria que se aplica a los productos comercializados y los criterios de higiene del proceso.

Estos criterios son usados por el operador económico para verificar o validar los procedimientos basados en el APPCC y prácticas correctas higiénicas.

Por otra parte, las autoridades competentes tienen también obligaciones que se encuentran establecidas en los Reglamentos (CE) 178/2002 y 882/2004:

- Velar por el cumplimiento de la legislación.
- Controlar y verificar qué explotadores cumplen la normativa en todas las etapas.
- Información sobre la inocuidad y riesgos de alimentos.
- Mantener sistema de controles oficiales.
- Establecer sistema de controles oficiales.
- Establecer medidas y sanciones que sean efectivas, proporcionadas y disuasorias.
- Participación en los sistemas de alerta y crisis. La alerta es un sistema en forma de red para notificar riesgos directos o indirectos para la salud humana y que se deriven de alimentos. Se debe garantizar la salud del consumidor, la libre circulación de mercancías y no sustituye al control oficial.

Los controles oficiales tienen una serie de requisitos como son:

- Tienen que ser regulares, basados en los riesgos y con una frecuencia adecuada que dependerá de los riesgos identificados, historias de las empresas, fiabilidad de los autocontroles y datos de incumplimientos.
- Se extenderá a todas las fases de la cadena alimentaria.
- Sin previo aviso (salvo auditorias)
- No discriminatorias.

Las autoridades competentes encargadas del control oficial designadas según la fase de la cadena alimentaria, territorialidad y materia, deben garantizar:

- Eficacia y adecuación de los controles oficiales.
- El personal no debe tener ningún conflicto de intereses.
- Acceso a equipos adecuados, laboratorios, etc.
- Personal suficiente con cualificación y experiencia adecuada, lo que hace necesaria una formación adecuada y continuada (de partida, autoformación e institucional)
- Capacidad jurídica para efectuar controles y adoptar medidas adecuadas.
- Tener planes de emergencia.
- Los operadores están obligados a someterse al control oficial y asistir al agente de control oficial.

- Elaboración de informes de los controles.

Las diferentes técnicas de control utilizadas serán el control propiamente dicho, la vigilancia, la verificación, la inspección, la auditoria, el muestreo y el análisis.

Las actividades de control incluyen entre otros:

- Exámenes de los autocontroles, del operador económico
- Inspección de instalaciones, equipos, productos, materiales, etiquetado, condiciones de higiene
- Procedimiento APPCC, examen de las buenas prácticas de fabricación, prácticas correctoras de higiene
- Documentación escrita
- Entrevistas con los operadores de las empresas alimentarias
- Lecturas de los valores registrados por instrumentos de medición, etc.

Ante la aparición de resultados no conformes es necesario realizar medidas de ejecución como son entre otras:

- Procedimientos de saneamiento.
- Restringir o prohibir la comercialización.
- Recuperación, retirada o destrucción de los productos.
- Autorización para usos distintos.
- Suspensión de actividades y/o establecimientos.
- Sanciones administrativas y/o penales.

PROTOCOLOS DE ACTUACIÓN FRENTE A BROTES DE ENFERMEDADES DE ORIGEN ALIMENTARIO

Odorina Tello Anchuela

*Centro Nacional de Epidemiología.
Instituto de Salud Carlos III. Madrid.*

Introducción

En los últimos años distintos factores han sido señalados y relacionados con actividades humanas que nos han llevado a cambios ecológicos y microbiológicos a nivel mundial y han sido considerados como responsables de la emergencia de distintas enfermedades. Dentro de los factores de las enfermedades relacionadas con los alimentos se consideran: la tecnología y la industria, el comercio, los viajes internacionales y el desarrollo económico.

Todos estos factores inciden en los distintos momentos de la cadena alimentaria y pueden ser causa directa o indirecta de emergencia en diferentes momentos y estos pueden emerger en la producción primaria, en las prácticas de la agricultura y ganadería, en los procesos y manipulación de los alimentos, tanto en procesamiento como en la conservación. Por otra parte las actitudes del consumidor y los cambios en sus comportamientos pueden ser elementos que favorecen o pueden favorecer la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica

En España los brotes son de declaración obligatoria urgente y esta declaración se regula mediante el Real Decreto 2210/1995 por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica que incluye los brotes como uno de los sistemas básicos de la vigilancia dentro de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

La declaración de un brote epidémico es obligatoria y urgente. Esta obligatoriedad afecta, en primera instancia, a todos los médicos en ejercicio y a los centros sanitarios, públicos y privados, que detecten la aparición del mismo. Los órganos competentes de las Comunidades Autónomas, en el ámbito de su competencia, establecen los canales de información sobre las situaciones epidémicas y brotes.

Un brote o situación epidémica se considera cuando se dan los siguientes supuestos:

1. El incremento significativamente elevado de casos en relación a los valores esperados. La simple agregación de casos de una enfermedad en un territorio y en un tiempo comprendido entre el mínimo y el máximo del período de incubación o de latencia, podrá ser considerada, asimismo, indicativa.
2. La aparición de una enfermedad, problema o riesgo para la salud en una zona hasta entonces libre de ella.
3. La presencia de cualquier proceso relevante de intoxicación aguda colectiva, imputable a causa accidental, manipulación o consumo.
4. La aparición de cualquier incidencia de tipo catastrófico que afecte, o pueda afectar, a la salud de una comunidad.

La información suministrada por la Red, Sistema de información de brotes y enfermedades de declaración obligatoria permite conocer la situación actual información que se complementa con los datos del Sistema de Información Microbiológica y a nivel

Europeo a través del sistema Enter-net que recoge información de los laboratorios de referencia de los distintos países europeos.

Las Comunidades Autónomas deberán comunicar de forma urgente al Centro Nacional de Epidemiología los brotes y situaciones epidémicas cuyas características hagan sospechar un interés supracomunitario. Se considera un brote de interés supracomunitario aquellos que cumplan las siguientes características:

1. Brote de cualquier enfermedad incluida en el grupo de enfermedades de declaración urgente con conjunto mínimo de datos según el anexo II de este Real Decreto.
2. Brotes epidémicos que afecten a más de una Comunidad Autónoma.
3. Brote en el que se establezca la sospecha de relación con un producto, que se comercialice fuera de la Comunidad Autónoma afectada.
4. Brote cuyas circunstancias hagan temer su extensión fuera de la Comunidad Autónoma implicada.
5. Brote en el que, por su trascendencia, gravedad o magnitud, se considere la necesidad de la declaración urgente al Ministerio de Sanidad y Consumo.

En España, aunque los brotes siempre han sido de declaración obligatoria, los protocolos específicos y de normalización del estudio y comunicación de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos fueron aprobados por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud desde el año 1997. Estos protocolos permiten obtener una información básica normalizada de todo el territorio nacional y responden a los siguientes elementos de Salud Pública:

1. El estudio de un brote es una prioridad de salud pública, cuya competencia y responsabilidad corresponde a la autoridad sanitaria.
2. La prioridad es proteger a la población o atender su preocupación.
3. La responsabilidad en el estudio del brote, la coordinación, la redacción del informe y la evaluación de las medidas de control corresponde a los equipos de intervención integrados en las unidades de vigilancia epidemiológica de las Comunidades Autónomas.
4. Un brote se puede convertir en una crisis sanitaria y la investigación y su resolución fortalece la respuesta en términos de salud pública y por tanto fortalece la Autoridad Sanitaria.
5. Todo brote debe ser investigado desde el punto de vista epidemiológico y de desde el punto de vista de laboratorio:
 - a. El análisis epidemiológico pretende demostrar que el riesgo de presentar el brote ha sido mayor, entre los expuestos, a un hipotético factor causal que entre los no expuestos.
 - b. El análisis de laboratorio pretende confirmar el agente causal y por lo tanto confirmar el origen del brote.
6. Siempre que se considere oportuno el equipo de intervención podrá solicitar la asistencia de equipos externos, incluido el asesoramiento jurídico.
7. En muchas ocasiones se debe considerar la conveniencia de disponer de un Comité de Crisis o comité asesor de la investigación del brote.

Situación en España

Los sistemas de vigilancia epidemiológica se han mostrado como una herramienta de gran utilidad en el control de este tipo de enfermedades y nuestras actividades para el control y prevención deben ir dirigidas al abordaje de cuatro áreas.

1. Vigilancia epidemiológica y respuesta. Detectar, investigar, y vigilar los patógenos emergentes de las enfermedades que las causan, y de los factores que influyen en su emergencia y dar respuesta a los problemas cuando son identificados. Mejorar los sistemas de vigilancia que nos permitan conocer la incidencia y la carga de enfermedad de brotes y casos esporádicos.

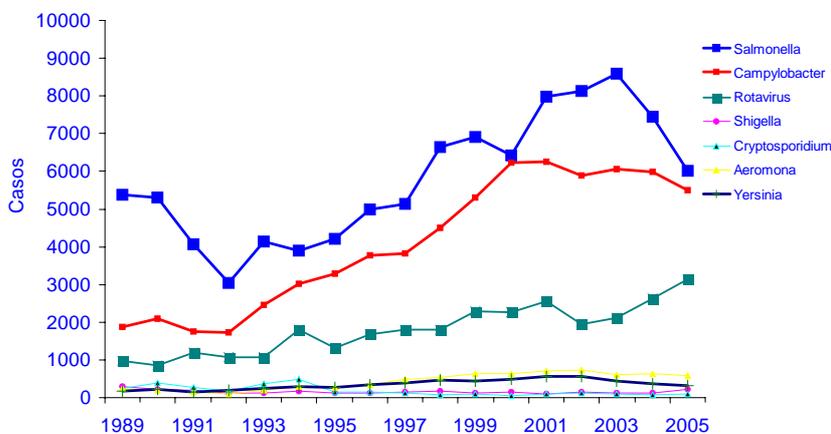
2. Investigación de campo. Desarrollo de los estudios epidemiológicos en los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos que nos permitan conocer la etiología de los mismos, sus riesgos y desarrollo de estrategias de evaluación.

3. Infraestructura y entrenamiento. Potenciar la infraestructura en salud Pública y los mecanismos de la vigilancia epidemiológica, de forma que mejoremos la respuesta, la investigación y los programas de prevención y control. Mejorar los recursos en la respuesta de los laboratorios en el diagnóstico y en la referencia de los laboratorios de salud pública. Prevención y control. Asegurar la mejora de las estrategias de prevención e intensificar la comunicación de la información en salud pública sobre los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Los distintos sistemas de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica permiten conocer la situación y suministran información de las enfermedades de transmisión alimentaria al mismo tiempo que nos permiten conocer la existencia de brotes cualquiera que sea su etiología.



**Tendencias de los microorganismos más relevantes
causantes de infecciones gastrointestinales
Casos notificados al Sistema de Información Microbiológica
España 1989-2005**



Centro Nacional de Epidemiología
Instituto de Salud Carlos III, Madrid

Brotos de enfermedades transmitidas por alimentos

ESPAÑA 1995 – 2005
(Excluidos brotes hídricos)

Año	Nº Brotes	Casos	Hospitalizados	Defunciones
1995	904	11386	1457	8
1996	887	11119	1045	3
1997	871	11220	996	4
1998	942	12660	1328	3
1999	927	14041	1150	8
2000	960	12156	1148	9
2001	989	13826	115	5
2002	971	14904	1128	5
2003	1221	14112	1260	16
2004	1119	12682	946	12
2005*	949	14857	1175	12

(*Datos provisionales)

Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica

Elaboración: Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII.

PREVENCIÓN Y CONTROL SANITARIO DE LAS ENFERMEDADES DE ORIGEN ALIMENTARIO: EL MODELO DE GALICIA

Xurxo Hervada Vidal

*Subdirector Xeral de Epidemioloxía e Sistemas de Información. Dirección Xeral de Saúde Pública.
Consellería de Sanidade. Xunta de Galicia*

Se estima que en los países industrializados, solamente se detectan un 10% de los brotes de enfermedades de origen alimentario (EOA), pero este tipo de procesos continúa representando un importante problema de salud pública, no solo por el número de casos, sino también por las secuelas que pueden originar. Tienen, además, un impacto económico importante derivado del absentismo laboral y escolar, gastos médicos, recursos humanos, industriales, etc. Y, actualmente, están teniendo una gran trascendencia social.

El estudio de estos procesos permite definir el problema que representan para la salud pública, no solo los que se ocasionan en la última fase de la cadena alimentaria (preparación y consumo), sino en cualquiera de las fases de producción del alimento. Además, contribuye a detectar los agentes o situaciones emergentes derivadas de las siguientes circunstancias: aumento del comercio nacional e internacional de alimentos, nuevas tecnologías de producción, cambio en los hábitos alimentarios y en el estado inmunológico de la población.

Además, los estudios epidemiológicos de los brotes permiten obtener datos que podrían ser utilizados para determinar qué programas de higiene alimentaria son prioritarios y contribuir a la evaluación de los programas instaurados y futuros, especialmente si en los estudios hay una buena investigación de los factores que contribuyeron a que sucediese este hecho y no solo una mera suposición.

Desde siempre, la investigación de los brotes EOA, tuvo tres objetivos inmediatos: Conocer el agente responsable de la enfermedad, averiguar cual fue el alimento que le sirvió de vehículo y determinar cuales fueron los factores ajenos al agente y al vehículo que hicieron posible el brote. Además, esta información se empleaba para: a) conocer la historia natural de los diferentes patógenos; b) ver qué alimentos servían de vehículos a qué agentes, y si ellos por sí mismos se podrían considerar agentes; y, aunque casi no se generaran tipologías explícitas de los brotes de EOA, c) para conocer los factores sobre los que incidir para evitar la repetición de brotes del mismo "tipo".

En línea con esta perspectiva fragmentada, se encuentra el hecho tradicional de presentar la información obtenida de los brotes: tablas de agentes, tablas de vehículos y tablas de factores contribuyentes, junto a la exposición de las relaciones bi- o tri-factoriales más frecuentes.

Con esta forma de abordar el problema de los brotes de EOA, en verdad se obtuvieron grandes éxitos que permitieron establecer las líneas maestras de lo que hoy es su control. Ahora bien, hoy en día, cuando ya se están desarrollando diversos programas de control, dicha información no llega; hoy se hace imprescindible asociar los brotes a los diferentes programas de control (o a su ausencia), y hacerlo ya en función de tipologías (ej., hechos concretos de producirse el brote) construidas en función de las características de los programas de control. Con el tiempo, la evolución de la frecuencia de las distintas tipologías servirá para evaluar el impacto de los diferentes programas en las EOA (o indicar su necesidad).

Todo lo anterior llevó a que, en Galicia, en el año 2001, se pudiese en marcha un protocolo de actuación ante la notificación de la sospecha de un brote de EOA que permita una actuación homogénea en la investigación de estos procesos de los profesionales que trabajan en la salud pública en la Comunidad Autónoma de Galicia y que garantice la calidad de la información que se obtenga.

Para acometer este nuevo proyecto era crítico, primero, una buena investigación de los brotes; segundo, establecer relaciones adecuadas entre los resultados de investigación y los programas de control; y, finalmente, resumir y almacenar de la manera más fácil los resultados de la investigación para que puedan ser empleados por todos los implicados en el control de la EOA.

Por lo tanto, el protocolo establece: las responsabilidades en la decisión de la investigación, la creación de equipos de investigación (epidemiólogos, veterinarios y farmacéuticos), la forma de acometer la investigación, tanto epidemiológica como la de la historia del alimento, las características de los informes y la evaluación de la calidad de la información producida por la investigación. Lo más destacable dentro del protocolo, y que se podría considerar innovador, son la formación de los equipos de investigación, el cambio en la investigación de la historia del alimento, que pasa de ser una inspección de estilo tradicional a estar centrada en el alimento problema y en los factores que contribuyeron a la contaminación, a la supervivencia y a la multiplicación y, por último, a la evaluación de la calidad de la información, que permite hacer cambios o detectar necesidades de formación en aspectos concretos de la investigación. Además, dentro de los documentos de desarrollo del protocolo, tiene especial importancia el que establece el nexo entre los resultados de la investigación de los brotes de EOA y los programas de control; Un nexo que se establecerá mediante “lugares”, ya que a ellos se dirigen los programas de control, y en ellos es donde operan los distintos factores que contribuyen para producir los brotes, y que deben ser determinados en la investigación.

Estos factores contribuyen de tres maneras fundamentales que, según como se produjese el brote, pueden estar presentes solo unos de ellos o los tres: (1) por introducir alimentos contaminados, o por permitir su contaminación; (2) por permitir la supervivencia del agente en el alimento; y (3) por no impedir, o incluso favorecer, la multiplicación del agente en el alimento; y las tres formas pueden estar presentes en un mismo brote. Pero hasta ahora, y aunque esta distinción entre contaminación, supervivencia y multiplicación es crítica para comprender el brote en términos de control, no se venía recogiendo explícitamente de qué hecho o factor implicado por la investigación contribuye a que ocurra el brote, ni se exigía que en la investigación de los factores contribuyentes se determinase explícitamente cual propició – si ocurriese- la contaminación, la supervivencia y la multiplicación.

Prácticamente podemos decir lo mismo de los lugares, ya que aunque hasta ahora se venía distinguiendo entre “lugar donde se contaminó el alimento” y “lugar donde se adquirió/consumió el alimento”, el primero abarcaba sin más discriminación los lugares donde se contamina el alimento, donde se permite la supervivencia de agentes patógenos o donde se permite su multiplicación; y del segundo, los datos no indican nada de si estos lugares influyeron de alguna manera sobre la (in)seguridad del alimento.

Se pensó, pues, en convenir en un sistema capaz de hacer explícita la relación entre resultados de la investigación y los programas de control. Para esto fue necesario, primero, que aquella determinase qué factor contribuyó a la contaminación, cual a la supervivencia y cual a la multiplicación, y los lugares en los que ocurre cada una de ellas, ya que estos lugares conducen directamente a un programa de control.

Por lo tanto, fue también preciso disponer de una relación de factores construida en términos según la forma que tengan de contribuir a los brotes, de una relación de lugares y, también, de una relación de programas de control. De ellas, la de factores contribuyentes merece una mención especial, ya que se construye con categorías mutuamente excluyentes, pero sin ánimo de exhaustividad, favoreciendo a los que se espera que sean más frecuentes. De todas formas, es una lista abierta que, con el tiempo, podrá integrar nuevas categorías, subdividir las actuales para darle presencia a algún factor concreto o incluso perder alguna. En este sentido, cada vez que haya un cambio se harán los correspondientes para garantizar la integridad referencial de los datos ya archivados.

Por otra parte se elaboraron las reglas para especificar los factores contribuyentes y los lugares donde operaron, es decir, los factores contribuyentes solo se podrán establecer si el alimento está confirmado epidemiológicamente, puesto que, de no hacerlo así, estaríamos entrando en el campo de la suposición y la información, ya de por sí difícil de confirmar, sería de baja calidad. Cada apartado solo puede tener un factor, es decir, no puede haber más de un factor que contribuye a la contaminación por ejemplo, ya que no tendría sentido por exclusión de uno por el otro. Después cada factor tiene que estar asociado con un lugar, sino no tendría sentido establecerlo y partiríamos de una falsedad y finalmente estos lugares tienen asociado un programa de control.

Todo esto nos permitirá, con el tiempo, ir mejorando los programas de control, ver en qué aspectos es preciso incidir para mejorarlos y establecer la evidencia sobre los factores que están contribuyendo a la producción de los brotes.

CONFERENCIA DE CLAUSURA

LAS BACTERIAS LÁCTICAS: ¡ESTÁN PARA COMÉRSELAS!

Evaristo Suárez, José L. Caso, Cristina Monjardín, Rebeca Martín, Isabel Rodríguez y Nora Soberón

Área de Microbiología, Universidad de Oviedo e Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC).

La definición clásica de las bacterias del ácido láctico (BAL) describe a un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, que fermentan los azúcares originando como producto final mayoritario ácido láctico y que son “generalmente inmóviles, no esporulados, no pigmentados, no reductores de nitrato, no licúan la gelatina, y no producen indol ni ácido sulfídrico. Además presentan exigencias nutricionales complejas respecto a aminoácidos, péptidos, vitaminas, sales, ácidos grasos y glúcidos fermentables” (7). ¿Habremos de deducir de aquí que la característica diferencial de las BAL es que son “tontas” metabólicamente? A primera vista parece que sí, siendo esta impresión corroborada por el escaso tamaño de sus genomas, que suele estar entre los 1,8 y los 2,4 millones de pares de nucleótidos (Mbp), aunque haya alguna excepción notable como *L. plantarum*, que alcanza las 3,3 Mbp (18). Ahora bien, incluso el más inteligente de la clase es solo un poco más listo que *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes*, con genomas en torno a las 2,9 Mbp (17, 23) y mucho más torpe que *Escherichia coli*, cuyo genoma oscila entre 4,64 y 5,5 Mbp, según consideremos la cepa K12 o la patógena transmisible por alimentos O157:H7 (16).

Paradójicamente, las BAL colonizan multitud de ambientes, que van desde el material vegetal en descomposición hasta las cavidades corporales, siendo dominantes en muchos de ellos. En esta charla vamos a intentar dar algunas claves de por qué organismos que son tan limitados individualmente, tienen tanto éxito como grupo.

La primera cuestión podría ser ¿por qué el genoma de las BAL es, en general, tan pequeño? Posiblemente sea una consecuencia de la competición por colonizar nuevos hábitats. El secreto radica en crecer y multiplicarse más deprisa que los competidores. Esto se logra de dos maneras: a) evolucionando hacia una mayor eficacia en el aprovechamiento de los nutrientes y en la adaptación a las condiciones físico-químicas del medio y b) disminuyendo el tamaño del genoma. Esta última exigencia se satisface eliminando los genes que no contribuyen a la eficiencia biológica en un ambiente concreto. De este modo, al disminuir la cantidad de ADN a replicar y consecuentemente, de genes a expresar, puede aumentar la tasa de multiplicación. Esta última estrategia implica una pérdida de versatilidad y por ello, la única solución de supervivencia para el organismo que emprende ese camino es hacerse muy eficaz en el aprovechamiento de los recursos que existen en hábitats concretos.

Algunos de los ecosistemas que ocuparon con éxito las BAL son relativamente antiguos, caso de las cavidades orgánicas, pero otros han aparecido recientemente, caso de los productos agropecuarios fermentables. Aunque la transformación de estas materias primas a escala industrial tiene menos de un siglo, la magnitud de los procesos nos permite observar los cambios que se van operando en los iniciadores para adaptarse a las peculiaridades de los nuevos ambientes; téngase en cuenta que cada año se generan unas 10^{31} células tan solo a partir de las fermentaciones de leche.

La evolución sustractiva. Posiblemente el primer paso en esta adecuación sea la inactivación de genes que resultan ser innecesarios en el nuevo ambiente. Por ejemplo, un 10% de los genes de *Streptococcus thermophilus* y casi el 15% de los de *Lactobacillus*

delbrueckii ssp *bulgaricus* no se expresan. Entre ellos abundan los de utilización de glúcidos y, en el caso de *S. thermophilus*, los homólogos de factores de virulencia que son activos en los estreptococos patógenos (4, 30). Esta pérdida de funciones puede incluso beneficiar al organismo. Así, la incapacidad de *S. thermophilus* para sintetizar la galactoquinasa de la ruta de Leloir y la de *L. delbrueckii* para producir una transcetolasa de la ruta de las pentosas fosfato, tiene como consecuencia que la galactosa producida por hidrólisis de la lactosa sea excretada en un proceso muy eficaz de antiporte con el disacárido (29) (en realidad no importa que la mitad del azúcar incorporado se derroche, ya que la concentración de lactosa en la leche es muy elevada).

De manera semejante, en las cepas industriales de *Lactococcus lactis* están presentes los genes de las rutas de biosíntesis de los 20 aminoácidos pero, sin embargo, es necesario añadir al menos seis de ellos al medio de cultivo. Lo mismo ocurre con algunas vitaminas como el ácido fólico y la riboflavina (3).

Que el silenciamiento génico preceda a la delección de secuencias puede considerarse como un seguro frente a la adaptación a ambientes que resultan no ser suficientemente estables. Las retromutaciones (o las mutaciones compensatorias) pueden fácilmente restaurar funciones que se habían convertido en innecesarias, pero que vuelven a dar ventaja al organismo en respuesta a cambios en el ecosistema. Por ejemplo, si *S. thermophilus* se incubaba en medios ricos en galactosa se recupera la actividad galactoquinasa y, con ella, la capacidad de fermentar el monosacárido (28).

Ahora bien, si el ambiente permanece inalterado durante mucho tiempo, sin duda la pérdida de segmentos innecesarios de ADN supone una ventaja adaptativa importante. Consideremos el caso de *Lactobacillus sakei*. Este organismo, asociado a la fermentación de embutidos, presenta un genoma de 1,88 Mbp en el que faltan las rutas de biosíntesis de prácticamente todos los aminoácidos (es auxotrofo para 18 de los 20) debido, presumiblemente, a su abundancia en la carne. Igualmente, presenta un repertorio muy limitado de genes de incorporación y catabolismo de glúcidos, probablemente como consecuencia de la escasez de azúcares en dicha matriz (significativamente, conserva la capacidad de utilización de sacarosa, que se añade frecuentemente para favorecer la generación rápida de ácido láctico y el antagonismo de este compuesto frente al desarrollo de microorganismos indeseables) (5).

En realidad, es muy posible que nosotros hayamos contribuido a la selección restrictiva a través del uso inadvertido de las BAL para generar productos fermentados. Así, la costumbre de utilizar inóculos procedentes de fermentaciones previas que hubieran dado lugar a productos con buen sabor e inoocuos, favorecería a los microorganismos de más rápido crecimiento y sin potencial patogénico. Entre las bacterias dominantes en productos tradicionales la presencia de actividades generadoras de mal “flavor” o de factores de virulencia, como las aminas biógenas, es excepcional (15). Así pues, es probable que la consideración GRAS de las BAL sea una consecuencia del proceso de domesticación al que las hemos sometido.

La evolución aditiva. La colonización de nuevos hábitats exige habitualmente la puesta en marcha de estrategias que resulten en una adaptación eficiente al ambiente fisico-químico del nuevo medio, incluyendo la capacidad de extraer la energía y el material plástico almacenado en la materia orgánica presente en el mismo.

La posibilidad más sencilla es “aprovecharse de un amigo”, como hace *S. thermophilus* respecto a *L. delbrueckii* durante la fabricación de yogur. La mayoría de cepas del primero son auxotrofas para múltiples aminoácidos y no son capaces de obtenerlos de la caseína. Sin embargo, crecen en leche gracias al aporte que realiza la proteinasa exocelular de *L. delbrueckii* (20).

Una segunda opción es aumentar la efectividad de genes preexistentes. Por ejemplo, se pueden convertir en constitutivos genes que en otros organismos son inducibles, como ocurre con el operón de transporte e hidrólisis de la lactosa en *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus* (8). Otra posibilidad sería incrementar la afinidad de un transportador o un enzima por su sustrato y, finalmente, se podría elevar la dosis génica; *L. plantarum* presenta, en general,

actividad β -galactosidasa de codificación cromosómica. Las cepas de origen lácteo poseen, además, un gen plasmídico con la misma actividad (12).

Finalmente, la información puede adquirirse a partir de otras fuentes, habitualmente los microorganismos indígenas en el hábitat a colonizar. Las BAL se aprovechan de una multitud de elementos móviles que transfieren información entre bacterias o entre replicones dentro de una célula, como los plásmidos, conjugativos o movilizables y los transposones, incluyendo los conjugativos. Además, algunas BAL, como *L. lactis*, presentan genes de competencia que podrían mediar la introducción de ADN por transformación (3).

Quizás el caso en que mejor se pueda seguir el proceso de adquisición de nuevas propiedades a partir de fuentes heterólogas sea el de la utilización de la lactosa por las cepas industriales de *L. lactis*. Las cepas ambientales crecen mal en medios con lactosa porque la permeasa que internaliza el disacárido es muy ineficaz. Una vez en el citoplasma, el azúcar es escindido por una β -galactosidasa y los monosacáridos resultantes sufren una fermentación heteroláctica. En cambio, las cepas industriales incorporan el azúcar muy eficientemente y la fermentación es homoláctica. La diferencia se debe a la presencia en estas últimas cepas de un operón que contiene todos los genes necesarios para el transporte y utilización de la lactosa por la vía de la fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). En general, este operón está incluido en un plásmido y flanqueado por secuencias ISS1, lo que podría ser una primera indicación de que su origen es heterólogo. En *Staphylococcus aureus* y en *Streptococcus mutans* aparecen operones semejantes; la identidad de las secuencias de aminoácidos de las siete proteínas estructurales codificadas en cada uno de los tres casos oscila entre el 60 y el 85%, lo que indicaría que tienen el mismo origen. Sin embargo, en *S. aureus* y *S. mutans* los operones están localizados en el genoma principal, es decir forman parte del repertorio genético básico de dichos organismos (8).

La lactosa es muy escasa en la naturaleza, si exceptuamos la leche. Por ello, solo tendría sentido el desarrollo de una ruta eficiente de utilización del azúcar en aquellos microorganismos que establecieran una relación simbiótica con los mamíferos. El hábitat típico de *S. mutans* es la boca de dichos vertebrados, de manera que esa capacidad favorecería su establecimiento en la primera etapa de la vida, durante la que solo consumimos leche. *S. aureus* coloniza frecuentemente los conductos galactóforos, siendo uno de los principales agentes etiológicos de mamitis, con lo que de nuevo queda clara la ventaja selectiva del sistema PTS específico para la lactosa que posee.

La localización plasmídica de los determinantes de rutas metabólicas dispensables, aunque ventajosas en condiciones determinadas, puede ser muy beneficiosa. En primer lugar, los plásmidos se pueden adquirir con facilidad por conjugación o transducción y sus determinantes de replicación suelen ser compatibles entre las bacterias Gram positivas con baja proporción C/G (de hecho, los primeros vectores de clonación para *L. lactis* derivaban de plásmidos de *Streptococcus agalactiae* y de *Enterococcus faecalis*).

Por otra parte, los plásmidos suelen ser multicopia, por lo que una dosis génica elevada podría compensar una posible falta de adaptación de los genes heterólogos a las condiciones óptimas de expresión en el nuevo hospedador (por ejemplo, diferencias en el uso de codones).

Por último, la eliminación de los plásmidos es, en principio, sencilla, hasta el punto de que el cultivo de una cepa que albergue varios puede dar lugar a variantes con diferentes combinaciones de dichos elementos extracromosómicos (9). Sin embargo, existen mecanismos de estabilización de los replicones más útiles; el plásmido pSK11L, que porta los determinantes de utilización de la lactosa por el sistema PTS, es extraordinariamente estable en las cepas de *L. lactis* ssp. *cremoris* que lo albergan pero, en cambio, es muy inestable cuando se transfiere a *L. lactis* ssp. *lactis* (11).

El agrupamiento de los genes que coadyuvan a una misma función en módulos flanqueados por secuencias de inserción es bastante general y facilita el intercambio entre los replicones celulares, sean estos plásmidos o el genoma principal (genóforo). Un ejemplo

notable de la plasticidad genómica de las BAL lo tenemos con la ruta de biosíntesis de nisina. Inicialmente, se asociaron los genes responsables a un plásmido (14). Independientemente se presentaron evidencias de su localización en el genóforo (10). Dado que la agrupación génica forma parte de un transposón (26), es posible que ambos grupos tuvieran razón.

La transferencia de genes heterólogos al genoma principal es una especie de seguro que permite a la célula estabilizar los determinantes genéticos que le dan una ventaja significativa. Dentro de ellos, los más abundantes suelen codificar para sistemas de transporte e hidrólisis de glúcidos, siendo especialmente abundantes en organismos capaces de crecer en múltiples ambientes como *L. plantarum* (19) y en los lactobacilos intestinales, los cuales, dada la variedad de nuestra dieta, se ven confrontados con muchos oligosacáridos distintos (2, 25).

El inconveniente de este proceso de estabilización es que los determinantes pasan a estar en monocopia, lo que afectará al nivel de respuesta que inducen. Probablemente por ello, suelen agruparse cercanos al origen de replicación, que es una forma de presentar los genes en una multicopia transitoria y/o duplicarse (18).

La evolución depredadora. La producción de bacteriocinas es bastante común entre las BAL. La mayoría de ellas son péptidos de síntesis ribosomal, muy resistentes a condiciones ambientales que desnaturalizan proteínas (como la temperatura elevada y los valores extremos de pH). Prácticamente todas ellas abren poros en las membranas citoplasmáticas de las células susceptibles, lo que resulta en la pérdida del potencial de membrana y la salida de los solutos intracelulares, siendo, por tanto, bactericidas. Su espectro de actuación abarca a un amplio rango de bacterias Gram positivas pero, en general, no a las Gram negativas porque son incapaces de atravesar la membrana externa (24). Todas estas propiedades las convierten en una herramienta formidable de depredación de otras bacterias, que podría complementar tanto a la estrategia sustractiva como a la aditiva para la colonización de nuevos ambientes.

Por un lado, la síntesis de bacteriocinas requiere de solo unos pocos genes, que típicamente oscilan entre tres – cuatro para las formadas por aminoácidos biológicos hasta algo más de diez para los lantibióticos. Así pues, no suponen un gran inconveniente para la tendencia general hacia la disminución del tamaño de los genomas. Por otro lado, al provocar la lisis de las células sensibles, todos los factores de crecimiento acumulados en el interior de las mismas quedan a disposición de la bacteria productora del agente antimicrobiano. Complementariamente, la lisis pondrá grandes cantidades de ADN extraordinariamente valioso en el medio, ya que procede de organismos indígenas y por tanto, los mejor adaptados a él. Dicha información podría ser incorporada por la cepa bacteriocinogénica y sería así una fuente de nuevas propiedades que promoverían su competitividad en el ecosistema.

La evolución defensiva. El éxito biológico de un organismo viene indefectiblemente acompañado de la adaptación de otros a vivir a sus expensas. Los principales parásitos de las bacterias son los bacteriofagos y las BAL no son, ni mucho menos, una excepción a este respecto. De hecho, la infección de los iniciadores industriales por virus es la causa fundamental de fallos en las fermentaciones lácteas. Ahora bien, ¿de donde provienen esos fagos? Probablemente de la materia prima y, con menor frecuencia, de los propios cultivos iniciadores; en un estudio reciente se analizaron 900 muestras de leche y se observó que un 10% contenía fagos activos contra *L. lactis*; sin embargo, prácticamente ninguna de las cepas incluidas en 11 iniciadores comerciales albergaba profagos inducibles con mitomicina C (21). Una segunda cuestión sería: ¿por qué las fermentaciones alimentarias son más susceptibles a la infección viral que la fabricación de aminoácidos o de antibióticos, en las que también se cultivan grandes volúmenes de microorganismos? La respuesta es que en estas últimas se esterilizan los medios de cultivo, una práctica vedada para los productos fermentables, ya que son lábiles a las temperaturas de esterilización y que, por tanto, solo pueden ser pasteurizados. Algunos fagos resisten este tratamiento y aún son infectivos cuando se añaden los cultivos iniciadores (21). En el caso de las industrias lácteas el problema se agrava porque tanto la materia prima, la leche, como uno

de los productos resultantes de la fermentación, el suero, son fluidos y forman aerosoles en los que van incluidos fagos que contaminan el ambiente de la fábrica y pueden hacerse endémicos.

Frente a este problema hemos puesto a punto una serie de procedimientos que ayudan al control de la propagación fágica (1) pero, en realidad, son las propias “víctimas” las que han desarrollado mecanismos eficaces de defensa frente a la infección, siendo las más conocidas las implementadas por *L. lactis*, debido a la susceptibilidad especial de la fermentación láctea y a la importancia económica de la misma.

Los sistemas de defensa pueden afectar a cualquier estadio de la infección viral y los agruparemos en tres categorías (27):

a) bloqueo de la penetración: la bacteria se hace resistente porque pierde la capacidad de sintetizar el receptor que media la adsorción del virus a su superficie o porque deja de presentar en su membrana plasmática una proteína que media la inyección del ADN;

b) adquisición de sistemas de restricción-modificación: éstos degradan el ADN viral a su llegada al citoplasma. En las BAL se han descrito muchos sistemas de tipo II, que son los más fáciles de detectar porque reconocen secuencias palindrómicas, pero parece que los más abundantes son los de tipo I, que son más versátiles y eficaces;

c) adquisición de mecanismos de infección abortiva: estos sistemas son inducibles por la infección viral e inhiben diferentes pasos del desarrollo intracelular del parásito; por ejemplo, la transcripción temprana o el ensamblaje de los nuevos viriones. Complementariamente, provocan la muerte de la célula infectada. El objetivo final es por tanto, impedir que el virus pueda dar lugar a una progenie, evitándose así la propagación de la infección.

El primero de los mecanismos de defensa enumerados resulta habitualmente de una mutación que elimina la expresión de un gen, pero los otros dos son consecuencia de la adquisición de nueva información genética, la cual, en muchos casos, podría tener un origen heterólogo. Las razones que sustentan esta afirmación son las siguientes: frecuentemente los genes responsables son plasmídicos y están flanqueados por secuencias de inserción, suelen tener una proporción de G/C distinta a la del genoma principal de la bacteria en la que se encuentran y, en el caso de los sistemas de restricción – modificación, suelen ser isoesquizómeros de otros presentes en *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y otros cocos Gram positivos.

En general, estos sistemas disminuyen la frecuencia de la infección pero no la anulan por completo, salvo quizás los que impiden la llegada del genoma viral al citoplasma. Esta podría ser la razón por la que suelen aparecer varios en un mismo plásmido, su acción conjunta aumenta la efectividad antiviral.

Los fagos responden a estas estrategias defensivas de dos maneras. Por un lado, dado que los genes que codifican para una función suelen aparecer agrupados, les es relativamente sencillo intercambiarse información mediante recombinación con otros virus, con profagos o incluso con secuencias de la propia bacteria, lo que frecuentemente resulta en la generación de fagos inmunes a la defensa antiviral. Alternativamente, los fagos atemperados pueden incorporar su genoma al de la célula hospedadora antes de que los sistemas intracitoplasmáticos de defensa tengan la oportunidad de actuar. A partir de ese momento quedarán enmascarados como parte del genoma bacteriano e incluso pasarán a la progenie de dicha célula. Tal vez sea esa la razón de la abundancia de profagos en algunas BAL como *L. lactis*, que presenta seis, o *L. plantarum* y *L. johnsonii*, que albergan 4 y 3 respectivamente (3, 19, 25). Ahora bien, en cuanto el profago se integra empieza a funcionar la evolución sustractiva sobre él, apreciándose una tendencia hacia la pérdida de genes virales. Así, por ejemplo, en *L. lactis* tres de los seis profagos son defectivos, aunque dos de ellos parecen ser satélites de alguno de los completos y dan lugar a viriones (6).

Las BAL son, por tanto, un grupo de organismos que presentan genomas pequeños cuando se consideran individualmente, pero que comparten un gran acervo genético que les facilita la colonización de los ambientes más diversos. Curiosamente, dentro de dichas capacidades no aparecen determinantes de virulencia y, así, solo excepcionalmente se las ha asociado a procesos patológicos (13, 22). Como consecuencia, hemos establecido una relación muy estrecha con ellas, nos hemos convertido en su madriguera y ellas, en justa correspondencia, contribuyen a nuestro bienestar y nos alimentan. Sabiendo esto, ¿Quién puede seguir manteniendo que el mejor amigo del hombre es el perro?

Agradecimientos

Queremos agradecer al Comité Organizador del XV Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos su deferencia al invitarnos a escribir el presente texto. I. R. y R. M. son becarias de FPU del MEC y de FICYT, respectivamente. C.M. disfruta de un contrato financiado por FICYT. La investigación del grupo de Bacterias Lácticas de la Universidad de Oviedo se financia con cargo al Proyecto SAF2004-00033 de CICYT y a los contratos CN-05-048 y CN-05-049 con la empresa Mercadona S. A.

Referencias

1. Accolas, J. P., C. Peigney, G. K. Y. Linsowtin, P. J. Cluzel y L. Sechaud. 1994. Lutte contre les bactériophages dans l'industrie laitière. En: *Bactéries lactiques*. (de Roissart, H. y F. M. Luquet, eds.). Loriga. Uriage. France. Vol. I. pp. 473-492.
2. Altermann, E. *et al.* 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 3906-3912.
3. Bolotin A. *et al.* 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**: 731-753.
4. Bolotin A. *et al.* 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1554-1558.
5. Chaillou S. *et al.* 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* **23**:1527-1533.
6. Chopin A., A. Bolotin, A. Sorokin, S. D. Ehrlich y M. Chopin. 2001. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res.* **29**: 644-651.
7. Dellaglio, F., H. de Roissart, S. Torriani, M. C. Curk y D. Janssens. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: *Bactéries Lactiques*. (de Roissart, H. y F.M. Luquet, eds). Loriga. Uriage. France. Vol. I. pp. 25-116.
8. de Vos W. M. y E. E. Vaughan. 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **5**: 217-237.
9. de Vos W. M., H. M. Underwood y F. L. Davies. 1984. Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK11. *FEMS Microbiol. Let.* **23**: 175-178.
10. Dodd H. M., N. Horn y M. J. Gasson. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 555-566.
11. Feirtag J. M., J. P. Petzel, E. Pasalodos, K. A. Baldwin y L. L. McKay. 1991. Thermosensitive plasmid replication, temperature-sensitive host growth, and chromosomal plasmid integration conferred by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* lactose plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 539-548.
12. Fernández, M., A. Margolles, J. E. Suárez y B. Mayo. 1999. Duplication of the β -galactosidase gene in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **48**: 113-123.
13. Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur.* **92**:45-67
14. González C.F. y B.S. Kunka. 1985. Transfer of sucrose-fermenting ability and nisin production phenotype among lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 627-633.

15. Halász A., A. Baráth, L. Simon –Sarkodi y W. Holzapfel. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **5**: 42-49.
16. Hayashi T., K. *et al.* 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* **28**: 11-22.
17. Holden M. T. *et al.* 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**: 9786-9791.
18. Klaenhammer T. R., R. Barrangou, B. L. Buck, M. A. Azcarate-Peril y E. Altermann. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 393-409.
19. Kleerebezem M. *et al.* 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**:1990-1995.
20. Loones, A. 1994. Laits fermentés par les bactéries lactiques. En: *Bactéries Lactiques.* (de Roissart, H. y F. M. Luquet, eds). Loriga. Uriage. France. Vol. II. pp. 135-154.
21. Madera, C., C. Monjardín y J. E. Suárez. 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* strains bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7365-7371.
22. Martín, R., N. Soberón, F. Vázquez y J. E. Suárez. 2006. La microbiota vaginal: composición, efectos y usos terapéuticos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* (en prensa).
23. Nelson K. E. *et al.* 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2386-2395.
24. Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink y H. Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70**: 113-128.
25. Pridmore, R. D. *et al.* 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**: 2512-2517.
26. Rauch, P. J. y W. M. de Vos. 1992. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **174**: 1280-1287.
27. Sturino, J. M. y T. R. Klaenhammer. 2004. Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**: 331-378.
28. Thomas, T. D. y V. L. Crow. 1984. Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 186-191.
29. Thompson, J. y C. R. Gentry-Weeks. 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. En: *Bactéries Lactiques.* (de Roissart, H. y F. M. Luquet, eds). Loriga. Uriage. France Vol. I. pp. 239-290.
30. van de Guchte, M. *et al.* 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**: 9274-9279.

COMUNICACIONES ORALES

O-01 ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN DEL GEN DE LA TOXINA SHIGA A *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

*L. Imanovic, J. Jofre y M. Muniesa**

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Diagonal 645.
Anexo. Planta 0. 08028 Barcelona. mmuniesa@ub.edu

Las cepas *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) son importantes patógenos emergentes. El ganado bovino es uno de los mayores reservorios de STEC, entre ellos del serotipo *E. coli* O157:H7 y otros. La mayoría de los brotes causados por STEC están asociados al consumo de carne de vacuno poco cocinada, productos lácteos, vegetales o agua.

Uno de los principales factores de patogenicidad de STEC son las toxinas Shiga (Stx). Los genes de las toxinas Shiga (stx) están insertos en el genoma de fagos (virus bacterianos) atemperados (fagos-stx) que lisogenizan las cepas STEC. Cuando el ciclo lítico de los fagos se activa, se produce un aumento en la producción de toxina por parte de las bacterias y se generan nuevos fagos-stx. Los nuevos fagos-stx son liberados y pueden infectar otras bacterias. Mediante el mecanismo de transducción, los fagos les transmiten el gen de la toxina Shiga, convirtiéndolas en patógenas.

La transducción de fagos-stx podría tener lugar en alimentos, dado que tienen una elevada implicación en las infecciones causadas por STEC, pero no existen estudios que permitan evaluarlo. El estudio de la transducción del gen stx en *E. coli* en alimentos ha sido, pues, el objetivo de este trabajo.

Para ello, se utilizaron tres fagos-stx inducidos de *E. coli* O157:H7. Estos fagos se modificaron insertando en el gen stx, presente en su genoma, un gen de resistencia a tetraciclina y cloramfenicol. La transducción se estudió en leche pasteurizada, zumos de fruta, ensalada, carne de ternera picada y agua embotellada. Como cepas receptoras de los fagos-stx recombinantes, se usaron una cepa de *E. coli* de laboratorio y una cepa O157:H7 Stx negativa. En los experimentos se mezclaron los fagos recombinantes y las cepas receptoras y se homogenizaron en las muestras de alimentos, incubándolos durante 4 y 24 horas a 4°C, 25°C y 37°C. Posteriormente se realizó un crecimiento selectivo de los cultivos con los antibióticos correspondientes para poder detectar y cuantificar los posibles transductantes. Los transductantes se verificaron por PCR y secuenciación.

Se detectó transducción en todos los alimentos analizados, con los tres fagos, en *E. coli* de laboratorio, a 25°C y 37°C. Estos resultados indican que la transducción es teóricamente posible en alimentos, aunque requiere que confluyan diferentes factores. Se necesitan más estudios para evaluar el riesgo que esto implica para la salud humana.

O-02 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CEPAS DE *Listeria monocytogenes* AISLADAS DE ALIMENTOS DE CONSUMO DIRECTO (RTE) Y DE CASOS CLÍNICOS DE LISTERIOSIS OCURRIDOS EN NAVARRA

V. Garrido, I. García-Jalón y A. I. Vitas*

Dpto. Interfacultativo de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. Irunlarrea 1, 31008 Pamplona. vgargon@alumni.unav.es

En el proceso de valoración de riesgos la etapa de caracterización del peligro requiere obtener información, entre otros aspectos, de la asociación del patógeno con los alimentos implicados y virulencia de las cepas. En este sentido, es sabido que determinados serotipos de *L. monocytogenes* están más implicados en casos de listeriosis que otros, por lo que resulta de interés caracterizar los aislamientos obtenidos de alimentos y de casos clínicos con el fin de establecer posibles conexiones entre las cepas. El trabajo compara cepas aisladas de casos de listeriosis ocurridos en Navarra y de alimentos listos para consumo adquiridos en el mercado de esta Autonomía en el mismo periodo.

Se han caracterizado un total de 201 cepas de *L. monocytogenes*: 33 procedentes de pacientes con listeriosis ocurridos en Navarra entre 1995-2005 y 168 aisladas de alimentos de consumo directo (salmón y trucha ahumada, cárnicos cocidos, paté, quesos) adquiridos durante el mismo periodo de tiempo en diferentes puntos del mercado de la Comunidad Foral.

Las cepas fueron subtipadas mediante serología y electroforesis en campo pulsado, estudiando la similitud de los patrones obtenidos mediante el programa Gel Compar II (Applied Maths).

Se encuentran diferencias significativas en la prevalencia de serotipos según su procedencia clínica o de alimentos. El campo pulsado demostró identidad en algunos patrones de aislamientos de pacientes con listeriosis y de productos RTE adquiridos en fechas coincidentes. Se observa la presencia del mismo patrón molecular en 4 años consecutivos habiéndose aislado de 10 casos de listeriosis y de 7 cepas muestras de salmón ahumado. En ninguno de los casos clínicos se ha podido realizar una encuesta alimentaria al paciente.

La ingesta de ciertos alimentos RTE ha podido ser la causa de afectados con listeriosis en Navarra, habiéndose demostrado repetida identidad entre patrones moleculares de las cepas aisladas de enfermos y de estos productos. Además, el estudio sugiere la existencia de cepas más virulentas, dado su aislamiento repetido en varios casos de listeriosis.

De cara a la valoración real del riesgo de listeriosis, sugerimos establecer un protocolo de actuación ante un diagnóstico de listeriosis, que incluya la declaración obligatoria de la enfermedad, subtipado de la cepa y encuesta alimentaria del paciente.

O-03 DETECCIÓN POR PCR DE *Bacillus cereus* ESPORULADOS EN ALIMENTOS

J. F. Martínez-Blanch^{1,3*}, E. Garay^{1,2} y R. Aznar^{2,3}

¹ Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia. Juanfra5@uv.es

² Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia. Campus de Burjasot, Valencia.

³ 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 responsables de intoxicaciones. Sus esporas resisten a los tratamientos térmicos de pasteurización aplicados en la industria alimentaria y, además, constituyen un grave problema ya que pueden permanecer en las instalaciones formando biopelículas e incluso pueden germinar y crecer durante el almacenamiento a bajas temperaturas. La PCR es uno de los métodos más rápidos y precisos para controlar su presencia. Sin embargo, una de las limitaciones de su aplicación en alimentos es la recuperación del ADN de los microorganismos a detectar, en cantidad y calidad adecuadas para su amplificación.

Dado que *B. cereus* puede estar presente en alimentos tanto en forma vegetativa como esporulada, el objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un protocolo, de aplicación en alimentos, para asegurar la liberación de ácidos nucleicos a partir de esporas para amplificación por PCR. Se prepararon suspensiones calibradas de esporas, las cuales fueron sometidas a diferentes tratamientos: a) térmicos (80°C, 100°C y autoclave) y b) adición de germinadores en diferentes combinaciones (100 mM de L-alanina, 25 mM de L-alanina y 1 mM de inosina y 0.5 mM de L-alanina y 0.5 mM de inosina). En los ensayos de germinación se incluyeron 6 cepas representativas de las especies del “Grupo *B. cereus*” y se determinó por espectrometría la pérdida de refringencia de las suspensiones de esporas como medida del nivel de germinación. En todas las especies analizadas, los mejores resultados de germinación se obtuvieron con la combinación 0,5 mM L-alanina-inosina. Tras los tratamientos, se utilizó el sistema comercial DNeasy tissue kit (Qiagen) para purificar y recuperar el ADN que a continuación se cuantificó en un espectrofluorímetro TECAN SPECTRA-Fluor microplate reader (TECAN, Salzburg, Austria), utilizando el fluoróforo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Invitrogen). La calidad del ADN recuperado como molde para amplificación se estimó mediante PCR convencional y PCR a tiempo Real con SYBR-Green I. Se obtuvo amplificación en todos los casos. Una vez establecido el tratamiento más favorable se ha aplicado en alimentos contaminados artificialmente para comprobar su validez como método de detección de *B. cereus* esporulados en alimentos.

O-04 EL AGUA DE CONSUMO HUMANO COMO FUENTE DE *Aeromonas* spp.

M. Pablos López*, J. M. Rodríguez-Calleja, I. García-López, J. A. Santos y M. L. García-López

Área de Nutrición y Bromatología. Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Campus de Vegazana, 24071 – León. dhtmlpl@unileon.es

Al género *Aeromonas* pertenecen bacterias Gram-negativas de origen acuático aunque ciertas especies móviles se detectan con facilidad en alimentos frescos. El papel de algunas de éstas como agentes de enfermedades extraintestinales está bien documentado y los datos epidemiológicos indican que también son frecuentes en heces de pacientes afectos de gastroenteritis. Así, en España, *A. caviae*, y en menor medida *A. hydrophila*, ocupan el cuarto lugar entre los agentes de procesos gastrointestinales. A pesar de la considerable atención prestada a este género en los últimos años, su taxonomía es compleja no conociéndose bien sus mecanismos de patogenicidad ni tampoco los alimentos que presentan un mayor riesgo.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la importancia del agua de consumo humano como fuente de *Aeromonas* spp. y la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas aisladas. Para ello, se tomaron muestras semanales de cuatro puntos de la red de distribución de la ciudad de León durante un periodo de seis meses. Las muestras se analizaron mediante un método de filtración, investigándose, además de la presencia de *Aeromonas*, los parámetros microbiológicos para aguas potables recogidos en el Real Decreto 140/2003 (coliformes, enterococos, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y flora viable a 22 °C). Aunque estos parámetros eran aceptables, en 29 (36,25%) de las 80 muestras analizadas se detectó la presencia de *Aeromonas*. La caracterización fenotípica puso de manifiesto que el 93% de las cepas pertenecían al complejo *A. caviae* (Abbott et al., 2003; J. Clin. Microbiol., 41: 2348-2357), mostrando todas ellas el fenómeno suicida y el 66% actividad hemolítica. Para llevar a cabo la caracterización genética, se investigó, utilizando técnicas de PCR, la presencia de tres genes que regulan la producción de exotoxinas y cuya presencia se relaciona con la posible patogenicidad de *Aeromonas* spp.: aerolisina o enterotoxina citotóxica Act (*act/aerA*), enterotoxina citotónica Ast (*ast*) y hemolisina HlyA (*hlyA*). El gen *alt* se detectó en el 21% de las cepas (6) y el gen *aerA* en el 14% (4). Ninguna cepa poseía el gen *hlyA*. Estos resultados ponen de manifiesto que, probablemente por su capacidad para formar “biofilms”, el agua de consumo humano es un vehículo de cepas de *Aeromonas* potencialmente patógenas, pareciendo necesario investigar la relación entre éstas y las aisladas de procesos gastrointestinales en el mismo área geográfica.

Trabajo financiado por el proyecto AGL2004-4672 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Manuel Pablos es beneficiario de una beca de Formación de Personal Investigador.

O-05 ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIAMINAS POR BACTERIAS COMENSALES AISLADAS DE LECHE HUMANA

C. A. Conte-Júnior, E. Hierro Paredes y M. Fernández Álvarez*

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n, 28040. Madrid. manuela@vet.ucm.es

Las poliaminas (putrescina, espermina y espermidina) están implicadas en diversos procesos que ocurren en el intestino del neonato, como el crecimiento y la diferenciación celular y la maduración del sistema inmune del epitelio. Estos compuestos están presentes en cantidades importantes (alrededor de 550 nm/dL) en la leche humana, mientras que en las fórmulas infantiles, elaboradas en su mayoría con leche de vaca, su contenido es aproximadamente 10 veces menor. Además de la síntesis endógena en la glándula mamaria, otra posible fuente de poliaminas en la leche humana es su producción por bacterias comensales presentes en la misma. Las bacterias sintetizan poliaminas por descarboxilación de aminoácidos y se han caracterizado distintas descarboxilasas en géneros bacterianos que forman parte de la flora habitual de la leche humana. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de producción de poliaminas de 19 cepas de bacterias aisladas de leche humana, para su posible aplicación en la elaboración de fórmulas infantiles. Se analizaron cepas de los géneros *Lactobacillus* (10), *Enterococcus* (5), *Bifidobacterium* (3) y *Staphylococcus* (1). Para el crecimiento de las mismas se utilizó el medio de cultivo descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999), con incubación durante 4 días a 37°C, en aerobiosis y anaerobiosis. Tras la incubación se procedió a la extracción de las poliaminas presentes en las muestras para su posterior análisis por HPLC, para lo cual se derivatizaron con cloruro de benzoilo. Se utilizó 1,7-heptanodiamina como estándar interno y la detección se llevó a cabo a 198 nm. En general, se observó una mayor producción de poliaminas cuando las cepas se incubaron en anaerobiosis. Los enterococos presentaron la mayor capacidad de producción de estos compuestos, seguidos de los lactobacilos. Las cepas de los géneros *Bifidobacterium* y *Staphylococcus*, excepto *Bifidobacterium breve*, no sintetizaron poliaminas. *Enterococcus faecalis* Im24 fue la cepa que mostró la mayor producción (24 nmol/mL en total: 8 nmol/mL de putrescina, 7 nmol/mL de espermidina y 9 nmol/mL de espermina), seguida de *Lactobacillus gasseri* Im21, que también sintetizó una importante cantidad de poliaminas (17 nmol/mL en total: 2 nmol/mL de putrescina, 12 nmol/mL de espermidina y 3 nmol/mL de espermina). Para completar la investigación sobre la utilidad potencial de estas cepas para la elaboración de fórmulas infantiles se procederá a analizar la producción de otros compuestos bioactivos, así como al estudio de algunos aspectos relativos a su seguridad.

Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. (1999). *Int. J. Food Microb.*, 53, 33-41.

O-06 DESARROLLO DE UN KIT PARA LA DETECCIÓN DE MICROCISTINAS EN AGUAS DE CONSUMO HUMANO

*H. G. F. Smienk^{*1}, E. Sevilla Miguel², M. L. Peleato Sánchez², P. Razquin Casquero¹ y L. Mata Vallespín¹.*

*^{*1} ZEU-INMUNOTEC, Dpto. I+D, C/ María de Luna, 11 Nave 19, 50018 Zaragoza. hsmienk@zeu-inmunotec.com, razquin@zeu-inmunotec.com, mata@zeu-inmunotec.com*

² Universidad de Zaragoza, Facultad Ciencias, Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza.

Las microcistinas son metabolitos producidos por algunas cianobacterias que se caracterizan por su alta toxicidad hepática. Debido a la progresiva eutrofización de los acuíferos se produce la proliferación indeseada de cianobacterias, con la posible producción de toxinas. La presencia de estas cianotoxinas está provocando cada día más problemas sanitarios y medioambientales derivados de su toxicidad. Aunque es difícil encontrar estadísticas específicas sobre el problema a nivel mundial por la alarma social que pueden provocar, hay datos de presencia de microcistinas en prácticamente todas las regiones del planeta.

En este sentido, la OMS (Organización Mundial de la Salud) estableció los niveles máximos de microcistina en aguas de boca (1µg/L), norma que se ha incorporado en la legislación española (R.D 140/2003) lo que obliga a incorporar controles sistemáticos para garantizar la calidad del agua de consumo humano.

En la actualidad existen varios métodos para la detección de esta toxina entre ellas las técnicas instrumentales del tipo HPLC-MS o HPLC-UV. Los métodos instrumentales tienen un alto coste de inversión en equipamiento, la necesidad de personal cualificado. Alternativamente, en los últimos años se han desarrollado varios ensayos inmunoquímicos tipo ELISA que aunque no requieren una gran inversión económica a fecha de hoy presentan algunos problemas de especificidad.

Como principal inconveniente, los dos métodos mencionados requieren patrones específicos para poder cuantificar la microcistina en cuestión y determinar la toxicidad de la muestra lo que, debido a la gran variedad de microcistinas existentes, hoy por hoy no es posible.

En este trabajo se ha desarrollado un test basado en la inhibición de la fosfatasa PP2A, la diana natural de la toxina. El ensayo se lleva a cabo en placa microtiter mezclando la enzima con un sustrato colorimétrico, el p-nitrofenilfosfato, y los patrones de microcistina-LR a diferentes concentraciones entre 0.1 y 2.5 nM o la muestra, en su caso. La muestra de agua se aplica directamente, sin tener que extraer la microcistina previamente. Se deja desarrollar el color durante 30 minutos para leer a continuación el resultado a 405 nm. Mediante la recta de calibración preparada con los patrones se puede determinar la toxicidad del agua en equivalentes de microcistina-LR.

Se presentará los resultados de la evaluación del test en cuanto a la sensibilidad, la exactitud, la repetibilidad y la reproducibilidad además del análisis comparativo de muestras reales entre el ensayo de la inhibición de la fosfatasa, un ensayo ELISA y HPLC-MS.

MICROBIOLOGÍA DE LAS FERMENTACIONES. BACTERIAS LÁCTICAS Y PROBIÓTICAS

O-07 PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO EN CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCCIONES ACTUALES DE QUESOS GALLEGOS DE LECHE CRUDA

P. Rodríguez-Alonso^{*1}, *J. I. Garabal*¹ y *J. A. Centeno*²

¹Laboratorio de Tecnología de Productos Lácteos. Dpto. Producción Animal. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Consellería do Medio Rural-Xunta de Galicia, Crta. Betanzos-Mesón do Vento, Km7. Abegondo 15080-A Coruña. patricia_rodriguez_alonso@hotmail.com

²Área de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas s/n, 32004 Ourense.

El estudio de propiedades de interés tecnológico en aislados de bacterias lácticas autóctonas de quesos gallegos de leche cruda es importante al objeto de seleccionar aquellas cepas más adecuadas para la preparación de un cultivo iniciador específico, destinado a salvaguardar en cierta medida la tipicidad de los quesos tradicionales, contribuyendo además a la mejora de su calidad al garantizar la regularidad y la seguridad higiénico-sanitaria de las producciones.

Un total de 218 cepas de bacterias lácticas aisladas de producciones actuales de quesos gallegos de leche cruda (Arzúa-Ulloa, Tetilla, San Simón da Costa y Cebreiro), identificadas mediante pruebas convencionales y técnicas PCR, fueron sometidos a un ensayo preliminar discriminatorio mediante la evaluación de los olores producidos en leche entera pasteurizada incubada a 30±1°C durante 24-48h. Los aislados que no originaron en leche notas predominantes a tostado, butírico-picante o azufrado, fueron seleccionados para el estudio de algunas propiedades tecnológicas: actividad acidificante en leche desnatada (FIL, 1995), actividad proteolítica (FIL Standard 149A: 1997; método de derivatización con o-phthaldialdehído, OPA), utilización de citratos en agar citrato de calcio (KCA), producción de diacético-acetoína (FIL Standard 149A: 1997) y actividades enzimáticas (API ZYM).

Entre 129 aislados seleccionados (55 lactococos, 42 lactobacilos y 32 leuconostoc), se encontraron buenos productores de diacético (>100 mg L⁻¹) pertenecientes a los tres géneros. Sin embargo, las cepas se mostraron en general menos acidificantes y menos proteolíticas que otras obtenidas de producciones de leche cruda hace 10-15 años. Los resultados parecen sugerir una pérdida de aptitud tecnológica de las bacterias lácticas obtenidas de las producciones actuales, probablemente consecuencia del uso generalizado de modernas técnicas de ordeño y de la refrigeración de la leche, las cuales reducen la población y la diversidad microbiana en la materia prima y en el entorno quesero.

Proyecto INIA RM02-004. Xunta de Galicia PGIDIT03PXIC50301PN

O-08 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ACIDIFICANTE DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO SAN SIMÓN DA COSTA

A. Fernández, L. González, H. Sandoval, A. Bernardo, y M. E. Tornadijo*

Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 24071-León. dhtmet@unileon.es

La microflora autóctona de la leche con su diversidad de especies y cepas tiene una marcada influencia en el desarrollo de las características organolépticas específicas de los quesos elaborados con leche cruda.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la actividad enzimática y acidificante de algunas cepas de bacterias lácticas aisladas del queso San Simón da Costa, a lo largo de su elaboración y maduración.

Se determinó la actividad enzimática y la actividad acidificante de 20 cepas de bacterias lácticas pertenecientes a las especies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (3 cepas), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (3 cepas), *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (7 cepas), *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus* (1 cepa), y a los géneros *Leuconostoc* (3 cepas) y *Enterococcus* (3 cepas). La actividad enzimática se determinó mediante el sistema API zym (Biomérieux, Maray-L'Etoile, Francia) y la actividad acidificante siguiendo la Norma de la International Dairy Federation (IDF) 306 (1995).

La actividad esterasa, esterasa-lipasa y lipasa fue muy baja o nula para todas las cepas del género *Lactococcus*. En cambio, en los lactobacilos, fundamentalmente *Lactobacillus casei* se detectó cierta actividad esterasa y esterasa-lipasa.

Mientras la actividad leucina y valina arilamidasa fue alta en la mayoría de la cepas de *Lactobacillus casei*, en las cepas de *Lactococcus* y *Leuconostoc* no se detectó actividad valina arilamidasa.

Prácticamente no se observó actividad fosfatasa alcalina, mientras que la actividad fosfatasa ácida alcanzó valores de 20, 30 y 40 nmol sustrato hidrolizado. La mayoría de las cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* mostraron una actividad elevada α -glucosidasa (30 a 40 nmol sustrato hidrolizado), mientras que no fue detectada en cepas de *Lactococcus*, y resultó mínima en *Enterococcus*.

Las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, evidenciaron actividad leucina-arilamidasa. Se detectó poca actividad esterasa y prácticamente ninguna actividad lipasa en las cepas ensayadas.

Se detectó considerable actividad α -glucosidasa y β -galactosidasa en las cepas de lactobacilos, lo cual era de esperar si tenemos en cuenta que la β -galactosidasa es el principal enzima del que disponen los lactobacilos homofermentativos para la transformación de la lactosa en ácido láctico.

La actividad acidificante de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a las 6 h. de incubación (0,25 g de ácido láctico 100 mL⁻¹) sugiere que podrían emplearse como cultivo iniciador para favorecer la acidificación durante la elaboración y primeras etapas de la maduración. A las 12 horas de incubación la acidez desarrollada por las cepas de lactococos se incrementó hasta valores en torno a 0,40 g de ácido láctico 100 mL⁻¹. Estas mismas cepas mostraron baja actividad acidificante a las 24 horas de incubación, con valores inferiores a 0,65 g de ácido láctico 100 mL⁻¹. La acidificación final producida por algunas cepas de lactobacilos y enterococos fue superior a la de los lactococos alcanzando valores en torno a 0,75-0,85 g de ácido láctico 100 mL⁻¹ a las 24 h. de incubación.

O-09 IMPLANTACIÓN DE LSA EN FERMENTACIONES VÍNICAS DE CASTILLA LA MANCHA

N. Barrajon Simancas^{1} y A. I. Briones Pérez¹*

^{1}Área de Tecnología de los Alimentos, Dpto. de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química, Universidad de Castilla La Mancha. Campus Universitario, Avda. Camilo José Cela, s/n 13071 Ciudad Real. nuria.barrajon@uclm.es*

En enología, para la elaboración de vinos de calidad, es frecuente el empleo de cultivos iniciadores de levaduras comerciales seco-activas (LSA) (*Saccharomyces cerevisiae*).

No obstante el inicio de la fermentación alcohólica no es indicativo de una fermentación dirigida sin problemas y con éxito en la implantación de la LSA. Su correcta imposición dependerá de: la calidad industrial del preparado comercial, la cantidad y estado fisiológico de las células vivas después de la rehidratación, de la competitividad propia de la cepa seleccionada y de la población autóctona presente.

Mediante el uso de técnicas de biología molecular ha sido posible demostrar si la levadura inoculada se impone o no en el tanque de fermentación, y lo hace a unos niveles tales que conduce la fermentación vinica.

El objetivo de este estudio ha sido conocer si en las bodegas de Castilla La Mancha existe problemática en la aplicación de las levaduras seco activas y si la hay, ofrecer a las bodegas y cooperativas, una alternativa válida que permita su correcto empleo asegurando así el éxito de la inoculación.

Para el estudio de la imposición de las levaduras en la fermentación vinica, se muestrearon en distintas bodegas mostos de diferentes variedades (Airén, Cencibel, Cabernet sauvignon, Shiraz, Macabeo y Garnacha tintorera) e inoculados con levaduras distintas. Las muestras se recogieron al inicio, mitad, y final de la fermentación.

Cada muestra y/o sus diluciones seriadas se sembraron en Agar YM y se realizó una réplica en placa sobre Agar Lisina para seleccionar las colonias pertenecientes al género *Saccharomyces*.

Se seleccionaron 20 colonias al azar de cada una de las muestras y etapa para su caracterización a nivel de cepa, mediante el análisis de restricción del DNA mitocondrial. Esta técnica se aplicó, simultáneamente, a las levaduras comerciales usadas en cada fermentación por la bodega. La implantación sólo habrá ocurrido si los perfiles genéticos del 80 % de los aislados se corresponden con la cepa comercial.

Los resultados obtenidos son heterogéneos y aunque en la mayoría de los depósitos muestreados sí hubo una buena imposición de la LSA, en otros tan solo logró imponerse menos de un 50%.

Paralelamente al estudio microbiológico de los mostos en fermentación, se realiza el estudio de los parámetros fisico-químicos que más pueden influir en la implantación de las levaduras inoculadas, tales como acidez, concentración de dióxido de azufre, concentración de nitrógeno fácilmente asimilable y del nitrógeno amínico, y concentración de azúcares.

O-10 ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS ESPECIES MICROBIANAS EN EL VINO MEDIANTE HIBRIDACIÓN EN EL “ENOCHIP”

R. Mañes, S. Ferrer e I. Pardo*

ENOLAB

Dpto. Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot-Valencia.

Gran cantidad de microorganismos se desarrollan a lo largo del proceso de vinificación. Las levaduras suelen estar presentes en el mosto y en el vino en las primeras fases de su elaboración, especialmente la especie *Saccharomyces cerevisiae*, responsable de la fermentación alcohólica. También podemos encontrar otras levaduras alterantes que dan lugar a sabores o aromas no deseables. Las bacterias lácticas (BL) se desarrollan una vez las levaduras han completado la primera fermentación y son responsables de la fermentación maloláctica, proceso muy deseable para la obtención de vinos de calidad, aunque también pueden causar alteraciones. Las bacterias acéticas (BA) siempre tienen efectos perjudiciales produciendo el picado acético de los vinos.

El objetivo de este trabajo es evaluar el uso de un chip electrónico para monitorizar la evolución de las especies de microorganismos durante la vinificación. Para ello hemos utilizado un nanochip basado en el uso de sondas de ADN específicas para las diferentes especies. La superficie activa donde tiene lugar la hibridación de las sondas fluorescentes con sus respectivas dianas es el “Enochip”, un nanochip electrónico recubierto por una capa de estreptavidina con cien posiciones conectadas a un terminal operable desde un ordenador. A cada una de ellas se pueden dirigir mediante pulsos eléctricos las muestras amplificadas y biotiniladas por PCR, aprovechando la carga negativa del ADN. Sólo cuando hay complementariedad total entre la muestra y la sonda específica, se retiene la señal fluorescente, indicando así la presencia de diferentes microorganismos en el vino. Las sondas específicas de especie han sido diseñadas basándonos en regiones variables de los genes 16S y 26S para bacterias y levaduras respectivamente.

La técnica permite la identificación directa de los microorganismos desde el vino, pese a ser un medio complejo y con gran cantidad de inhibidores. Ésta es una de las principales ventajas ya que podemos detectar microorganismos sin necesidad de realizar cultivos, lo cual reduce bastante los tiempos de los análisis y facilita la adopción de medidas correctoras rápidas.

Se ha utilizado este dispositivo para estudiar la evolución de las especies de levaduras, BL y BA durante la fermentación de mostos y vinos de las variedades Macabeo, Bobal y Tempranillo. Los resultados se han comparado con los obtenidos con otras técnicas moleculares observándose una total coincidencia, lo cuál avala el uso de este dispositivo para la detección rápida de microorganismos beneficiosos o perjudiciales durante la vinificación.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL2003-03689.

O-11 CARACTERIZACIÓN DE LA LISINA DEL BACTERIÓFAGO A2 DE *Lactobacillus casei*

I. Rodríguez^{*1}, P. García² y J. E. Suárez^{1,2}

^{*1}Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo. C/ Julián Clavería, s/n. 33006 Oviedo, Asturias. rf.isabel@gmail.com

² Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC). Ctra. Infiesto s/n. 33300, Villaviciosa, Asturias.

El bacteriófago A2 infecta cepas de *L. casei* y *L. paracasei* y pertenece a la familia *Siphoviridae* porque posee una cabeza isométrica y un cola larga, flexible y no contráctil. Se ha secuenciado completamente su genoma, que consiste en una molécula de ADN de doble cadena de 43 411 pb con extremos cohesivos 3' sobresalientes. En él se distinguen 61 *orfs* que se organizan en módulos funcionales (García y col., 2003).

En el módulo de lisis se incluye el gen *orf17*, que codifica una holina (encargada de abrir poros en la membrana celular) y el gen *orf18* que da lugar a una lisina (responsable de la ruptura de la capa de peptidoglicano de la pared celular). Estas dos proteínas son sintetizadas por el fago en las últimas etapas del proceso de infección, resultando en la lisis celular y la liberación de la progenie que así puede ir a infectar a las bacterias vecinas.

Se ha propuesto que las lisinas fágicas podrían ser utilizadas para acelerar la maduración de los quesos ya que provocarían la lisis de los cultivos iniciadores. Esto llevaría a la liberación de los enzimas que participan en la conversión de los péptidos y triglicéridos de la leche en componentes generadores de aroma y sabor. Se conseguiría así una reducción del tiempo de maduración de los quesos, lo que implicaría beneficios en la industria láctea (Shearman y col., 1992).

En este trabajo se describe la clonación, purificación y posterior caracterización de la lisina del bacteriófago A2, incluyendo la temperatura óptima de actividad, el sinergismo con otros enzimas hidrolíticos de pared celular y el espectro de acción sobre diferentes géneros de bacterias Gram positivas.

García, P., Ladero, V. y J. E. Suárez. (2003). Analysis of the morphogenetic cluster and genome of the temperate *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Arch. Virol.* **148**: 1051-1070.

Shearman, C. A., Jury, K. y M. J. Gasson. (1992). Autolytic *Lactococcus lactis* expressing a lactococcal bacteriophage lysin gene. *Biotechnol.* **10**: 196-199.

O-12 VARIACIONES ECOLÓGICAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA TRAS CONSUMO DE YOGUR FRESCO Y YOGUR PASTEURIZADO

R. J. García-Albiach^{1,2*}, M. J. Pozuelo², S. Angulo², F. Baquero¹ y R. del Campo¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar km 9,1, 28034 Madrid.

²Dpto. de Microbiología, Universidad San Pablo-CEU, Boadilla del Monte 28036, Madrid.
raimunddo@terra.es

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 cuyos efectos no han sido comprobados científicamente.

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 cuantitativos de los grandes grupos bacterianos intestinales tras la ingesta de yogures frescos, y compararlo con la ingesta de yogures pasteurizados.

Se incluyeron 83 individuos sanos (47 mujeres, 36 hombres, edad media 23,6 años), recogiendo tres muestras de heces por individuo: T0 ó muestra basal; T1: tras consumo de 375 g. diarios de yogur fresco 15 días; y T2: tras consumo de 375 g. diarios de yogur pasteurizado 15 días. Entre la muestra T1 y la T2 existieron 15 días de lavado sin toma de yogur. 18 de los individuos no tomaron ninguna preparación de yogur y se clasificaron como controles externos al procedimiento. Se obtuvo el ADN total de las heces mediante un método comercial modificado. Se utilizaron cebadores específicos del grupo de las Bacterias lácticas, grupo Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella, *B. vulgatus*, grupo *C. perfringens*, y grupo *C. coccooides* con el sistema de PCR cuantitativa (PCR-Q) Light Cycler 1.5 (Roche) y con el kit de detección FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche).

En los resultados obtenidos, se aprecia una gran variabilidad en la muestra basal entre todos los individuos de la cantidad total de ADN para cada uno de los grupos bacterianos estudiados. Se han detectado un aumento significativo de la población total de Bacterias Lácticas y del grupo *C. perfringens* tras el consumo de ambos tipos de yogures, así como de una drástica disminución de los valores totales de ADN de Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella, y *B. vulgatus*. Para el Grupo de *C. coccooides* no se observaron variaciones ocasionadas por la ingesta de los yogures.

El consumo de yogur produce variaciones cuantitativas de los principales grupos bacterianos intestinales, con una marcada tendencia al aumento de la población láctica y del grupo *C. perfringens*, mientras que el grupo Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas y muy especialmente en *B. vulgatus*, tiende a disminuir. Ambos tipos de yogur producen efectos similares en la microbiota intestinal de la población sana.

MICROBIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN. DESTRUCCIÓN E INHIBICIÓN MICROBIANAS

O-13 EFECTO GERMICIDA DE AGUA OZONIZADA EN EL PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE PESCADO FRESCO

L. Pastoriza, M. Bernárdez, G. Sampedro, M. L. Cabo y J. J. R. Herrera*

*Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC). Eduardo Cabello, 6. 36208 Vigo, Pontevedra.
laura@iim.csic.es*

El pescado fresco, cuando se comercializa, puede llevar capturado y mantenido en hielo y refrigerado desde 24 horas hasta 14 o más días, dependiendo si procede de la pesca próxima a la costa o de barcos que realizan salidas al mar durante 15 ó 17 días. El pescado procedente de estos barcos, aunque se mantenga refrigerado, necesita desde el primer momento de su captura de una atención especial, por ejemplo, aplicar y/o combinar tecnologías de conservación, para conseguir que llegue al consumidor con el mayor grado de frescura manteniendo su calidad inicial.

En este estudio, se han combinado diferentes técnicas; el lavado del pescado con agua estéril y ozonizada en el momento de la captura, con el hielo en escamas preparado con el agua tratada utilizado en las cajas almacenadas con pescado en la bodega y con la refrigeración a 2-3°C, en la estabilidad de rape (*Lophius piscatorius*) procedente de diferentes capturas y conservado a bordo de los propios barcos durante dos semanas y una vez que llega a tierra y continúa 12 días más en cámara a 1-2°C.

Los resultados conducen a un producto de buena calidad durante un periodo de tiempo superior que cuando sólo se utiliza la refrigeración (control) como técnica habitual de conservación. Las características de calidad y el periodo de estabilidad del producto se definieron de acuerdo a límites químicos y microbiológicos de alteración en pescado fresco y a valoraciones organolépticas. Se mantienen límites microbiológicos y químicos permitidos en pescado tratado después de 15 días de almacenamiento (3 días en el barco y 12 en tierra) en relación a 9 días en el pescado control. El pescado tratado presenta unas características organolépticas mejoradas comparadas con el control, mayor brillo de la piel, mejor color en la zona ventral y en la boca, en el control más rosado, el peritoneo totalmente adherido, se desprende fácilmente en el control, aletas dorsal y caudales más enteras, mayor consistencia del músculo y retraso en la aparición del limo superficial.

O-14 ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA DE BIOCONSERVANTES EN SALMÓN

D. Bravo R. Montiel y M. Medina*

*Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. de A Coruña Km 7, 28040 Madrid.
dbravo@inia.es*

El interés por la bioconservación de alimentos se ha extendido en los últimos años al control de *Listeria monocytogenes* en pescado ahumado, aunque los estudios de inhibición del patógeno por bacterias lácticas bacteriocinogénicas son escasos en este producto. *L. monocytogenes* es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza, resistente a la sal y capaz de crecer a temperaturas de refrigeración. En el presente trabajo se ha investigado la actividad anti-*Listeria* de cuatro bioconservantes comerciales en salmón fresco.

Se ensayaron cuatro bioconservantes comerciales y dos sistemas de aplicación (polvo y solución acuosa). Los productos se mezclaron con la sal y el azúcar empleados en el proceso de elaboración de salmón ahumado y se añadieron a salmón fresco inoculado con el patógeno que se mantuvo 7 días a 8°C. Se realizaron recuentos de *Listeria* a las 2, 24 y 72 horas y a los 7 días de la adición del bioconservante. Tanto los experimentos como los análisis microbiológicos se realizaron por duplicado.

Los niveles de *L. monocytogenes* aumentaron en salmón fresco a 8°C, aproximadamente 1.5 unidades logarítmicas en las primeras 24 horas y 2,5-3 unidades logarítmicas en los 7 días en que se realizó el experimento. La adición de sal y azúcar individualmente o mezclada con los bioconservantes ensayados dio lugar a niveles de *L. monocytogenes* significativamente ($P < 0,01$) inferiores a los detectados en el salmón control sin sal, azúcar ni bioconservantes.

Todos los bioconservantes ensayados mostraron un efecto anti-*Listeria* superior ($P < 0,01$) al de la sal y azúcar, obteniéndose con uno de ellos basado en un cultivo de *Pediococcus* los recuentos más bajos a lo largo del periodo de refrigeración. Así mismo, se comprobó una mayor actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* cuando el antimicrobiano se añadió en polvo que cuando se añadió en solución acuosa ($P < 0,001$). Considerando que en la industria la mezcla de sal y azúcar permanece en contacto con el salmón fresco durante 24 horas, se confirmó el efecto anti-*Listeria* de este bioconservante en dicho periodo, más efectivo ($P < 0,01$) que la sal y azúcar, adicionado tanto en forma sólida como en solución acuosa.

A la vista de los resultados obtenidos, el empleo de bioconservantes aplicados sobre el producto fresco durante el proceso de elaboración puede considerarse un sistema de seguridad para el control de *L. monocytogenes* en la industria del salmón ahumado.

O-15 CONTAMINACIÓN POR PATULINA EN MANZANAS EN POSTCOSECHA: EFECTO DEL TRATAMIENTO FUNGICIDA Y DEL ALMACENAMIENTO EN ATMÓSFERA CONTROLADA

V. Sanchis Almenar*, H. Morales Valle, A. J. Ramos Girona y S. Marín Sillué

Dpto. Tecnología de Alimentos. ETSEA, CeRTA, Universitat de Lleida. Rovira Roure 191, 25198 Lleida. vsanchis@tecal.udl.es

La patulina es una micotoxina que se encuentra de forma natural mayoritariamente en manzanas y peras atacadas por el moho *Penicillium expansum*. Los zumos o productos derivados de manzana y pera pueden potencialmente contener patulina si han sido elaborados con frutos contaminados con esta toxina.

Debido a la estacionalidad en la producción de manzanas, y para poder tener una producción continua de zumo y subproductos, se usa la frigoconservación de esta fruta en atmósferas controladas. La atmósfera controlada reduce los niveles de CO₂ y de O₂ respecto al aire normal para evitar el desarrollo de los mohos y conseguir que la fruta mantenga la calidad el mayor tiempo posible. Según sea la presión parcial de O₂ y CO₂, hablamos de sistemas LOW o ULOW.

El objetivo del ensayo fue determinar las diferencias entre los dos sistemas de frigoconservación y los factores que pudieran influir en estas diferencias con respecto a la lesión producida en el fruto por *P. expansum* y a la acumulación de patulina. Los factores ensayados fueron: madurez del fruto al entrar en cámara de conservación, tratamiento fungicida, tiempo en cámara y posterior estancia a 20 °C, además de las diferencias interespecificas que pudieran darse entre aislados.

Dos lotes de manzanas variedad Golden con diferente grado de madurez fueron inoculados con 2 aislados de *P. expansum* y almacenados en condiciones de LOW y ULOW. Posteriormente, se introdujeron en una cámara a 20 °C durante 3 días para simular el tiempo que las manzanas, al salir de la cámara de frigoconservación y antes de ser procesadas, se depositan en tolvas a temperatura ambiente. Los diámetros de la lesión y la cantidad de patulina fueron determinados después de ambos periodos de almacenamiento (atmósfera controlada e incubación a 20 °C).

El almacenamiento en atmósfera controlada no evitó el desarrollo del hongo, pero se observó que para periodos cortos es efectivo para evitar la contaminación por patulina. El crecimiento de *P. expansum* está influido por la concentración de O₂ y CO₂, tratamiento fungicida y grado de madurez del fruto. La cantidad de patulina hallada después del período a 20 °C no estaba influida por ninguno de los factores ensayados por lo que se concluye que, en cuanto a contaminación por patulina se refiere, el tiempo en espera sin frigoconservación es más determinante que el resto de los factores analizados.

Agradecimientos: los autores agradecen al Gobierno español (proyecto CICYT AGL 2004-07549-05-01, beca BES-2003-2180, y programa Ramón y Cajal) y catalán (proyecto estratégico CeRTA 2005-2006 "Seguretat biòtica i abiòtica dels aliments") su ayuda financiera.

O-16 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NISINA, TIMOL, CARVACROL Y CYMENE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Candida lusitaniae*

A. Aznar, P. S. Fernández y A. Palop*

Área de Tecnología de los Alimentos, Dpto. de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48 30203 Cartagena. Murcia. alfredo.palop@upct.es

Aunque el papel de las levaduras es secundario en la contaminación microbiana de alimentos, las condiciones ambientales de conservación de éstos, que tienden a inhibir el crecimiento de bacterias, ha favorecido la aparición de levaduras contaminantes, causantes de alteraciones en las características organolépticas de alimentos. En los alimentos elaborados a partir de frutas y verduras ácidas predominan las levaduras porque son muy tolerantes a la elevada acidez y porque con frecuencia son capaces de crecer anaeróbicamente y sus necesidades nutritivas son mínimas. *Candida* es uno de los géneros aislado con mayor frecuencia en zumos de frutas.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de nisina, timol, carvacrol y cimene sobre el crecimiento de *Candida lusitaniae*. Se ha estudiado el efecto de los diferentes antimicrobianos, sobre el crecimiento de *Candida lusitaniae* en medio de cultivo. La duración del tiempo de latencia y la tasa de crecimiento se han calculado mediante el modelo de Baranyi. Utilizando la herramienta Best fit de @Risk se estudiaron las funciones de distribución para establecer condiciones seguras de conservación.

La adición de nisina no afecta al crecimiento de la levadura sin embargo la adición de aceites esenciales de timol, carvacrol y cimene inhibe el crecimiento de la levadura a concentraciones superiores a 1 mmol/L al menos durante 21 días a 25 °C. Por debajo de esta concentración se observan inhibiciones en el crecimiento a concentraciones crecientes de los distintos antimicrobianos. El ajuste mediante funciones de distribución permitiría establecer condiciones seguras de conservación de los alimentos.

O-17 INFLUENCIA DE LA ADAPTACIÓN DE *Salmonella typhimurium* A LA ACIDEZ EN SU RESISTENCIA AL CALOR Y A LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE.

N. Sagarzazu Grau*, G. Cebrián Auré, S. Condón Usón y P. Mañas Pérez

Facultad de Veterinaria, Departamento PACA-Tecnología de los Alimentos. C/ Miguel Servet, 177, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza. nsagar@unizar.es

El consumidor de hoy en día reclama alimentos con características similares a los productos frescos, pero con las máximas garantías sanitarias. La combinación de varios procesos de conservación a baja intensidad, en lo que se denominan los procesos combinados, es una tecnología que está despertando gran interés en los últimos años. Sin embargo, existe una gran preocupación por la posibilidad de que los microorganismos sean capaces de desarrollar resistencias cruzadas, incrementándose su capacidad de supervivencia frente al proceso combinado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la importancia de la adaptación a la acidez en *Salmonella* en la resistencia al calor y a los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF). La exposición de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella serftenberg* 775W a un choque ácido a pH subletal incrementó su resistencia a un tratamiento posterior a pH letal (2,5). Para ambos microorganismos, el incremento de resistencia al medio de pH 2,5 fue mayor cuando la adaptación se realizó a pH 4, en comparación a pH 4,5 y 5. El tiempo de adaptación (5, 30 y 60 minutos) no ejerció influencia alguna, de modo que cinco minutos de exposición al pH subletal fueron suficientes para inducir la respuesta adaptativa en los dos serotipos de *Salmonella*. Con objeto de evaluar la aparición de resistencia cruzada se obtuvieron las curvas de supervivencia a pH 4 y a pH 7 frente al calor (56°C) y frente a los pulsos eléctricos (16.5 kV/cm) de células de *Salmonella typhimurium* nativas y preadaptadas a la acidez (pH 4 durante 30 min.). La adaptación no produjo un incremento de la resistencia a los pulsos eléctricos. Por el contrario, sí que incrementó la resistencia al calor de *S. typhimurium*, pero únicamente cuando el pH del medio de calentamiento fue de 4.

Estos resultados nos permiten concluir que *S. typhimurium* desarrolla una respuesta de adaptación tras la exposición a pH subletal durante tiempos muy reducidos, que le protege frente a la posterior acción de los tratamientos térmicos a pH ácido, pero no frente a los pulsos eléctricos de alto voltaje.

O-18 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PULSOS DE LUZ EN LA INACTIVACIÓN DE *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* EN AGAR NOBLE

E. Hierro Paredes, J. A. Ordóñez Pereda, L. de la Hoz Perales y M. Fernández Álvarez*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. hierro@vet.ucm.es.

Es bien conocido el peligro que representa para la salud la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, encontrándose *Salmonella* en general y *S. enterica* serovar *enteritidis* en particular entre los patógenos que más preocupan.

Entre las nuevas tecnologías encaminadas a la inactivación de microorganismos en los alimentos y materiales en contacto con los mismos se encuentra la aplicación de pulsos de luz. Esta tecnología consiste en la aplicación de destellos de luz “blanca” de amplio espectro (desde 200 nm en la región UV hasta 1 mm en la IR) y de muy corta duración (milésimas e incluso millonésimas de segundo).

Este trabajo constituye un estudio preliminar del efecto de los pulsos de luz en *S. enteritidis* en un medio sólido elemental (agar noble) para su posterior aplicación a matrices alimentarias apropiadas para este tratamiento. Dado su escaso poder de penetración, esta tecnología está especialmente indicada para superficies, lo que en principio la haría muy adecuada para el tratamiento de productos cárnicos loncheados y huevo entero.

Para los ensayos se utilizó una cepa de *S. enteritidis* suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (ATCC 13076). La aplicación de los pulsos de luz se realizó en un equipo Steribeam SBS-XeMatic-2L-A y como matriz se empleó agar noble al 1,5% en placa de Petri con un espesor de 15 mm. El agar se inoculó con una concentración de microorganismos de 10^6 u.f.c./ml, tanto en superficie como en masa. Se aplicaron 0, 1, 2, 3, 4 y 5 pulsos. El aparato se ajustó a su máxima energía de modo que el tratamiento más intenso (5 pulsos) equivalía a 5 J/cm^2 . El recuento de los supervivientes se hizo en agar tripticosa soja (TSA), con incubación a 37°C durante 24 horas.

El tratamiento mostró una gran eficacia, dado que con un sólo pulso se consiguieron entre dos y tres reducciones decimales. La aplicación de tratamientos progresivamente más intensos incrementó de forma gradual la inactivación de *S. enteritidis*, siguiendo un patrón similar tanto en superficie como en profundidad. Se necesitó un tratamiento de 5 pulsos para garantizar la inactivación total (6D) de este microorganismo en el 100% de las muestras analizadas. Estos resultados son prometedores y, actualmente, se están llevando a cabo experimentos en huevo entero con el fin de conocer si es posible la descontaminación de la cáscara, dado que es bien conocido que ésta alberga frecuentemente *Salmonella* spp.

Trabajo financiado por la Comunidad de Madrid (proyecto GR/SAL/0545/2004).

COMUNICACIONES POSTER

P-01 OBTENCIÓN DE FAGOS-STX2 RECOMBINANTES PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSDUCCIÓN EN ALIMENTOS

R. Serra-Moreno, J. Jofre y M. Muniesa*

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. .Universitat de Barcelona. ruthserra@ub.edu

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) actúa como agente causal de enfermedades como colitis hemorrágica y síndrome de uremia hemolítica. La principal fuente de infección por estos patógenos es el consumo de alimentos contaminados y agua. El principal reservorio de STEC es el ganado vacuno. STEC son especialmente virulentas debido a la presencia de factores de patogenicidad en su genoma, entre los que destaca el gen que codifica la toxina Shiga (*Stx*), que puede ser de dos tipos: *Stx1* y *Stx2*. Ambas se hallan codificadas en el genoma de fagos lambdoides (bacteriófagos-stx), que se encuentran en estado de profago en las STEC. Al activarse el ciclo lítico del profago se promueve la expresión de dicha toxina.

Cuando infectan nuevas bacterias, los bacteriófagos-stx2 actúan como vectores en la transmisión del carácter de la toxina (transducción) y convierten las cepas infectadas en patógenas (lisógenos o transductantes).

Aunque no hay estudios previos, existe la posibilidad de que se produzca transducción por bacteriófagos-stx fuera del tubo digestivo, como en el caso de alimentos, con el riesgo sanitario que implicaría para el consumidor. Para evaluar esta posibilidad es necesario obtener herramientas que permitan el seguimiento de los posibles transductantes. El objetivo de este trabajo fue el de obtener bacteriófagos-stx recombinantes que incorporaran un gen de resistencia a antibióticos, a fin de evaluar su capacidad lisogénica, detectando a los posibles transductantes mediante selección por antibiótico.

Para ello se utilizaron ocho bacteriófagos-stx2 procedentes de cepas STEC aisladas de carne de vacuno. Éstos fueron modificados sustituyendo parte del gen *stx2* por genes de resistencia a tetraciclina o cloramfenicol. Ésto se realizó aplicando un método modificado del sistema Red Recombinasa, que permite la recombinación entre el gen al que se desea trincar y el fragmento que contiene el gen de resistencia. La construcción de los fragmentos conteniendo el gen de resistencia se realizó mediante un sistema de 3S-PCR.

Los resultados indicaron que las modificaciones aplicadas al método de la Red Recombinasa fueron efectivas para la producción de fagos-stx2 recombinantes. Se obtuvieron 16 bacteriófagos-stx2 recombinantes, portadores de resistencia a tetraciclina y cloramfenicol, que fueron transducidos en condiciones de laboratorio a nuevos huéspedes (cepas de laboratorio de *E. coli*).

Los fagos recombinantes, originarios de cepas aisladas de animales, obtenidos en este estudio son herramientas muy útiles que amplían las posibilidades para la evaluación de la transducción de fagos-stx en cepas de *Escherichia coli* en diferentes alimentos.

P-02 VALIDACIÓN CUALITATIVA DE *E. coli* O157:H7 POR EL SISTEMA MINIVIDAS®

G. Martínez Reina, A. M. Sánchez Cánovas, M. A. Castaño Garrido, M. D. Vilella Martínez, M. J. Barnés Campos y A. Vivas Gil*

**Laboratorio de Microbiología. Consejería de Sanidad de Murcia. Ronda de Levante, nº 11, 30008 Murcia. mgracia.martinez@carm.es*

Los requisitos generales relativos a los Laboratorios de ensayo se encuentran recogidos en la Norma UNE EN-ISO/IEC 17025. Según esta Norma el Laboratorio debe validar los métodos no normalizados o las modificaciones de los métodos normalizados que emplea. En nuestro Laboratorio estamos en trámites de validar, entre otras, la determinación de *E. coli* O157:H7 mediante el sistema Minividas®.

Se han empleado tres matrices: queso, hamburguesa y longaniza, e inicialmente se comprobó que no contuvieran *E. coli* O157. En caso contrario, se esterilizaron en autoclave.

Para establecer el "Límite de detección" se reconstituyó una cepa de *E. coli* O157:H7 y, a partir de ella, se preparó una dilución conteniendo unas 20-30 ufc/mL. De aquí se obtuvieron las diluciones 1/2, 1/4,...1/128 (se comprobaron las concentraciones mediante siembra en Agar Nutritivo). Se añadió 1 mL de cada dilución a 25 g de muestra y 225 mL de TSB modificado con Novobiocina (mTSB). Se hicieron 10 repeticiones/dilución. Tras incubar, se transfirió 1 mL a Caldo McConkey con Telurito Cefixima y después de incubar se analizaron con el kit "VIDAS ECO" y el sistema MiniVidas®, de Biomerieux. Las muestras positivas se confirmaron mediante resiembra en placas de SMAC y posterior prueba de aglutinación de las colonias sospechosas. Se realizó una Tabla de Resultados, donde se sumaron todas las "Presencias" para cada dilución. Se estableció como Límite de Detección la concentración correspondiente a la última dilución en la que la probabilidad de detectar Presencia fuera >90%. Obtuvimos un valor de 4,5 ufc/mL (dilución 1/128).

Se hizo después una Tabla de Experimentos donde se inocularon 25 g de muestra en mTSB con 1 ml de suspensión de alguno de los siguientes microorganismos: *Salmonella choleraesuis*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* (aproximadamente 100 ufc/mL) y/o 1 mL de la mayor dilución detectable de *E. coli* O157 (dilución 1/128). Se comprobaron sus concentraciones mediante siembra en Agar Nutritivo. En total fueron 15 determinaciones, con diversas combinaciones de matrices y microorganismos, comprobándose la Presencia o Ausencia de *E. coli* O157:H7 según el método descrito. Tras comprobar las concordancias entre resultados teóricos y reales, se encontró: un 100% de Sensibilidad, Especificidad y Eficiencia y un 0% de Falsos Positivos y Falsos Negativos.

Nuestros resultados coinciden con los realizados por Biomerieux (validación AFNOR), ya que para un nivel de concentración de 1-10 ufc/25 g encontraron un 93,7% de resultados positivos. Y sobre 272 muestras analizadas obtuvieron: 0 Falsos Positivos y 4 Falsos Negativos.

P-03 PRESENCIA DE *Escherichia coli* Y COLIFORMES DE DIVERSOS TIPOS DE QUESOS MEXICANOS

I. Caro^{*1}, S. Palacios-Vargas¹, S. Soto-Simental¹, J. F. Hernández-Chávez¹, R. Campos-Montiel¹ y J. Mateo²

¹ Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. Av. Universidad Km, 1. C.P. 43600. TULANCINGO HGO.

² Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n. 24071, León, España. dhticc@unileon.es

En México existe una gran variedad de productos lácteos, principalmente quesos. Una de las regiones donde más queso se produce es el Valle de Tulancingo (Estado de Hidalgo), siendo los principales tipos de quesos elaborados los siguientes: Panela (queso fresco de coagulación enzimática), Oaxaca, Manchego mexicano, Manchego botanero, Tenate y Morral (quesos de muy corta maduración de coagulación mixta). Sin embargo, existe poca información sobre las características físico-químicas y microbiológicas de los quesos de dicha región. Las autoridades mexicanas establecen los criterios microbiológicos (límites máximos y mínimos) para los quesos frescos, procesados y madurados (NOM121/1994). Dentro de los microorganismos recogidos en dicha norma están los coliformes y *E. coli*. La presencia de estos microorganismos en leche y productos lácteos esta asociada por un lado, a las malas prácticas higiénicas en la elaboración del queso y por el otro lado, a una contaminación fecal. Este trabajo pretende poner en evidencia la presencia de coliformes y *E. coli* en muestras de distintos tipos de quesos mexicanos.

Se tomaron un total de 50 muestras de quesos tipo Panela, tipo Oaxaca, Manchego mexicano, Manchego Botanero, Morral y Tenate, en diferentes puntos de venta del Valle de Tulancingo. Estas muestras correspondieron a 17 industrias distintas. A las mencionadas muestras se determinó los siguientes parámetros: fosfatasa alcalina (AOAC, 1965), pH (Bradley *et al.*, 1993), Aw mediante punto de rocío (Aqualab CX-2 Devices), coliformes y *E. coli* mediante placas Petrifilm™ (3M Santé, Cergy Pontoise Cedex, Francia).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos dividir dos formas de fabricación aquellos elaborados principalmente con leche cruda como el queso Tenate (100%) y el queso tipo Oaxaca con un 70% y el resto elaborado normalmente con leche pasteurizada. Los valores de pH encontrados fueron de $6,13 \pm 0,41$ para el queso tipo Panela y estuvieron en el rango de 4,70-5,20 para el resto de los quesos. Con respecto a la Aw, los valores fueron de $0,986 \pm 0,004$ para el queso Panela y estuvieron entre 0,952 y 0,984 en el resto de los quesos. Los recuentos de coliformes y *E. coli* fueron generalmente altos para todos los quesos mexicanos, especialmente para el queso tipo Panela los cuales oscilaron entre $6,25 \pm 0,87$ y $4,62 \pm 1,13$ Log ufc/g, respectivamente, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre este tipo de queso y el resto de quesos estudiados principalmente para los coliformes.

Es necesario destacar que a pesar de los bajos valores de pH observados para algunos quesos mexicanos la presencia de coliformes y *E. coli* fue elevada. Los quesos elaborados con leche cruda y los quesos elaborados con leche pasteurizada no presentaron grandes diferencias en el contenido de estos microorganismos, esto podría indicar que es necesario mejorar las buenas prácticas de manufactura en los quesos elaborados en esta región.

P-04 DETERMINACIÓN DE *Salmonella* spp. EN ALIMENTOS EN LA COMUNIDAD AUTONOMA DEL PAÍS VASCO. 1998-2005

D. Coll Jordá^{*1}, *V. Bravo Vázquez*², *B. de Pablo Busto*², *C. Oria Eraso*² y *C. Zigorraga Arrien*¹

¹ Dirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad. Gobierno Vasco. Donostia-San Sebastián 1010 Vitoria-Gasteiz, Alava

² Subdirección de Salud Pública. Departamento de Sanidad. Gobierno Vasco. sanalim1-san@ej-gv.es

La salmonelosis es una de las más frecuentes y graves infecciones y toxiinfecciones transmitidas por alimentos, por lo que es de especial importancia su investigación en los programas de control de las autoridades competentes de Salud Pública.

En las actividades de control oficial se investiga de forma habitual la presencia de *Salmonella* en alimentos comercializados y elaborados en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Se trata de muestras simples, recogidas en los establecimientos de elaboración y comercialización. Se presentan los resultados, obtenidos entre 1998 y 2005, para aquellos alimentos en los que se investigó la presencia de *Salmonella*. Las analíticas se realizaron en las sedes del laboratorio normativo de Salud Pública de la CAPV que se encuentran acreditadas para esa determinación según Norma ISO/ICE 17025

De un total de 4.515 muestras de alimentos de origen animal investigadas, en 370 (8,19 %) se ha detectado la presencia de *Salmonella* spp. Para los alimentos en los que se han tomado 100 o más muestras, los mayores porcentajes de detección correspondieron a derivados de carne de ave, 29,5% (n=407); carne de ave, 23,4% (n=558); huevos, 8,4% (n=1188); carne picada de vacuno, 5,0% (n=100); productos cárnicos cocidos loncheados, 0,8% (n=748) y productos cocinados elaborados a base de huevo, 0,7% (n=296). No se aisló de otros productos cárnicos (n=145) ni de helados elaborados a base de leche (n=145).

Otros alimentos en los que se ha investigado la presencia de *Salmonella* spp. pero en los que el número de muestras tomadas fue inferior a 100 fueron: ovoproductos (n=59), leche y productos lácteos (n=85), precocinados (n=56), productos cárnicos (n=67) y ahumados (n=33). En estos últimos grupos, sólo una muestra de ovoproductos fue positiva.

Los alimentos de origen animal más frecuentemente contaminados por *Salmonella* fueron los procedentes de las aves (carne y huevos) y la carne picada de vacuno. Si consideramos su forma de consumo, los alimentos con mayor riesgo son los elaborados a base de huevo crudo o carne de ave poco cocinada.

Para una disminución de la incidencia de salmonelosis en la población, es necesaria la adopción de medidas preventivas en el sector avícola, tanto en la producción primaria como a lo largo de la cadena de manipulación-comercialización de los alimentos a base de huevo y carne de ave. Por ello, los programas de minimización y control que se están realizando en dicho sector están plenamente justificados.

P-05 BROTES DE TOXI-INFECCIÓN ALIMENTARIA POR SEROTIPOS POCO FRECUENTES DE *Salmonella* EN ASTURIAS (1998-2005)

M. Bances González^{*1}, *A. Herrero Fresno*², *M. R. Rodicio Rodicio*², *M. C. Mendoza*² y *M. A. González-Hevia*¹

^{*1}Laboratorio de Salud Pública, Consejería de Salud y Servicios Sanitarios del Principado de Asturias, Carretera del Rubín s/n, 33011, Oviedo. margabg@princast.es

²Departamento de Biología Funcional (Área de Microbiología). Universidad de Oviedo e Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA), Julián Clavería 6, 33006 Oviedo.

En el Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias durante el periodo 1998-2005 se registraron 5817 aislamientos de *Salmonella* (5646 clínicos, 519 de ellos asociados a 107 brotes; junto con 171 de alimentos, 31 asociados a brotes). Ocho de los 107 brotes (seis comunitarios y dos familiares) fueron causados por serotipos (Hadar, Panama e Infantis) poco frecuentes, cuyo reservorio mayoritario son las gallináceas. En esta comunicación se presenta la caracterización de los aislamientos responsables de los ocho brotes, utilizando como marcadores los perfiles de sensibilidad/resistencia a antimicrobianos; plásmidos, amplificación de secuencias aleatorias (RAPD) y macrorrestricción con la endonucleasa *Xba*I, seguida de electroforesis en campo pulsante (PFGE).

El serotipo Panamá estuvo implicado en cinco brotes, cuatro comunitarios (tres en 1998 y uno en 2003) y otro familiar (en 2003). Los cuatro comunitarios (con 16, 3, 3 y 13 episodios, y asociados a alimentos diversos) fueron causados por la misma cepa, resistente a ácido nalidíxico, libre de plásmidos y con perfiles RAPD y *Xba*I-PFGE característicos. La cepa responsable del brote familiar era sensible a todos los agentes ensayados, no contenía plásmidos, presentaba un perfil RAPD claramente diferente al anterior, pero el mismo perfil *Xba*I-PFGE. Ambas cepas se adscribieron a un grupo o linaje endémico en el Principado de Asturias, encontrado tanto en muestras clínicas como en productos avícolas.

El serotipo Infantis originó un brote familiar en 2001 y otro comunitario en 2004, cada uno representado por una cepa sensible a todos los antimicrobianos ensayados, pero con perfil *Xba*I-PFGE diferente. Las dos cepas pueden considerarse endémicas, aunque de baja frecuencia, ya que los mismos perfiles fueron observados en aislamientos asociados a casos esporádicos.

El serotipo Hadar fue responsable de un brote que afectó a 2883 personas en España durante el verano de 2005, asociado a pollo asado comercial con salsa contaminada. En Asturias, con 15 casos comunicados, la tasa de afectados fue proporcionalmente inferior a la de otras comunidades autónomas. Los aislamientos asociados a estos casos fueron idénticos: resistentes a ácido nalidíxico, ampicilina, tetraciclina y estreptomycin, pertenecían al fagotipo PT2, presentaban el mismo perfil RAPD y el mismo perfil *Xba*I-PFGE. Este perfil es idéntico al obtenido a partir de aislamientos implicados en el brote en otras comunidades autónomas (A. Echeita, comunicación personal), y también al identificado como mayoritario entre los aislamientos clínicos recuperados en Asturias durante el periodo 1993-2001. Así, la cepa implicada en el brote de 2005 pertenece a un linaje endémico.

P-06 BROTES DE TOXIINFECCION ALIMENTARIA POR EL TIPO EMERGENTE DE *Salmonella* serotipo *typhimurium* (pUO-StVR2) REGISTRADOS EN ESPAÑA DURANTE 2002-2004

A. Herrero Fresno^{*1}, M. R. Rodicio Rodicio¹, M. Bances González², M. A. Gonzalez-Hevia², A. Echeita³ y M. C. Mendoza Fernández¹

^{*1}Departamento de Biología Funcional. Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo. Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo. anapoitiers@yahoo.es

²Laboratorio de Salud Pública. Consejería de Salud y Servicios Sanitarios del Principado de Asturias, Carretera del Rubín s/n, 33001 Oviedo.

³Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda-Pozuelo, Majadahonda, 28220 Madrid.

A principios de la década de los 90 emerge una “geno-variedad” de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, que alberga plásmidos (pUO-StVR) de gran tamaño (100-140 kb) derivados de pSLT90 (plásmido-V del serotipo Typhimurium) mediante la adquisición de una región-R compleja, y pérdida de una región-V que afecta al operon *pef* y a los genes *rsk* y *repF1B*. La región-R incluye los genes *tet(B)*, *catA1*, *bla_{OXA}*, *aadA1*, *sul1*, y *qacEΔ1* (resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, estreptomycin-espectinomycin, sulfamidas y antisépticos de amonio cuaternario, respectivamente). Los últimos cuatro genes forman parte de un integrón de clase I que junto con *merA* (resistencia a mercurio) se han asociado al transposon Tn2603. El objetivo de este trabajo fue investigar la implicación de esta geno-variedad en brotes de toxiinfección alimentaria en España durante 2002-2004.

En el citado trienio, el Centro Nacional de Microbiología registró 36 brotes, representados por 180 aislamientos de *S. typhimurium*. Para diferenciar las geno-variedades implicadas, aislamientos representativos de cada brote fueron analizados con tres marcadores: fenotipo-R, gen *bla_{OXA}*, e integrones de clase 1 con región variable de 2000 pb. Aislamientos de cinco brotes (B1-B5) fueron positivos para los tres marcadores. B1, B2 y B4 estaban registrados como de tipo familiar, y ocurrieron en Oviedo-2002, Tarragona-2002 y Madrid-2003. B3, tuvo lugar en un restaurante, y se consideró de tipo mixto por identificarse, además, aislamientos del serotipo Enteritidis. B5 se registró en una escuela infantil en Oviedo-2004 y afectó a 22 niños de entre 8 meses y 3 años.

Aislamientos representativos de los cinco brotes fueron analizados con otros marcadores para confirmar su pertenencia a la geno-variedad emergente y discriminar cepas. Todos ellos presentaban el mismo R-fenotipo/R-genotipo, perfil-V, integrón con las casetas *bla_{OXA}-aadA1a*, y plásmido pUO-StVR de 125-130 kb, pero se diferenciaban en otros caracteres como fagotipo, perfil de plásmidos y perfil de macrorrestricción *XbaI/BlnI*-PFGE, que permitieron diferenciar tres cepas. B1-B3 fueron causados por una de las cepas (c1, prevalente en España), B4 por otra (c2), y en B5 estuvieron implicadas dos cepas (c1 en 21 episodios y c3 en el otro). Las tres cepas se podrían considerar endémicas en España dado que se vienen detectando desde hace años en muestras clínicas y de alimentos cárnicos.

Los marcadores utilizados podrían ser aplicados en la vigilancia epidemiológica de esta geno-variedad, incluyendo tanto el estudio de su reservorio animal y alimentos de riesgo, como su mantenimiento en el tiempo y posible dispersión en otros países.

P-07 CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES DE CLASES 1 Y 2 ENCONTRADOS EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS

I. Rodríguez Fernández*¹, M.C. Martín Martín², A. Herrero Fresno¹, M. C. Mendoza Fernández¹ y M. R. Rodicio Rodicio¹

*¹Área Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo. eirene80@yahoo.es

²Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Villaviciosa, Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias.

La transferencia génica horizontal contribuye eficazmente a la dispersión de resistencia a agentes antimicrobianos (R) en ambientes con fuerte presión selectiva, por ejemplo hospitales y granjas. En ella intervienen elementos genéticos móviles (EGMs) como plásmidos, transposones e integrones. Los integrones están especializados en la captación y expresión de genes-R y suelen formar parte de transposones (Tn). Los de clase 1 (frecuentemente asociados a la familia del Tn21) son comunes en aislamientos de *Salmonella* de diferentes orígenes, mientras que los de clase 2 (asociados al Tn7) sólo se han descrito en cepas concretas de *Paratyphi B*, *Typhimurium* y *Enteritidis*.

En un rastreo de integrones en *Salmonella* (de origen clínico, alimentario y ambiental), se detectó un integrón de clase 2 con la región variable [2300 pb/*dfrA1-sat1-aadA1*] en 10 aislamientos pertenecientes a los serotipos Virchow (6), Panama (2), Worthington (1) y Grumpensis (1) y recogidos en Asturias entre 1990-1998. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización de estos aislamientos. Los pertenecientes al mismo serotipo presentaron perfiles de macrorrestricción genómica (*Xba*I-PFGE) similares y claramente diferentes a los de otros serotipos. Todos ellos fueron resistentes a 4 o más antibióticos no relacionados, y portaban al menos un plásmido de gran tamaño (240-275 kb) que en 9 de los 10 casos pudo ser transferido por conjugación. La hibridación de sondas gen-específicas con perfiles S1- y *Xba*I-PFGE de los aislamientos de *Salmonella* y los transconjugantes obtenidos, junto con experimentos de amplificación por PCR, reveló la asociación del integrón de clase 2 a un Tn7 completo en el plásmido conjugativo del aislamiento Worthington y en el cromosoma de un aislamiento Panama y otro Virchow. Los demás contenían una única copia plasmídica del integrón asociado a un Tn7 defectivo. En los 10 aislamientos se detectó, también, un integrón de clase 1 con dos tipos de regiones variables: [1000 pb/*aadA1*] en 6 y [2300 pb/*sat-smr-aadA1*] en 2. El integrón de clase 1 estaba asociado a Tn21 y Tn9 en todos los casos, excepto en un aislamiento Panama, donde Tn9 aparecía incompleto. Cabe destacar, finalmente, que los integrones de clase 2, a diferencia de los de clase 1, no fueron detectados con posterioridad a 1998.

Estos resultados constituyen un ejemplo de la selección, acumulación y dispersión de EGM portadores de determinantes-R en diferentes serotipos no tifoideos de *Salmonella*, causa mayoritaria de toxiinfecciones alimentarias en España.

P-08 INHIBICIÓN DE LA ADHERENCIA DE *Salmonella* spp. A GOMA TRATADA CON NISAPLÍN

J. Carballo y A. B. Araújo*

Área de Microbiología. Dpto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias de Ourense. Universidad de Vigo. As Lagoas s/n, 32004 Ourense. carballo@uvigo.es

Salmonella spp. es una bacteria patógena capaz de adherirse a superficies y, formar biopelículas. A pesar de las mejoras en sanidad e higiene, la salmonelosis continúa siendo un grave problema económico y para la salud; de hecho, esta bacteria ha sido aislada de diferentes zonas en industrias de procesado de alimentos (1, 2, 4). La nisina es una bacteriocina con efecto antimicrobiano conocido frente a bacterias Gram-positivas, que ha sido capaz de reducir la adherencia de *L. monocytogenes* a materiales utilizados en la industria alimentaria (3). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la adsorción de nisina en goma sobre la adherencia de *Salmonella* spp. a este material. Para ello se han utilizado tres cepas de *Salmonella* spp., aisladas de alimentos, que se adhirieron a goma tipo 158, de uso común en la industria alimentaria, tratada con Nisaplin (preparado comercial conteniendo nisina) y sin tratar (3). Las bacterias, una vez adheridas al material, fueron despegadas por sonicación (30w, 20s) y su número se determinó mediante recuento en placa (4), expresándose el resultado como "número de UFC adheridas/mm² de goma". *Salmonella* spp. mostró un menor grado de adherencia a la goma con Nisaplin adsorbido que al material control. Por otro lado, se ha comprobado que este efecto inhibitor del Nisaplin no es debido a la actividad antisalmonela de la nisina, puesto que cuando se pusieron en contacto discos de goma con Nisaplin adsorbido con cultivos en placa de estas bacterias no se observaron halos de inhibición del crecimiento, confirmándose así que esta bacteriocina no presenta actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas. Así pues, la explicación del efecto inhibitor de la adherencia detectado habría que buscarla en la presencia de proteínas (la nisina entre ellas) presentes en el Nisaplin y que una vez adsorbidas en la superficie de la goma dificultarían de manera inespecífica la adherencia de las bacterias. Éste podría ser el comienzo de estudios relevantes para la industria alimentaria en su lucha contra la presencia de bacterias patógenas adheridas a sus superficies.

1. Carballo, J., (2001). Alimentaria, Marzo, 19-25.
2. Davies, R.H. y Breslin, M., (2003). J. Appl. Microbiol., 94, 191-196.
3. Guerra, N.P., Araújo, A.B., Barrera, A.M., Agrasar, A.T., Macías, C.L., Carballo, J., Pastrana, L., (2005). J. Food Protect., 68, 1012-1019.
4. Sinde, E. y Carballo, J., (2000). Food Microbiol., 17, 439-447.

P-09 VALORACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A *Listeria monocytogenes*: INFLUENCIA DE MARCAS Y DEL FORMATO DE PRESENTACIÓN DE ALIMENTOS DE CONSUMO DIRECTO EN NAVARRA

V. Garrido, I. García-Jalón y A. I. Vitas*

Dpto. Interfacultativo de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. Irunlarrea 1, 31008 Pamplona. avitas@unav.es

Una de las etapas clave en la valoración de riesgos es evaluar la exposición de la población al patógeno por consumo de los alimentos implicados. En el caso de la transmisión de la listeriosis, es bien conocido que los alimentos listos para consumir (RTE) que soportan el crecimiento del patógeno y se conservan en refrigeración más de una semana son los de mayor riesgo. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos RTE de diferentes marcas y presentaciones en el mercado navarro, que proporcionen datos actuales para la valoración de la exposición.

La investigación y recuento de *L. monocytogenes* en 800 muestras de productos RTE (salmón y trucha ahumada, cárnicos cocidos y paté) se realizó según NF EN ISO 11290-1 y 11290-2. Las muestras fueron adquiridas en puntos de venta del mercado navarro, con presentación a vacío de los 4 tipos de productos (n=559), mientras que a granel sólo se obtuvieron cárnicos cocidos y paté (n=241). Se estudiaron todas las marcas presentes en el mercado de los 4 productos (n=45), realizándose además un estudio del grado de contaminación cruzada en 100 tiendas de venta a granel, para lo cuál se tomaron al menos 2 muestras de productos diferentes en la misma tienda. Las cepas aisladas fueron subtipadas por serología y electroforesis en campo pulsado, estudiando la similitud de los patrones mediante el programa Gel Compar II® (Applied Maths).

Las 50 cepas de *L. monocytogenes* aisladas en este estudio muestran una incidencia global del 6,2%. La prevalencia fue diferente en función del tipo de producto y de la marca. Además se han encontrado diferencias significativas en la incidencia entre productos envasados a vacío y compra a granel, con una mayor prevalencia en este último grupo.

La subtipado confirmó la presencia de patrones repetidos dentro de las marcas y/o establecimientos de compra. En el caso del salmón, también se ha observado un idéntico patrón molecular en marcas diferentes, lo que apunta a una contaminación en los criaderos con una cepa bien adaptada a dichos ambientes.

La presencia de un mismo patrón molecular en pescados ahumados de marcas diferentes sugiere que la contaminación se produce en el sector primario (criadero). Sin embargo, la existencia de marcas libres del patógeno demuestra la posibilidad de controlar el proceso de producción.

La mayor incidencia en la presentación a granel sugiere la necesidad de tomar medidas higiénicas más estrictas en las zonas de loncheado y envasado para disminuir el riesgo de listeriosis.

P-10 CONTAMINACIÓN CON *Listeria monocytogenes* DE SEROTIPO 4B EN PRODUCTOS ELABORADOS DE POLLO CAUSADA POR UNA ÚNICA CEPA PROCEDENTE DE UN INGREDIENTE

V. López Alonso^{*1}, S. Ortiz Jareño¹, A. Corujo Fernández², P. López Abarquero¹, J. Navas Fernández¹, R. Moreno Temprado² y J. V. Martínez Suárez¹

¹Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña km 7'5, 28010 Madrid. victorialop@inia.es

²Food Research Centre (Nutreco), 45950 Casarrubios del Monte, Toledo.

En una planta de productos elaborados de pollo se realizaron durante 2005 muestreos rutinarios con el fin de evaluar y prevenir la contaminación por *L. monocytogenes* y otros patógenos en los productos finales.

Los muestreos realizados durante el mes de agosto determinaron la presencia de *L. monocytogenes* en distintos productos finales. El análisis mediante una PCR multiplex que identifica los principales serotipos de *L. monocytogenes* mostró que una parte de los aislados (14 de 80, 17,5%) pertenecían al serotipo 4b. Este serotipo se encontraba en 6 productos finales de diferentes líneas de producción (albóndigas, brochetas, hamburguesas frescas y congeladas, salchichas rojas y flamenquines).

El análisis de todos los aislados de serotipo 4b mediante electroforesis en gel en campo pulsante con las enzimas AscI y ApaI y mediante la secuenciación del gen *actA* reveló que todos eran genéticamente idénticos, lo que indicaba un origen común de la contaminación.

L. monocytogenes puede aislarse regularmente del suelo y de las superficies de los utensilios y equipo de procesado. En este caso, sin embargo, se comprobó que los productos finales contaminados con la cepa 4b procedían de distintas líneas de producción y en cada una de ellas se encontraban también otros productos que no estaban contaminados. El análisis de los ingredientes de los productos contaminados y no contaminados dio como resultado la asociación inequívoca de la cepa 4b con la papada de cerdo incorporada como ingrediente en determinados productos.

En la propia papada de cerdo de un determinado proveedor se aisló también *L. monocytogenes* en repetidas ocasiones (24 aislados). La comparación de 8 aislados de serotipo 4b procedentes de la papada de cerdo con los aislados del mismo serotipo de los productos contaminados confirmó que se trataba de la misma cepa. La sustitución de este ingrediente eliminó la contaminación de los productos elaborados con *L. monocytogenes* de serotipo 4b.

P-11 EXTRACCIÓN DE ADN DE *Listeria monocytogenes* DE PRODUCTOS CÁRNICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

D. Rodríguez-Lázaro^{*1} y *M. Hernández*²

^{*1} *Bacterial Molecular Pathogenesis Group, Faculty of Medical and Veterinary Sciences, University of Bristol, BS40 5DU Langford, Bristol. United Kingdom. david.rodriguez@bristol.ac.uk*

² *Laboratorio de I+D Agroalimentario, Subdirección de Investigación y Tecnología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Carretera de Burgos, Km.119, 47.071 Valladolid. España.*

En este trabajo se describen dos procedimientos para la extracción de ADN genómico de *Listeria monocytogenes* de productos alimentarios usando como modelo un producto cárnico cocido, y la evaluación de la calidad y adecuación de éste para su posterior aplicación en un sistema de detección específico de esta bacteria patógena basado en la técnica de la PCR cuantitativa a tiempo real.

Los procedimientos de extracción utilizados fueron un protocolo no comercial basado en el empleo de la resina Chelex-100, y el kit comercial Wizard DNA. Para evaluar la reproducibilidad y reproductibilidad de cada protocolo de extracción de ADN se realizaron tres experimentos independientes en los que se incluyeron 8 muestras de un producto cárnico cocido contaminado artificialmente con 3×10^9 ufc de *L. monocytogenes*. La cantidad y calidad del ADN de *L. monocytogenes* se calculó mediante un procedimiento de cuantificación de ADN por fluorescencia (Picogreen), el cual permite la cuantificación del ADN total obtenido de la extracción, y un sistema de PCR cuantitativa a tiempo real específico para *L. monocytogenes*, que permite la cuantificación precisa del ADN de esta bacteria.

Mientras que los rendimientos de ADN total obtenidos mediante ambos protocolos de extracción fueron similares, el protocolo basado en el kit comercial Wizard obtuvo ADN específico de *L. monocytogenes* de mayor calidad ya que los resultados obtenidos mediante la determinación por el sistema de PCR a tiempo real de las muestras extraídas mediante este procedimiento fueron mayores más de una unidad logarítmica que las extraídas mediante el empleo del procedimiento basado en el uso de la resina Chelex-100.

Por lo tanto, el empleo del kit comercial Wizard DNA para la extracción de ADN en combinación con un sistema de PCR a tiempo real específico para *L. monocytogenes* es altamente recomendable para la cuantificación sensible y exacta de esta bacteria en muestras alimentarias. Sin embargo, el protocolo de extracción de ADN basado en el resina Chelex-100 es más rápido y económico, y su empleo en combinación con un sistema de PCR a tiempo real puede ser deseable para muestreos rutinarios en alimentos sospechosos de estar contaminados con un elevado número de este patógeno, o en muestras analizadas tras un periodo previo de preenriquecimiento.

P-12 ENSAYO DE NASBA A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN ALIMENTOS. IMPORTANCIA DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL MRNA DIANA EN EL DISEÑO DEL NASBA.

A. Coll^{*1}, A. Nadal¹, N. Cook² y M. Pla¹

^{*1}Área de Tecnología de los Alimentos. Instituto de Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Girona, E-17071 Girona. anna.coll@udg.es

²Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, UK

Se ha desarrollado un ensayo de NASBA a tiempo real (QNASBA) mediante una sonda *Molecular Beacon* para la detección e identificación de *L. monocytogenes*. El ensayo tiene como diana una región del mRNA del gen *hly* específica de *L. monocytogenes*; e incluye un control interno de amplificación con la finalidad de descartar las reacciones que hayan presentado algún tipo de inhibición o fallo.

El ensayo de QNASBA desarrollado es específico de *L.monocytogenes* y permite detectar, por reacción, hasta 100 moléculas del mRNA *hly* y 400 células del microorganismo en crecimiento exponencial. Amplifica exclusivamente el mRNA, es decir, no amplifica el DNA genómico. En combinación con un corto tratamiento enzimático el QNASBA detecta específicamente las células viables de *L.monocytogenes*.

Además, el ensayo permite la detección rápida del patógeno en muestras de jamón cocido i salmón ahumado mediante un protocolo combinado con técnicas microbiológicas estándares, de forma que se convierte en una herramienta potencialmente útil para el estudio de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos y ambientales.

Finalmente, el QNASBA se presenta como un ejemplo para mostrar las consideraciones, referentes a la estructura secundaria del mRNA diana, que hay que tener en cuenta en el momento de desarrollar cualquier sistema de NASBA.

P-13 INCIDENCIA DE *Staphylococcus* EN LECHE ECOLÓGICA PRODUCIDA EN ASTURIAS

B. Martínez¹, J. J. Muñiz², A. Rodríguez^{1*}

¹Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Apdo. 85. 33300-Villaviciosa, Asturias.

²LILA-Asturias-ALCE-Calidad. Pol. Ind. de Silvota. 33192 Llanera, Asturias.

La producción de leche ecológica ha experimentado un gran aumento en Europa en los últimos años impulsada por el incremento de la demanda de productos ecológicos por parte de los consumidores. Este sistema de producción limita el uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en los animales, y los prohíbe expresamente para fines no terapéuticos. Por ello, algunos autores sugieren que el sistema de producción ecológica podría aumentar el riesgo de contaminación microbiológica, y consecuentemente, el de enfermedades de origen alimentario.

En este contexto, hemos estudiado la incidencia de la contaminación por *Staphylococcus*, y en particular de cepas productoras de enterotoxinas, en la leche de las 5 granjas de producción ecológica ubicadas en Asturias, durante un período de 6 meses. Como control, se utilizó una granja de producción convencional de leche, reconocida por su alta calidad.

Se utilizaron métodos microbiológicos y bioquímicos clásicos para llevar a cabo el aislamiento y la identificación preliminar de las cepas estafilocócicas, y métodos moleculares para confirmar la identificación y la detección de cepas enterotoxigénicas. De este modo, se detectó la presencia de *S. aureus* en el 36,6% de las muestras de leche ecológica. En la granja convencional, el porcentaje fue del 16,6%. De los 90 aislados seleccionados para llevar a cabo la identificación molecular y la detección de cepas enterotoxigénicas por PCR, la amplificación de los genes 23S rRNA de *S. aureus* y del gen de la termonucleasa (nuc), fue observada en los aislados coagulasa-positivos. El gen *sec*, responsable de la síntesis de enterotoxina C, fue detectado en 7 aislados coagulasa-negativos, identificados como *S. epidermidis* mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. En ninguno de los aislados se detectaron los genes de las enterotoxinas A, D, E y J. Por otro lado, los aislados procedentes de leches ecológicas mostraron mayor sensibilidad a los antibióticos que los de leche de producción convencional. El grado de diversidad genética entre las cepas de *S. aureus* fue determinado mediante RAPD-PCR, siendo agrupadas en 6 clusters.

P-14 DETERMINANTES DE VIRULENCIA Y DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN *Staphylococcus aureus* PROCEDENTES DE MANIPULADORES Y DE ALIMENTOS IMPLICADOS EN TRES BROTES ALIMENTARIOS REGISTRADOS EN EL PRINCIPADO DE ASTURIAS

M. A. Argudín Regueiro^{*1}, M. A. González-Hevia³, M. R. Rodicio Rodicio¹, M. C. Mendoza Fernández¹ y M. C. Martín Martín²

^{*1}Departamento de Biología Funcional (Área de Microbiología). Universidad de Oviedo e Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA), Julián Clavería 6, 33006, Oviedo.
marian_argu@hotmail.com.

²Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias.

³Laboratorio de Salud Pública, Consejería de Sanidad del Principado de Asturias, Carretera del Rubín s/n, 33001 Oviedo.

Durante junio-octubre de 2002 se registraron tres brotes (B1-B3, con 54, 27 y 70 episodios, respectivamente) de intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus* en restaurantes de Asturias. Aislamientos procedentes de alimentos y manipuladores fueron caracterizados mediante técnicas inmunológicas (producción de enterotoxinas, SE) y moleculares (perfiles de plásmidos, de macrorrestricción genómica, de genes de enterotoxinas (se) y de amplificación de secuencias arbitrarias), para su asignación a cepas (Martín et al., Int. J. Food Microbiol. 94: 279-286, 2004). En esta comunicación se amplía el estudio, analizando determinantes de resistencia a antimicrobianos (R) y de virulencia (V): *lukPV*, *lukM*, *lukED* (que codifican leucotoxinas), *epiB* (marcador de bacteriocinas) y *spIF* (marcador de serin proteasas), así como el tipo de sistema regulador *agr*.

En B1 se identificaron tres cepas (C1-C3), una de ellas (C3) en cuatro tipos de alimentos pero no en manipuladores, considerándose responsable del brote. Esta cepa era resistente a ampicilina (*blaZ* asociado a Tn552 de localización plasmídica), productora de SEC, portadora de *sec*, el grupo *seg-sei-sel-sem-sen-seo-lukED* asociado a la isla de patogenicidad *vSaβ* y *agrI*.

En B2 se identificaron seis cepas (C4-C9) resistentes a ampicilina (*blaZ*), que presentaban diferencias tanto en los perfiles-R como en los V. Las tres de alimentos se caracterizaban por: C7, resistencia a eritromicina, ser positiva para *seh*, *vSaβ* y *agrIV*; C8, resistencia a tetraciclina (*tetK*, de localización plasmídica), presentar *blaZ* asociado a Tn552, y *agrIV*, y producir SEA; C9, ser positiva para *sec*, *vSaβ* y *agrI* y producir SEC. Ninguna de estas cepas se encontró en manipuladores, aunque tres de los investigados fueron portadores.

En B3 se identificaron nueve cepas (C8, C10-C15), una de ellas (C8, común a B2) en dos manipuladores y un alimento. El resto presentaron características diferentes. Cuatro (C12-C15) se encontraron solamente en alimentos y eran positivas para *vSaβ*, *spIF*, y *agrII*. C12 y C15 eran resistentes a ampicilina (*blaZ* de localización plasmídica) y la segunda, también a eritromicina.

Cabe destacar que: i) dos cepas (C3 y C8) podrían considerarse endémicas en nuestra comunidad, dado que se han detectado también en exudados nasales de portadores y en alimentos manipulados no relacionados con brotes; ii) en general, las cepas de manipuladores presentaron resistencia a un mayor número de agentes antimicrobianos, siendo cuatro de ellas resistentes a mupirocina (*mupA* e *ileS*-alterado, en una y tres cepas respectivamente), un antibiótico utilizado para descolonizar portadores.

P-15 ANALISIS DE TENDENCIAS DE AGENTES ZONOTICOS EN ALIMENTOS 2002-2005 EN LA COMUNIDAD AUTONOMA DE LA REGION DE MURCIA

M. I. Villa López, C. I. Rivas Estéban, M. E. Rimblas Corredor, A. Zancajo Villa y B. A. Marsilla de Pascual*

** Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis, Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad Autónoma de Murcia. Mariai.villacarm.es*

Las actuaciones de control en alimentos desarrolladas desde el Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis han formado parte del su Programa Oficial con el objetivo fundamental, tal y como establece la normativa de “asegurar un nivel elevado de protección de la Salud Pública”.

A finales de la década de los noventa se realizó un estudio piloto a fin de disponer de un análisis de situación, a la vista de los resultados obtenidos, se considera necesario el diseño e implantación de una búsqueda activa de distintos agentes a lo largo de las diferentes fases de producción

La investigación mediante muestreo selectivo, de los patógenos es uno de los objetivos del Programa de Control Oficial del Servicio desde el año 2002 como un sistema de vigilancia activa, específica para cada agente zoonótico y grupo de alimentos en cualquier fase productiva, que puedan constituir un riesgo para la salud y que permitan adoptar las correspondientes medidas de control.

Las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad al año 2002, detectan las siguientes prevalencias en los agentes zoonóticos estudiados:

Listeria monocytogenes en productos de la pesca aproximadamente el 43%, y en el grupo de preparados cárnicos del 23,6%.

Los datos obtenidos para el *E. coli* O157 H7 en carne y productos cárnicos eran del 8,4% y para *Salmonella* spp. cercanos al 4% en preparados cárnicos, y la incidencia observada para el *Campylobacter* era del 12,37%.

Este trabajo se presenta como una recopilación y análisis de los datos recogidos en el periodo 2002-2005 comparándolos con periodos anteriores.

El muestreo se ha diseñado por grupos de alimentos y superficies del entorno productivo de entre los que se ha detectado mayor riesgo a lo largo del estudio y en consonancia con las recomendaciones comunitarias y bibliográficas.

Los resultados muestran las siguientes tendencias:

-Disminución significativa de *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, fundamentalmente en los productos de mayor riesgo, como respuesta a las actuaciones de control.

-Tendencia a la baja de *Salmonella* spp en los grupos de preparados cárnicos aunque se mantiene alta en carne de aves.

-Mayor detección de *Campylobacter* spp en carne de aves, no apareciendo este patógeno en ningún otro grupo de alimentos.

P-16 ESTUDIO FILOGENÉTICO DE CEPAS DE *Psychrobacter* PREVIAMENTE IDENTIFICADAS COMO *P. immobilis*

I. García-López*, J. M. Rodríguez-Calleja, M. Pablos-López, J. A. Santos y M. L. García-López

Área de Nutrición y Bromatología. Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071-León. dhtigl@unileon.es

El número de trabajos de investigación sobre *Psychrobacter* es bastante limitado. La escasa atención prestada a este género es difícil de explicar, sobre todo si se tiene en cuenta que se cita habitualmente como alterante de los alimentos proteicos y que algunos microbiólogos clínicos han demostrado su participación en procesos patológicos humanos. Las dificultades relacionadas con su taxonomía e identificación no parecen motivo suficiente, aunque pueden haber influido.

Últimamente se están describiendo gran número de especies nuevas de *Psychrobacter* identificadas mediante la secuenciación del gen 16S, pero la caracterización de estas nuevas especies no es completa y se desconocen algunos aspectos importantes, como es la capacidad de transformación, que las cepas de este género presentan de forma natural.

El objetivo de este trabajo es comprobar si cepas de colección y cepas aisladas en nuestro laboratorio e identificadas como *P. immobilis* mediante el ensayo de transformación y pruebas fenotípicas, se adscriben a esta misma especie al llevar a cabo la secuenciación del gen 16S.

Para ello, hemos secuenciado dicho gen de cinco cepas, tres de colección y dos aisladas en nuestro laboratorio que procedían de moluscos bivalvos. Todas ellas habían sido identificadas como *Psychrobacter immobilis* y dieron resultados positivos en el ensayo de transformación.

Primeramente se llevó a cabo la extracción del ADN de las cepas objeto de estudio, seguidamente se amplificó el gen ADNr 16S y los fragmentos amplificados se clonaron en *E. coli* para ser secuenciados. El análisis de las secuencias se hizo con el programa Blast (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y las herramientas de análisis filogenético del Ribosomal Data Base Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Por este procedimiento filogenético, las dos cepas aisladas de moluscos bivalvos fueron identificadas como *Psychrobacter glacincola*. La cepa tipo de *P. immobilis* (CECT 5008) fue correctamente identificada, mientras que las cepas LMG 7062 y LMG 1012 resultaron estar adscritas a la especie de nueva descripción *Psychrobacter pulmonis*.

Estos datos indican que es necesario profundizar en el estudio taxonómico del género *Psychrobacter* y caracterizar exhaustivamente las nuevas especies descritas mediante el uso de técnicas genéticas.

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyecto AGL-2000-1159)

P-17 DETECCIÓN Y PREVALENCIA DEL GEN ALT EN CEPAS DE *Aeromonas* spp. AISLADAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

*J. M. Rodríguez-Calleja**, *M. Pablos-López*, *I. García-López*, *A. Otero Carballeira* y *M. L. García-López*

Área de Nutrición y Bromatología, Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24071 León. dhtjrc@unileon.es

En España, según datos del SIM (Servicio de Información Microbiológica), *Aeromonas* spp. son agentes bacterianos de importancia creciente como causantes de gastroenteritis. Entre sus múltiples mecanismos de patogenicidad se encuentra la producción de exotoxinas: la enterotoxina citotóxica Act (*act/aerA*), las enterotoxinas citotónicas Alt (*alt*) y Ast (*ast*), y la hemolisina HlyA (*hlyA*).

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia y distribución del gen *alt* en cepas de *Aeromonas* spp. presentes en alimentos de origen animal.

Se investigó la prevalencia del gen *alt* mediante el empleo del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sobre el material genético de 18 cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de carne de conejo y en otras 11 cepas procedentes de muestras de diferentes especies de pescado. Para ello se diseñaron cebadores específicos de una región de la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *alt* (número de acceso de la base de datos "Genebank" del NCBI, L77573), mediante el software "Primer Select" (DNASTAR Inc, Madison, WI, USA). La PCR se llevó a cabo mediante un kit comercial (Eppendorf MasterMix, Roche Farma S.A., Madrid, España).

En el 93% de las cepas estudiadas se detectó la presencia del gen *alt*, siendo sólo dos de las 11 cepas aisladas de muestras de pescado *alt*⁻. Entre las 27 cepas portadoras del gen *alt*, cinco presentaban el genotipo *aerA*⁻/*hlyA*⁻ y otras dos cepas más también eran *hlyA*⁻.

La enterotoxina citotónica codificada por el gen *alt* se ha demostrado que contribuye al desarrollo de procesos gastroentéricos (Sha et al., 2002). Nuestros resultados indican una alta prevalencia de este gen entre las cepas de *Aeromonas* estudiadas de diferente origen, lo cual podría explicar la capacidad de cepas que son *aerA*⁻ y/o *hlyA*⁻ para inducir diarreas ya que, como han concluido otros investigadores (Wong et al., 1998; Bin Kingombe et al., 1999; Heuzenroeder et al., 1999; Albert et al., 2000), la mayoría de las cepas aisladas de pacientes con gastroenteritis poseían genes *aerA* y *hlyA* o eran *alt*⁺/*ast*⁺ (Wong et al., 1998).

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2004-4672 del Ministerio de Educación y Ciencia.

P-18 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS AISLADAS DE PERCEBE (*Pollicipes cornucopia*)

M. J. Pérez Álvarez y L. A. Rodríguez López*

**Área de Microbiología, Dpto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas s/n, 32004 Ourense. mjperez@uvigo.es*

Los microorganismos presentes en las aguas marinas pueden afectar tanto a las poblaciones acuícolas presentes como al hombre cuando ingiere o entra en contacto con estos organismos colonizados.

La producción bacteriana de ciertas enzimas extracelulares ha sido considerada tradicionalmente como factores de virulencia aún cuando su papel exacto en la patogénesis varía entre los diferentes patógenos.

En este trabajo se presenta la caracterización morfológica y bioquímica realizada por métodos convencionales y sistema miniaturizado API 20NE de cepas bacterianas heterótrofas aisladas de la superficie de percebes procedentes de la Ría de Arosa, encontrando que el 68% de los aislados resultaron ser bacterias Gram negativas de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* y el resto Gram positivas de los géneros *Lactobacillus* y *Corynebacterium*.

Realizada la determinación y distribución de las actividades enzimáticas extracelulares asociadas a los aislados mediante métodos convencionales y comerciales (APY ZYM) se observó que la microbiota asociada a la epidermis de los percebes presentó una alta prevalencia de actividades como la degradación de ADN, lipolítica, polisacarídica, hemolítica y proteolítica.

P-19 *Geotrichum candidum* COMO POSIBLE INDICADOR DE HIGIENE EN INDUSTRIAS DE TRANSFORMACIÓN DE FRUTAS

*C. Adelantado Faura, L. Arosemena Angulo, M. Rodríguez González, C. Shiva Ramayoni, N. Guiu Comadevall, y M. A. Calvo Torras**

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona. MariAngels.Calvo@uab.es

Tradicionalmente en Microbiología de los Alimentos se han establecido parámetros bacterianos como indicadores de contaminación y/o higiene de los procesos industriales. Sin embargo en productos de origen vegetal y especialmente en frutas la presencia de hongos filamentosos y levaduras puede ser mayoritaria. El objetivo de este estudio es proponer como posible indicador de higiene en industrias de transformación de frutas la detección cualitativa y cuantitativa de cepas de *Geotrichum candidum*.

A partir de diversos lotes de frutas tropicales se procedió a la siembra de alícuotas de las mismas en agar glucosado de Sabouraud (AGS) adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina como inhibidor del posible crecimiento bacteriano. Las placas fueron incubadas por espacio de 3 a 5 días a 28°C. Asimismo se procedió a pre-incubar durante tres días, otra alícuota de cada muestra en caldo lactosado con el fin de favorecer el desarrollo de las posibles cepas fúngicas presentes. Las muestras pre-incubadas fueron asimismo sembradas en AGS. Paralelamente se analizaron muestras de mermeladas preparadas a partir de frutas procedentes de los diversos lotes.

Los resultados obtenidos permiten indicar:

1.- Se han aislado cepas de *Geotrichum candidum* a partir de diversos lotes de frutas tropicales analizadas.

2.- Se han aislado cepas de *Geotrichum candidum* a partir de diversas muestras de las mermeladas preparadas.

3.- La ausencia de *Geotrichum candidum* en las frutas no ha implicado la ausencia de contaminación en los productos o mermeladas elaborados, en procesos subsiguientes a aquellos en los que se había detectado la presencia de la cepa fúngica en los dos tipos de muestras analizadas (materia prima y producto final).

4.- La detección sistemática de *Geotrichum candidum* una vez introducido en la cadena a partir de materia prima (fruta contaminada) se mantiene a lo largo de diversos lotes de fabricación, indicando la necesidad de una mayor higiene y control microbiológico del proceso de transformación por lo que consideramos que la detección de *Geotrichum candidum* puede ser considerada indicador de higiene en industrias de transformación de frutas.

P-20 EFECTO DEL ESTADO DE MADUREZ DE LAS MANZANAS PREVIAMENTE FRIGOCONSERVADAS EN LA CONTAMINACIÓN POR PATULINA Y SU DIFUSIÓN AL TEJIDO SANO

H. Morales Valle *, V. Sanchis Almenar, S. Marín Sillué y A. J. Ramos Girona

Dpto. Tecnología de Alimentos. ETSEA, CeRTA, Universitat de Lleida. Rovira Roure 191, 25198 Lleida.
hector.morales@tecal.udl.es

La patulina es un metabolito secundario tóxico producido principalmente en manzanas y peras por *Penicillium expansum*. Diversos estudios han demostrado que la patulina es teratogénica, nefrotóxica y hepatotóxica y se está estudiando su efecto carcinogénico. La máxima concentración permitida actualmente para zumos de manzana es de 50 ppb, 25 ppb para productos sólidos y 10 ppb para alimentos infantiles.

La patulina está asociada a aquellos frutos que presentan podredumbre evidente. Uno de los factores que influyen en el estado sanitario de la manzana en el momento de la elaboración de zumos y derivados es su madurez en el momento de la cosecha, pues las manzanas más maduras son más sensibles al ataque de hongos. Generalmente, debido a la estacionalidad en la producción de manzanas o a la capacidad limitada de las industrias elaboradoras, las manzanas se almacenan al aire libre hasta que se procesan, con el consiguiente desarrollo de la podredumbre y acumulación de patulina. Por todo esto, las industrias proceden a un lavado con agua a presión con la finalidad de eliminar este tejido necrosado y reducir la concentración de patulina de la materia prima. No obstante, esta toxina puede haber difundido al tejido sano y llegar al zumo.

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto que tiene el estado de madurez en la contaminación por patulina en frigoconservación y su difusión al tejido sano.

Se inocularon dos lotes de manzanas de diferente madurez con *P. expansum* y se almacenaron en cámara a 1 °C. Posteriormente, se procedió a la medida de diámetro de la podredumbre y a la determinación del contenido en patulina de la mitad de las manzanas. El resto, fueron almacenadas a 20°C durante tres días para posteriormente ser analizadas. Para estudiar la difusión de la toxina, se extrajo un cilindro de pulpa que contenía tejido sano y tejido necrosado y se cortó en discos de 0,5 cm para ser analizado por separado el tejido necrosado y el tejido sano.

El almacenamiento en frío fue totalmente eficaz en la prevención de la contaminación por patulina aunque no evitó la podredumbre causada por *P. expansum*. La patulina se detectó después de la permanencia de las manzanas a 20 °C y fue mayor en frutos maduros. Se comprobó la difusión de la toxina hacia el tejido sano.

Agradecimientos: los autores agradecen al Gobierno español (proyecto CICYT AGL 2004-07549-05-01, beca BES-2003-2180, y programa Ramón y Cajal) y catalán (proyecto estratégico CeRTA 2005-2006 “Seguretat biòtica i abiòtica dels aliments”) su ayuda financiera.

P-21 HONGOS FILAMENTOSOS EN MATRICES SÓLIDAS: ¿CÓMO CUANTIFICAR SU CRECIMIENTO?

S. Marín Sillué, A. J. Ramos Girona y V. Sanchis Almenar*

**Departamento de Tecnología de Alimentos, ETSEA, CeRTA-UTPV, Universidad de Lleida. Rovira Roure 191, 25198 Lleida. smarin@tecal.udl.es*

Los mohos son importantes agentes alterantes de alimentos de humedad intermedia. Algunos de ellos son capaces de producir metabolitos tóxicos que pueden suponer un peligro para la salud humana. El crecimiento fúngico en alimentos provoca cambios químicos y nutricionales, así como en sus características sensoriales que provocan el rechazo por parte del consumidor.

La micología predictiva no ha recibido el mismo nivel de atención que la modelización del crecimiento bacteriano, en parte debido a la complejidad inherente a la cuantificación del crecimiento fúngico. Es necesario un método que posea una buena correlación con la biomasa fúngica y que permita la obtención simple de datos a lo largo del tiempo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la idoneidad de la determinación del contenido de ergosterol, el recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) y los diámetros de las colonias fúngicas para la estimación de la biomasa fúngica presente en sustratos sólidos. El estudio se realizó sobre un total de 16 especies fúngicas representativas de la micoflora habitual en alimentos de humedad intermedia. Otras variables tales como los recuentos totales de esporas, los recuentos de esporas viables, el peso seco y húmedo de las esporas y el ergosterol contenido en las mismas fueron también analizadas con el objetivo de dar una explicación razonada de los resultados obtenidos

El análisis multivariante de los resultados obtenidos mostró que las variables estudiadas se agrupaban en función de su relación con la capacidad de esporulación de las especies. El estudio mostró la dependencia de los resultados obtenidos de los diferentes métodos de análisis, de la especie fúngica y de la edad del cultivo. Los diámetros de las colonias presentaron una buena correlación con la biomasa seca total, confirmándose como un buen parámetro a utilizar con finalidades investigadoras. Por otra parte, se demostró la débil relación entre los recuentos de UFC y la cantidad de biomasa, ya que los recuentos presentaron en la mayoría de caso una relación directa con el número de esporas, obviando el crecimiento miceliar. Por último, el contenido de ergosterol presentó buena correlación con la biomasa total, ya que entre el 25 y el 80% del ergosterol provenía del micelio, dependiendo de las especies. El contenido medio de ergosterol fue de 0,3-3,3 μg por mg de biomasa seca.

Agradecimientos: los autores agradecen al Gobierno español (proyecto CICYT AGL 2004-06413/ALI, y programa Ramon y Cajal) su ayuda financiera.

P-22 COLONIZACIÓN FÚNGICA Y PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A POR CEPAS DE *Aspergillus* SECCIÓN *Nigri* EN UVAS SOMETIDAS A DESHIDRATACIÓN. EFECTO DE LA FLORA ACOMPAÑANTE

A. J. Ramos Girona*, A. Valero Rello, V. Sanchis Almenar y S. Marín Sillué

*Departamento de Tecnología de Alimentos. CeRTA-UTPV. Universidad de Lleida. Avenida Rovira Roure, 191. 25198 Lleida. ajramos@tecal.udl.es

La ocratoxina A (OTA) es una toxina fúngica producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que ha sido detectada en una gran variedad de alimentos, como las uvas, las pasas, el mosto y el vino. Los niveles más altos de OTA en uvas y derivados han sido encontrados en vinos dulces y uvas pasas, fruto del desarrollo en la uva de cepas del grupo *Aspergillus* sección *Nigri* (agregado *A. niger* y, principalmente, *A. carbonarius*).

La producción tradicional de pasas implica la deshidratación de uvas sobremaduras mediante su exposición directa al sol. Las condiciones ambientales que se dan durante este proceso favorecen el crecimiento fúngico, especialmente de especies pertenecientes a *A. sección Nigri*, *Eurotium* y *Penicillium*, y la síntesis de OTA, aunque este hecho puede verse influido por la presencia de la micoflora acompañante.

El objetivo de este estudio fue evaluar, en uvas sometidas a un proceso de secado *in vitro*, la capacidad de colonización y de producción de OTA por diferentes especies de *A. sección Nigri*, y observar el efecto de las interacciones con otros mohos. Para ello se usó un lote de uva blanca madura sana y otro con uvas lesionadas artificialmente, y se inocularon con especies de *A. sección Nigri* (*A. carbonarius* productor de OTA, agregado *A. niger* productor de OTA, y agregado *A. niger* no productor de OTA), así como con *Eurotium amstelodami* y *Penicillium janthinellum*, en diferentes combinaciones.

El proceso de secado *in vitro* fue simulado ajustando primero la actividad de agua (a_w) de la uva a 0,98 y disminuyéndola gradualmente hasta 0,76 a_w durante un plazo de 20 días. Una vez transcurridos 5, 10, 15 y 20 días se contabilizó el porcentaje de uvas con colonización fúngica y a los 5, 7, 10, 12, 15, 17 y 20 días se determinó la concentración de OTA.

Los resultados obtenidos muestran que la colonización de las uvas aumenta con el tiempo en todos los tratamientos. El agregado *A. niger* productor de OTA mostró el porcentaje de colonización más elevado, seguido por *A. carbonarius* y, finalmente, por su inóculo mixto. Cuando se combinaron las dos cepas productoras de OTA, la adición de cualquier otro de los microorganismos ensayados ocasionó un aumento de la infección por los *Aspergillus* de la sección *Nigri*. *A. carbonarius* fue el moho que más OTA produjo al encontrarse en cultivo puro, seguido del agregado *A. niger*. En general, cuando al inóculo de *A. carbonarius* se añadieron otros mohos competidores, el contenido en OTA se redujo. *E. amstelodami* fue el único moho competidor que provocó la acumulación de OTA.

Agradecimientos: los autores agradecen al Gobierno español (proyecto CICYT AGL 2004-07549-05-01, beca BES-2003-2180, y programa Ramón y Cajal) y catalán (proyecto estratégico CeRTA 2005-2006 "Seguretat biòtica i abiòtica dels aliments") su ayuda financiera.

P-23 ESTUDIO PREDICTIVO DE LA PRODUCCIÓN DE DESOXINIVALENOL POR *Fusarium graminearum* EN DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACIÓN

F. M. Valle-Algarra¹, A. Medina^{*2}, F. Mateo³, C. Mata², J. V. Gimeno-Adelantado¹, R. Mateo¹ y M. Jiménez²

¹Dpto. de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Valencia.

²Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Valencia. angel.medina@uv.es

³Dpto. de Ingeniería Electrónica, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, E-46022, Valencia.

El desoxinivalenol (DON) es un metabolito secundario producido principalmente por especies de *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*. Esta micotoxina actúa como inhibidor de la síntesis de proteínas y de DNA, también afecta al peso corporal y a la supresión de la función inmuno humoral y celular. Consecuentemente se ha asociado a micotoxicosis crónicas y agudas en ganado y, en un grado inferior, en el ser humano. Dada su peligrosidad para la salud, la Unión Europea ha establecido unos límites máximos permitidos en cereales y en algunos de sus productos derivados (Reglamento (CE) 856/2005).

La contaminación del grano por DON es difícil de predecir porque depende de complejas interacciones entre factores que afectan al crecimiento del hongo productor, como la temperatura, humedad, clase de grano, tipo de aislado fúngico, tiempo de almacenamiento, etc. Generalmente, se observa un incremento en los niveles de DON en los granos de cereales en períodos con abundantes lluvias y alta humedad durante el período de floración. De entre los factores citados es la humedad y la temperatura, así como el nivel de contaminación por el hongo las variables más importantes que afectan a la rápida colonización del grano y a la producción de DON.

En este trabajo se estudió como afectan los factores de actividad de agua del grano, temperatura, cantidad de inóculo y tiempo en la producción de DON por un aislado de *F. graminearum* en granos de trigo. Para ello se realizó un diseño de experimentos con una combinación de tres factores: actividad de agua (0,94; 0,96; 0,98), temperatura (15; 20; 25 °C) y cantidad de inóculo (discos de 0,7; 1,1; 1,5 mm de diámetro obtenidos de colonias del hongo sembrado en placa de PDA). En todas las experiencias, se determinó la cantidad de DON producido a lo largo de un período de tiempo. Posteriormente se realizó un modelo matemático que pudiera predecir la producción de DON en función de los resultados obtenidos, y en consecuencia que pudiera ser útil en la previsión del comportamiento del hongo en el cereal contaminado.

Los resultados obtenidos indican que este aislado produce los niveles más elevados de DON a temperaturas medias y elevadas y a actividades acuosas elevadas, siendo su máxima producción a una actividad acuosa de 0,98 y temperatura de 20°C. Posteriormente, se realizó un modelo matemático polinomial con el que se obtuvieron unos valores predichos muy próximos a los valores reales obtenidos.

Agradecimientos. Los autores desean agradecer el apoyo económico al Ministerio de Educación y Ciencia (Project AGL-2001-2974-C05-01 and AGL-2004-07549-C05-02/ALI y dos becas de investigación) y al Gobierno Valenciano (Conselleria d Empresa, Universitat i Ciencia) por financiar una beca de investigación.

P-24 ESTUDIO COMPARATIVO DE CEPAS DE ENTEROCOCOS PROCEDENTES DE AMBIENTES CLÍNICOS, ALIMENTOS, AGUAS Y SUELO

A. Cobo, P. Martínez Viedma, M. J. Grande Burgos, N. Ben Omar, H. Abriouel,
R. Lucas, E. Ortega, A. Sánchez Valenzuela, M. Martínez Cañamero, y A.
Gálvez*

*Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales,
Universidad de Jaén. 23071, Jaén. agalvez@ujaen.es

Los enterococos juegan un doble papel como patógenos oportunistas a la vez que forman parte de la microbiota autóctona del tracto intestinal humano y de numerosos alimentos. Los ambientes naturales así como los alimentos podrían estar implicados en la transmisión de cepas potencialmente patógenas. A fin de poder aportar evidencias sobre este aspecto, se ha evaluado el riesgo potencial de una colección de cepas procedentes de alimentos, aguas y suelo, con cepas procedentes de ambientes hospitalarios.

Se ha estudiado una colección de 140 presuntas cepas de enterococos procedentes de 30 muestras de agua (aguas residuales urbanas, agua depurada, aguas para recreo, ríos, pantanos y acequias) y de suelos cultivados, así como 150 aislados de 50 muestras diferentes de alimentos (principalmente vegetales, aunque también cárnicos, lácteos, y alimentos tradicionales fermentados) y 104 cepas de origen clínico. Los resultados preliminares obtenidos indican una alta incidencia de los enterococos en los diferentes ambientes estudiados, incluyendo aguas, suelo y alimentos. La identificación de las cepas mediante métodos moleculares (secuenciación del ADNr 16S, y amplificación por PCR) ha revelado una elevada incidencia de *Enterococcus faecalis* frente a *E. faecium* en los aislados clínicos, mientras que la incidencia de *E. faecium* fue mayor en el resto de muestras. Con baja frecuencia, se detectaron cepas beta-hemolíticas en los diferentes ambientes. Las cepas de origen clínico mostraron una mayor incidencia de resistencia a antibióticos, especialmente tetraciclina y quinupristina/dalfopristina. También se detectó resistencia a otros antimicrobianos como eritromicina, rifampicina, ciprofloxacina, levofloxacina, y nitrofurantoina.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo (Proyecto PI042420).

P-25 ORGANIZACIÓN Y ELIMINACIÓN DE CÉLULAS Y MATRIZ EN BIOFILMS DE BACTERIAS DE INTERÉS PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

*B. Orgaz^{*1}, J. Vázquez, J. Kives, M. M. Lobote y C. San José*

*^{*1}Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.*

Los biofilms microbianos en plantas de procesado suponen un peligro para la inocuidad y la vida útil de los alimentos, debido a su resistencia aumentada a biocidas y a que los fragmentos desprendidos pueden dispersarse como suspensiones y aerosoles, y colonizar nuevas superficies. Uno de los mayores problemas de la limpieza de biofilms es la posible heterogeneidad en cuanto a edad, grosor, composición, estructura, densidad celular, etc. Por otra parte, el desprendimiento (por ejemplo, mecánico) de biofilms no implica necesariamente la muerte de las células allí presentes y viceversa. Las células desprendidas pueden volver a adherirse no lejos de allí y aunque se destruyan o incluso desprendan células, la matriz residual puede actuar como película condicionante, facilitando el crecimiento de nuevas películas.

Para este trabajo se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de distintas zonas de superficies cubiertas por biofilms maduros de una sola especie (*Salmonella enterica* serovar *enteritidis* ATCC 13076 o *Staphylococcus aureus* CECT 4013). Se empleó una tinción mixta de Syto 13 con blanco de Calcofluor, para estudiar la distribución de células y matriz en varias áreas, expuestas a distinto grado de aireación. El espesor máximo de los biofilms formados en 24h a 37°C fue registrado en la interfase líquido-aire de las superficies estudiadas (12-18 µm en el caso de *Salmonella* y 21-18 µm en el de *Staphylococcus*). En esa zona, se observaron grandes agregados de células y matriz, mientras que en las zonas sumergidas, la densidad celular y los acúmulos de matriz eran muy inferiores.

El empleo de enzimas para la limpieza de biofilms, pretende el desprendimiento del conjunto de la biomasa, tanto células como matriz. Aquí se aplicaron diversos tratamientos, cuya eficacia fue evaluada en términos de reducción log de la población bacteriana adherida y de desprendimiento de biomasa, medida por densitometría. Determinadas combinaciones de enzimas alcanzaron reducciones de células adheridas de aproximadamente 3 log, pero sólo un 18-20% de desprendimiento de biomasa. Las zonas más resistentes a los procedimientos de limpieza aquí empleados fueron las citadas interfases líquido-aire de las superficies estudiadas, quedando las zonas completamente sumergidas prácticamente limpias. Parece pues que estos (y otros) procedimientos pueden dejar importantes residuos de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), aun cuando eliminan la inmensa mayoría de las células (el indicador de limpieza habitualmente empleado). Es pues conveniente vigilar la presencia de esos depósitos tras la limpieza, particularmente en la franja habitualmente bañada por el nivel superior de líquido.

P-26 CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS EN PITAYA (*Stenocereus queretaroensis*)

M. R. Torres Vitela*, M. G. Muñoz Andrade, N. E. Martínez Gonzáles, P. Gutiérrez González, V. Navarro Hidalgo, L. O. Orozco Hernández y M. C. Manca de Nadra

*Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Dpto. de Farmacobiología. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Av. Gral. Marcelino García Barragán No. 1451, Guadalajara Jalisco México. torresvitela@gmail.com y depfarm@ucei.udg.mx

En las tres últimas décadas el consumo de frutas frescas y vegetales se ha incrementado, por tanto el número de brotes también debido al consumo de los productos frescos. Es necesario incrementar medidas de seguridad en productos hortofrutícolas.

Los pitayos (*Stenocereus* spp.), pertenecen a la familia de las cactáceas que crece en zonas semiáridas de México, principalmente del centro y occidente, producen frutos comestibles color intenso desde amarillo, rojo, naranja, púrpura y mamey, la producción del fruto es en abril y mayo. Las pitayas (*Stenocereus queretaroensis* var. *mamey*) pertenecen al grupo de frutos exóticos, que han sido estudiados recientemente.

Los pitayos suele presentar dehiscencia (la cáscara se abre longitudinalmente) al madurar y durante su comercialización se incrementan las oportunidades para que el fruto sea contaminado. El objetivo de este trabajo fue conocer la calidad microbiológica de la pitaya y comportamiento de bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*) en este sustrato y algunos factores que determinan dicho comportamiento.

Para estudiar la calidad microbiológica de la pitaya se adquirieron 126 muestras frescas, 61 sin dehiscencia y 65 con dehiscencia. A partir de diluciones decimales de la muestra se efectuó recuento de grupos indicadores siguiendo técnicas oficiales. Para el estudio del comportamiento de bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*) se obtuvieron 200 pitayas sin dehiscencia, que fueron higienizadas con alcohol al 70%. Posteriormente se realizó una incisión en forma de cruz de aproximadamente 2 cm en un extremo. La superficie expuesta del fruto fue inoculada por separado con 0,5 mL de células lavadas de *Escherichia coli* O157:H7 (ECEH), *Salmonella typhimurium* (ST) y mezcla de cepas de *Listeria monocytogenes* (Scout A, California, V7 y Brócoli), para obtener 100 y 10.000 células por pieza. Las muestras se almacenaron a 5°C durante 1, 2, 3, 4 y 5 días y a 28°C durante 0, 3, 6, 9 y 24 h, al cabo de estos tiempos se practicaron recuentos de los patógenos en medio lactosa-sulfito-rojo, fenol-rifampicina para ECEH y ST, y Oxford modificado para *L. monocytogenes* y se determinó pH y % de ác. málico.

La pitaya presentó niveles de BMA >10⁵ UFC/g, *E. coli* 39,0 NMP/g y capacidad de sobrevivir *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* durante 24 horas a temperatura ambiente y 5 días en refrigeración.

La pitaya es un fruto que ofrece grandes oportunidades para el mercado internacional siempre y cuando se garantice su calidad e inocuidad.

P-27 CONTROLES MICROBIOLÓGICOS EN LAS QUESERÍAS ARTESANALES DE GRAN CANARIA

C. Carrascosa Iruzubieta*, E. Sanjuán Velázquez, R. Millán de Larriva, I. Benítez Santana, E. Etcheverry Suárez y E. Pérez García.

Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Transmontana S/N. Arucas. 35416. Las Palmas.
ccarrascosa@dpat.ulpgc.es

Canarias es una de las comunidades autónomas con mayor número de queserías artesanales, superando las 500, solo en la isla de Gran Canaria (GC) hay 174.

Los sistemas de inspección han evolucionado hacia un control de los eslabones de la cadena de producción de quesos con características tradicionales (QCT), para su control eficaz es necesario llevar a cabo controles microbiológicos de la leche y del queso, como verificación del sistema de autocontrol.

En este estudio evaluamos queserías de diferentes municipios de GC, que forman parte de un proyecto de mejora de la calidad del QCT.

El RD 1679/1994, en su artículo 14. establece la obligatoriedad de instaurar un sistema de autocontrol basado en el APPCC. En el Anexo C del capítulo II, se fijan los criterios microbiológicos aplicables a los productos lácteos y leche de consumo.

Se diferencian tres grupos de gérmenes, cuya presencia debe ponerse de manifiesto mediante controles microbiológicos periódicos.

1. Criterios obligatorios: gérmenes patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.
2. Criterios analíticos: gérmenes testigos de falta de higiene: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.
3. Gérmenes indicadores: líneas directrices: Coliformes 30°C, Contenido de gérmenes

En este estudio se realizaron controles microbiológicos a la leche y queso curado procedente de QCT, para verificar el sistema de autocontrol implantado en dichas queserías. Estableciendo como límites críticos los criterios microbiológicos del RD 1679/1994 y del Reglamento de la CE nº 2073/2005.

Participaron en este estudio 35 queserías, con dos tomas de muestras cada una, durante un período de seis meses. Todas las queserías tenían RGSA y cumplían las condiciones para establecimientos que elaboran productos de características tradicionales según el Anexo D del RD 1679/1994.

Se recogieron 70 muestras de leche cruda y queso, de 20 días de maduración. Elaborado a base de leche cruda de vaca, cabra, oveja y sus mezclas.

Las determinaciones microbiológicas llevadas a cabo fueron: *Listeria* y *Salmonella* método Mini Vidas; *E. coli* siembra en NMP a 44°C y *Staphylococcus aureus* siembra en BP a 37°C.

Listeria monocytogenes se detectó en leche en el 5,70% y en queso en el 2,85%, *Salmonella* en queso en el 5,70% de las queserías. Esto conlleva en todas las queserías afectadas, a la destrucción de los quesos almacenados, así como la aplicación de medidas correctoras, para la eliminación de la causa de la contaminación.

P-28 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PLATOS PREPARADOS 2004 – 2006

M. A. Castaño Garrido^{*1}, *G. Martínez Reina*¹, *A. M. Sánchez Cánovas*¹, *M. E. Rimblas Corredor*², *M. J. Barnés Campos*¹ y *M. D. Vilella Martínez*¹

^{*1}Laboratorio de Microbiología. Consejería de Sanidad de Murcia. Ronda de Levante, 11, 30008 Murcia. mangeles.castaño@carm.es

²Seguridad Alimentaria y Zoonosis. Consejería de Sanidad de Murcia. Murcia.

Los platos preparados son, elaborados a partir de muy diversos productos, son cada día más numerosos y variados. Por sus características especiales, exigen un control microbiológico muy estricto y constante de la materia prima, de las distintas fases de elaboración y del producto terminado.

Desde el punto de vista sanitario pueden constituir un riesgo para el consumidor, ya que casi todas las bacterias productoras de toxiinfecciones alimentarias se pueden encontrar en ellos.

Uno de los objetivos fundamentales de la legislación alimentaria es asegurar un nivel elevado de protección de la salud pública. La seguridad de los alimentos se garantiza principalmente mediante un enfoque preventivo, como la adopción de buenas prácticas de higiene y la aplicación de actividades de autocontrol. En esta línea venimos trabajando en este Laboratorio y para ello hemos efectuado numerosos análisis platos preparados para comprobar que cumplen con los criterios microbiológicos y los límites máximos establecidos.

Realizamos el análisis de 210 muestras de platos preparados, procedentes de establecimientos de la Comunidad de Murcia, correspondientes a los años 2004, 2005 y 2006. Utilizamos el sistema MiniVidas para detección de patógenos y nuestros propios protocolos normalizados de trabajo (PNTs), para el resto de parámetros.

Los microorganismos que analizamos son los que exige la legislación según R.D 3484/2000, B.O.E 12/01/01 que establece límites para gérmenes Aerobios mesófilos, Coliformes totales, *E.coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. *Campylobacter* lo hemos analizado para asegurar que, como exige la legislación, los pp no contengan ningún microorganismo patógeno en una cantidad que pueda afectar a la salud de los consumidores.

De las 210 muestras analizadas, 7 (3,3 %) sobrepasan los límites establecidos para gérmenes Aerobios (10^6 u.f.c/g), 17 muestras sobrepasan los límites para Coliformes totales (8,1 %), y 2 sobrepasan los límites para *S. aureus* (0,95%).

En cuanto a patógenos aparece presencia de *Salmonella* en 5 muestras (2,4%). No hay presencia de *Campylobacter* en ninguna de las muestras.

En el caso de *Listeria monocytogenes* aparecen 5 positivos, pero en ninguno de los casos se sobrepasa el límite establecido (10^2 u.f.c/g).

Los resultados revelan que 25 productos (11,9%) no cumplen la Legislación, porcentaje que no es excesivamente alto, debido a la concienciación y hábitos del sector. El 2,4% de los mismos es debido a *Salmonella*, lo que indica la conveniencia de incidir con controles en el sector, en aras de salvaguardar la Salud Pública.

P-29 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE PRODUCTOS VEGETALES MÍNIMAMENTE PROCESADOS EN FRESCO COMERCIALIZADOS EN ESPAÑA

M. Abadias Seró, M. Anguera Farran, R. Torres Sanchis, I. Alegre Vilas y I. Viñas Almenar*

¹ Área de Postcosecha, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Avda. Rovira Roure, 191, 25198-Lleida.
Isabel.abadias@irta.es

El consumo de vegetales mínimamente procesados se ha incrementado de manera muy importante durante los últimos años. Este tipo de productos, listos para su consumo, sufre un procesamiento mínimo en la industria: son lavados, acondicionados (cortados, rallados, pelados,...) y envasados con o sin atmósfera modificada. Así pues, no sufren ningún proceso que garantice la eliminación de los microorganismos presentes en la materia prima ni tampoco los contaminantes. Han de mantenerse en temperaturas de refrigeración hasta su consumo y son muy perecederos, con una vida útil de entre 7 y 10 días. Actualmente no existe mucha información sobre la microflora presente en este tipo de productos ni si realmente existe un peligro microbiológico debido a su consumo. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la calidad microbiológica, incluyendo la presencia de distintos patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas comercializadas en España.

Durante los años 2005-06 se ha determinado el recuento total de aerobios mesófilos, psicrótrofos, mohos y levaduras, enterobacterias y bacterias ácido lácticas mesófilas y de los patógenos *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* termotolerantes y *Yersinia enterocolitica* de 300 muestras, adquiridas en distintas cadenas de supermercados y distintas marcas comerciales, utilizando técnicas microbiológicas normalizadas. La composición de las muestras ha sido muy variable, desde ensaladas monoproducción (lechuga, zanahoria, canónigos, p.ej) hasta mezclas de 6 vegetales distintos.

Los resultados han demostrado que no hubo diferencias entre los recuentos de los distintos grupos microbianos encontrados en las distintas marcas comerciales y que las diferencias fueron más bien debidas a su composición. Los recuentos de aerobios mesófilos oscilaron entre 10^4 - 10^9 ufc/g, y 10^2 - 10^7 ufc/g en hortalizas y frutas respectivamente. En cuanto a monoproducción, los germinados de soja y alfalfa, zanahoria, espinacas y rúcula presentaron los recuentos de aerobios mesófilos más elevados. En general, las hortalizas presentaron recuentos más altos que la fruta pelada y cortada, predominando la población bacteriana sobre la de hongos y levaduras. Los recuentos de microorganismos psicrótrofos han sido similares a los de aerobios mesófilos. Así pues, existe un gran número de microorganismos que pueden desarrollarse a bajas temperaturas.

Un 12% de las muestras ha presentado contaminación por *E. coli*, no obstante, solo un 2% superó las 100 ufc/g. Ninguna de ellas presentó contaminación por *E. coli* O157:H7. Ninguna de las muestras superó los límites legales de *L. monocytogenes*. No se detectaron *Y. enterocolitica* patógenas ni *Campylobacter* termotolerantes. En la fruta pelada y cortada no se ha encontrado ningún patógeno de los determinados ni *E. coli*.

P-30 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS ESPECIAS

*M. E. Rimblas Corredor*¹, I. Villa López¹, G. Reina Martínez², A. Iniesta García¹, J. Martínez Uceda y O. M. Martínez Pérez¹*

**¹Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis. Consejería de Sanidad de la Región de Murcia Ronda de Levante, 11. 30.008 Murcia. Meulalia.rimblasarm.es*

²Laboratorio Regional de Salud Pública. Consejería de Sanidad de la Región de Murcia Ronda de Levante, 11. 30.008 Murcia.

Las especias, valoradas por sus sabores, colores y aromas pueden contener un nº elevado de microorganismos, pudiendo provocar el deterioro del alimento al que se adicionan, considerándose fuentes primarias de focos de intoxicaciones alimentarias.

Objetivos: Estudio prospectivo que:

- evalúa la seguridad bacteriológica y toxicológica de las especies,
- recoge información sobre la prevalencia de microorganismos relacionándola con las diferentes etapas de comercialización,
- verifica que las especias no superen los límites microbiológicos establecidos por la legislación
- y se contrasta la incidencia de la contaminación microbiológica frente a las posibles contaminaciones debidas a sustancias químicas.

Durante el año 2005 se han recogido 70 muestras, que a fin de abarcar todas las fases de la comercialización y obtener un diagnóstico de situación del mercado (a nivel nacional y de nuestra Comunidad Autónoma), se ha realizado en: Establecimientos dedicados al almacenamiento, envasado, distribución de especias al por mayor, establecimientos que utilicen especias en la preparación de alimentos y el comercio al por menor.

El 38,57% presentan valores superiores a los establecidos por la legislación. De estas muestras no aptas: 88,89% es por motivos microbiológicos, y 11,11% de tipo químico (Annato). Al valorar los contaminantes de origen microbiológico se obtiene: 79,16% de las no conformidades por presencia de *Salmonella*, 12,5% exceden los valores de *E.coli* y 8,33% exceden los de *Clostridios perfringens*. Mientras que la incidencia de contaminación en las distintas etapas de comercialización es: 92,6% en establecimientos fabricantes/envasadores, 75% en utilizadores, 91% en comercio minorista.

- Los resultados revelan deficiencias microbiológicas en las etapas de fabricación que se mantienen en las posteriores etapas de manipulado.
- Se observa un mayor riesgo debido a contaminaciones de tipo microbiológico frente a las contaminaciones de origen químico.
- Se ha observado la necesidad de esterilización de los productos y la necesidad de efectuar un mayor control en la fase de fabricación.
- Como consecuencia de los resultados obtenidos se realizaron distintas actuaciones que abarcan desde la: inspección del establecimiento productor con implantación de medidas correctoras tales como la exigencia de: mejor control interno, esterilización del producto y apertura de expediente de tipo administrativo, así como se ha procedido a la gestión de productos deficientes a través de Comunicaciones a otras Comunidades Autónomas y a través del Sistema de Intercambio Rápido de Información.

Referencias: -R.D. 2242/84, Reglamentación Técnico-Sanitaria para elaboración, circulación y comercio de Condimentos y Especias.

P-31 EVALUACIÓN DE RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS EN LECHUGAS PARA ENSALADA SEGÚN REAL DECRETO 3484/2000

M. Díez, V. Garrido, I. García-Jalón y A. I. Vitas*

Dpto. Interfacultativo de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. Irunlarrea 1, 31008 Pamplona. mdiezlet@alumni.unav.es

En los últimos años se ha producido un notable incremento en la venta y consumo de lechugas envasadas, tanto a nivel particular como a nivel de restauración colectiva, debido a las ventajas que presentan este tipo de productos. Estas comidas preparadas se clasifican como grupo D dentro del Real Decreto 3484/2000 (comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos), y deben cumplir unos criterios microbiológicos a la fecha de caducidad. Sin embargo, cuando estos productos se utilizan como ingrediente para elaborar otros platos preparados (ensaladas), la norma microbiológica que deberían cumplir es la del grupo A (comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico). Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar el grado de cumplimiento del RD 3484/2000 de ensaladas elaboradas con lechugas envasadas, aplicando los criterios de los grupos A y D.

A lo largo del año 2005 fueron analizadas un total de 65 muestras de lechuga procedentes de establecimientos de restauración colectiva (colegios, empresas, residencias de ancianos). Todas las muestras se tomaron en condiciones de esterilidad y antes del emplatado, siendo transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración. Las muestras de lechugas preparadas en las cocinas (n=48), fueron tomadas tras el proceso de la limpieza, desinfección y troceado, mientras que en el caso de lechugas envasadas (n=17), los envases fueron abiertos in situ, anotándose los datos de marca, lote y fecha de caducidad. Los ensayos microbiológicos se llevaron en un laboratorio acreditado por ENAC para la realización de todos ellos.

Las lechugas preparadas en los propios establecimientos fueron correctas en un 66,7% según los criterios del grupo A. Los parámetros que principalmente se incumplieron fueron los de mesófilos (4,2%) y coliformes (31,2%).

El grado de cumplimiento del RD 3484/2000 en el caso de lechugas envasadas, cuando se aplicaron los criterios del grupo D fue del 94,2%. Sin embargo, cuando se evaluaron estos platos con los criterios del grupo A el porcentaje de conformidad fue sólo del 41,2%, siendo el grupo de coliformes la principal desviación encontrada (10 de los 17 platos fueron incorrectos).

Las categorías de platos preparados establecidas en el RD 3484/2000 no son suficientes para contemplar las situaciones reales que se producen restauración colectiva. Sería necesario unificar los criterios A y D cuando son de aplicación a platos que lleven vegetales crudos como ingredientes.

P-32 PROPUESTA DE LÍMITES MICROBIOLÓGICOS APLICABLES AL CONTROL DE PIENSOS ELABORADOS Y DE MATERIAS PRIMAS

C. Shiva Ramayoni, L. Arosemena Angulo, M. Rodríguez González, C. Adelantado Faura, A. de la Fuente Canet, N. Guiu Comadevall y M. A. Calvo Torras*

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona. Carles.Adelantado@uab.es

En el Reglamento 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo (12/01/05) se fijan los requisitos en materia de Higiene de los piensos y se cita como uno de los principios fundamentales: “la definición de criterios microbiológicos basados en criterios de riesgo científicos”. Sin embargo no se indican los límites microbiológicos que deben aplicarse con el fin de asegurar la calidad de los productos destinados a la elaboración de piensos ni a los que deben regularse para productos terminados.

Los fabricantes de piensos así como los ganaderos se hallan ante la problemática de poder aceptar o rechazar productos para los que la legislación no marca unas pautas microbiológicas concretas.

En este sentido y tras los análisis microbiológicos realizados durante los últimos tres años a una media anual del orden de 1500 materias primas y 450 piensos destinados a diversas especies animales, planteamos una propuesta de parámetros microbiológicos y límites de aceptación que se indica a continuación:

- 1.- Recuento total de bacterias aerobias mesófilas : 1×10^5 UFC/g
- 2.- Recuento total de bacterias anaerobias mesófilas : 1×10^2 UFC/g
- 3.- *Enterobacteriaceae* totales: 1×10^2 UFC/g
- 4.- *Escherichia coli*: Ausencia en 1 g.
- 5.- *Salmonella* spp.: Ausencia en 25 g
- 6.- *Staphylococcus aureus*: 1×10^2 UFC/g
- 7.- *Clostridium perfringens*: 1×10^2 UFC/g
- 8.- Recuento de hongos miceliares: 1×10^3 UFC/g
- 9.- Recuento de levaduras: 1×10^4 UFC/g

Si los productos son líquidos, los límites deben expresarse en UFC/mL

Consideramos importante establecer el control de determinadas especies fúngicas potencialmente productoras de micotoxinas como por ejemplo, *Aspergillus* del grupo *flavus*, *Aspergillus* del grupo *ochraceus* y *Fusarium* spp.

Asimismo debe controlarse la presencia cuantitativa de diversas micotoxinas: aflatoxina B₁, ochratoxina A, zearalenona y fumonisinas.

P-33 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN MOLUSCOS PASTEURIZADOS

M. F. Diéguez^{*1}, P. Fidalgo^{1,2}, E. Torres², D. Franco² y J. Abalde²

^{*1}Tanfresco, S.L.. Polígono de Bergondo, parcela B-20. 15165. Bergondo. A Coruña
fernanda@tanfresco.com

²Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología Celular e Molecular. Facultade de Ciencias.
Universidade da Coruña. Rúa Alejandro de la Sota, 1. 15008 A Coruña.

El análisis preliminar de la microbiota presente en moluscos bivalvos pasteurizados determinó que el grupo encontrado con mayor frecuencia en todas las muestras fue *Bacillus* spp. Se procedió a la caracterización e identificación mediante amplificación directa por PCR del gen del 16S rRNA de estas cepas aisladas previamente.

La especie identificada con la frecuencia relativa más alta fue *Bacillus licheniformis*, siendo además su frecuencia significativamente mayor a la del resto de las especies encontradas. Algunas cepas de microorganismos esporulados inicialmente adscritos al género *Bacillus* por pruebas bioquímicas de identificación, fueron finalmente identificadas como pertenecientes a los géneros *Paenibacillus* y *Sporosarcina*.

A partir de muestras de producto incubadas durante un período de tiempo superior a su vida comercial y utilizando medios de cultivo desarrollados específicamente, se investigó nuevamente la microbiota. Se aislaron colonias obtenidas en estos medios específicos y se valoraron las tasas de crecimiento a la temperatura de conservación del producto durante su etapa de comercialización. De entre los 75 aislamientos obtenidos, sólo un 18,6% presentaron un crecimiento apreciable a dicha temperatura. Estos aislamientos fueron seleccionados e identificados por métodos moleculares. La identificación reveló que las cepas seleccionadas correspondían a las especies *Bacillus licheniformis*, *Sporosarcina aquimarina* y *Bacillus simplex*.

P-34 DESARROLLO DE UN METODO MOLECULAR DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN FORMATO KIT

M. Gómez^{1} V. M. Barberá², M. A. Yáñez² y V. Catalán²*

¹APPLUS+ Medio Ambiente, Secundino López 1 bajo. E15702 Santiago de Compostela

²APPLUS+ Medio Ambiente. Polígono de las Atalayas. C/Del Dracma 16-19. E03114 Alicante.
mgomezl@appluscorp.com

Los métodos más habitualmente empleados en el diagnóstico microbiológico están basados en caracteres fenotípicos, siendo el aislamiento en cultivo el más extendido. La obtención por aislamiento en cultivo de colonias presuntivas obliga a su identificación y confirmación, generalmente mediante ensayos metabólicos o pruebas inmunológicas. Sin embargo, estas metodologías presentan importantes inconvenientes y limitaciones, como el tiempo para la obtención de resultados que suele ser largo entre 24 y 48 horas, son bastante heterogéneas lo que suele implicar una manipulación larga y tediosa, y en muchos casos la interpretación de los resultados puede ser ambigua.

El diagnóstico molecular basado en la amplificación de secuencias de DNA mediante la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede contribuir a mejorar estos inconvenientes. El tiempo para la obtención de resultados una vez aislado el DNA es de unas pocas horas. Además, son métodos homogéneos, es decir se prepara de igual manera para todos los microorganismos a confirmar y la interpretación de los resultados es sencilla, rápida y objetiva, siendo además métodos extremadamente sensibles y muy específicos. Finalmente, el coste económico es inferior al de una confirmación convencional, permitiendo además seguir empleando el método de aislamiento en cultivo que en muchos casos es el procedimiento oficial.

Con este objetivo, se han desarrollado dos sistemas de amplificación simultánea, uno por PCR convencional y otro por PCR a tiempo-real, empleando SYBR Green, para diez diferentes microorganismos, *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O-157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica*. Las correspondientes mezclas de reacción incorporan un control interno para descartar posibles falsos negativos por inhibición, así como verificar la calidad de la reacción. Finalmente, para la validación del kit se ensayaron 120 cepas diferentes pertenecientes a 22 géneros. Los microorganismos investigados por este sistema pueden proceder de múltiples tipos de muestras, como alimentos, muestras de origen medioambiental, cámaras frigoríficas, hospitales, etc., convirtiéndose en una alternativa eficaz a los métodos habituales de confirmación

P-35 DETECCIÓN GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS

B. Bermejo, A. Antón e I. Avalos*

**1Unidad Virología y Microbiología Molecular. Laboratorio Análisis Dr. Echevarne, Provenza 312, Barcelona, España. bbermejo@echevarne.com*

BREVE DESCRIPCIÓN

Método para la detección e identificación por amplificación genética de microorganismos patógenos en alimentos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Los patógenos que se detectan son: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Clostridium perfringens*.

DIANAS DE AMPLIFICACION

Para la detección de estos patógenos se han seleccionado unas regiones conservadas y específicas del genoma de cada uno de ellos que permiten la utilización de unos “primers” oligonucleotídicos que reconocen de forma específica cada uno de estos microorganismos.

El método utilizado es una alternativa robusta, rápida y altamente reproducible dado que incluye la amplificación de un control genómico interno que se añade a la muestra inicial. Este procedimiento permite en todo momento la evaluación del rendimiento del proceso de extracción y de cualquier posible inhibición enzimática de la PCR.

ENSAYO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO REAL

En el proceso de amplificación de las regiones conservadas del genoma de los diferentes patógenos, así como del control interno del método la detección cíclica de los productos resultantes se visualiza por lectura automática de fluorescencia correspondiente a sondas TaqMan, y al intercalante SYBRGreen I.

VALIDACION Y SENSIBILIDAD DEL ENSAYO.

La validación del ensayo se ha realizado tanto con estándares comerciales como con estándares que se obtienen a partir de ADN extraído de inóculos de las diferentes cepas con concentraciones conocidas de 10^8 o 10^7 ufc/ml.

Los parámetros de amplificación Ct (nº de ciclo de primera detección) son característicos para cada concentración de los diferentes microorganismos patógenos que se detectan. Estos parámetros fijan el límite reproducible de sensibilidad de los diferentes patógenos en Genomas/mg de alimento. Este límite de sensibilidad es de 5 Genomas/mg para *L. monocytogenes* y *S. aureus*, y de 50 Genomas/mg para *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *C. perfringens*.

MICROBIOLOGÍA DE LAS FERMENTACIONES. BACTERIAS LÁCTICAS Y PROBIÓTICAS

P-36 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DEL QUESO DE OVEJA ELABORADO CON DISTINTOS COAGULANTES

E. Galán, R. Gómez, J. Fernández-Salguero, M. Vioque, A. Pino y F. Prados*

**Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edif. Darwin. 14014. Córdoba. ao1fecaj@uco.es*

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la significación de dos concentraciones de un coagulante vegetal liofilizado respecto al cuajo animal sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del queso de oveja.

Se elaboraron lotes de quesos con leche pasteurizada de oveja y adicionada de un cultivo iniciador comercial, empleando la tecnología de fabricación del queso Manchego. Cada uno de los lotes se coaguló con tres agentes diferentes: uno con cuajo animal (CA, 100%), otro con un coagulante vegetal liofilizado (CVL, 100%), procedente de las flores del cardo *Cynara cardunculus*, L. y el tercero con una mezcla de ambos coagulantes (CA/CVL; 50%/50%). Los quesos fueron madurados a 12 °C y 80 % de H.R. durante seis meses, realizándose, a intervalos periódicos, los análisis siguientes: pH, a_w , humedad, acidez y cloruro sódico; los microbiológicos: bacterias aerobias mesófilas, bacterias ácido-lácticas, enterobacterias, coliformes, estafilococos y micrococos; y los sensoriales: intensidad de olor, cremosidad, intensidad de sabor, presencia de sabor amargo y aceptabilidad general.

Durante la maduración no se observaron diferencias significativas entre los quesos elaborados con los diferentes agentes coagulantes en las características fisicoquímicas y microbiológicas. El coagulante vegetal en polvo está libre de gérmenes y por tanto no añade microorganismos a la leche, a diferencia de cuando se emplea el coagulante vegetal en forma de extractos acuosos crudos que está fuertemente contaminado. En los parámetros sensoriales estudiados se ha encontrado que los quesos coagulados con el coagulante vegetal (CVL y CA/CVL) son significativamente más cremosos que los de CA sin presentar un sabor amargo significativamente más alto. La intensidad del sabor en los quesos coagulados con CVL y CA/CVL se alcanza varios meses antes que en los coagulados con cuajo animal.

Como se ha observado en trabajos previos, estudiando la proteólisis, el coagulante vegetal al 100 % o en mezcla al 50 % con cuajo animal se puede usar en la fabricación de queso de leche de oveja pasteurizada, produciendo una aceleración del proceso madurativo en cuanto a las características sensoriales del mismo.

P-37 ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES PRODUCIDOS EN LECHE PASTERIZADA POR CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS, MICROCOCCOS Y LEVADURAS AISLADAS DE QUESOS GALLEGOS

*J. I. Garabal*¹, P. Rodríguez-Alonso¹ y J. A. Centeno²*

**¹ Laboratorio de Tecnología de Productos Lácteos. Dpto. Producción Animal. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Consellería do Medio Rural-Xunta de Galicia, Crta. Betanzos-Mesón do Vento, Km7. Abegondo 15080-A Coruña. jose.ignacio.garabal.sanchez@xunta.es*

²Área de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas s/n, 32004 Ourense.

El estudio de los compuestos volátiles aromáticos producidos en leche por cepas de microorganismos autóctonos, resulta de gran interés al objeto de seleccionar aquellos cultivos con el potencial tecnológico adecuado, con vistas a la preparación de fermentos y cultivos adjuntos de interés para la industria láctea. Gracias al empleo de un sistema de cromatografía de gases con detector selectivo de masas y extractor-concentrador de purga y trampa (PT-GC/MS), se ha puesto a punto una técnica analítica para la determinación de los compuestos volátiles producidos en leche entera pasterizada por 29 cepas seleccionadas (12 lactococos, 7 lactobacilos, 3 micrococcos 2 enterococos, 2 leuconostocs y 3 levaduras) obtenidas de quesos gallegos de leche cruda. Los análisis se efectuaron después de 24 horas y 7 días de incubación a 30±1°C, ajustando varios parámetros que afectaban a la extracción y a la separación cromatográfica con el fin de optimizar el método.

Con el empleo de las librerías de espectros Nist98 y Wiley, y por comparación de los espectros de los cromatogramas de cada una de las muestras, se han identificado un total de 92 compuestos, incluyendo: alcoholes (21), cetonas (14), aldehídos (7), ácidos (3), ésteres (14), compuestos azufrados (2), compuestos hidrocarbonados (25) y otros (6).

Los resultados muestran que las proporciones alcanzadas para los distintos volátiles varían en función del grupo microbiano estudiado, reflejando las particularidades metabólicas de cada género. Los alcoholes y las cetonas fueron los compuestos mayoritarios, aunque alcanzando proporciones relativas diferentes en función del tiempo de incubación y del grupo microbiano. A los 7 días de incubación, las abundancias medias de alcoholes aumentaron en las leches inoculadas con lactobacilos, leuconostoc, lactococos, micrococcos y levaduras, mientras que sólo se observó un aumento de las cetonas para los grupos de lactobacilos y enterococos. El resto de los conjuntos químicos (aldehídos, ésteres, azufrados, hidrocarbonados, compuestos nitrogenados, compuestos fenólicos y otros), algunos de gran interés con vistas a la selección tecnológica dados sus bajos umbrales de percepción, fueron detectados en porcentajes muy variables entre los diferentes grupos microbianos, oscilando entre el 0% y el 13% de los compuestos identificados.

Proyectos INIA RM02-004, RTA 2005-00222. Xunta de Galicia PGIDIT03PXIC50301PN

P-38 APTITUD TECNOLÓGICA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA, AISLADAS DEL QUESO DE GENESTOSO

N. Sacristán, L. González, R. Arenas, H. Sandoval, J. M. Fresno y M. E. Tornadijo*

Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 24071-León. dhntsv@unileon.es

Las bacterias lácticas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de las características organolépticas de los quesos. La capacidad acidificante es probablemente la propiedad más importante de las bacterias lácticas al contribuir a la coagulación y al desarrollo de la textura de los quesos. La utilización de cultivos iniciadores, constituidos por bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales y seleccionadas en base a su aptitud tecnológica y a la capacidad de producir compuestos antimicrobianos frente a microorganismos patógenos, puede tener interés en la elaboración de quesos con leche cruda, al contribuir a la salubridad del producto y a conservar las características tradicionales de los quesos.

Se estudió la aptitud tecnológica de 24 cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso, seleccionadas por su capacidad de producir bacteriocinas. Estas cepas fueron clasificadas a nivel de género por métodos clásicos y se adscribieron a especie mediante técnicas genéticas (PCR). Se determinó la actividad acidificante de las cepas después 6, 12 y 24 h. de incubación a 30°C, así como su capacidad proteolítica y lipolítica evaluadas cualitativamente. La capacidad caseinolítica se comprobó en agar leche y la capacidad de lipólisis de la tributirina en agar tributirina. Se determinó también la actividad enzimática general mediante el sistema API ZYM.

Las 24 cepas de bacterias lácticas fueron adscritas a las siguientes especies: *Enterococcus faecalis* (5 cepas), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (13 cepas), *Leuconostoc mesenteroides* (2 cepas), *Lactobacillus paracasei* (2 cepas), *Leuconostoc paramesenteroides* (1 cepa) y *Lactobacillus plantarum* (1 cepa).

Los lactococos mostraron mayor capacidad acidificante que los lactobacilos, con valores en torno a 0,70 g. ácido láctico/100 mL⁻¹ a las 24 horas de incubación. Los enterococos mostraron una capacidad acidificante similar a la de los lactococos, así como la mayor capacidad para hidrolizar la caseína. Sin embargo, ninguna de las cepas mostró actividad lipolítica.

Ninguna de las 24 cepas mostró actividad α -fucosidasa, α -manosidasa, β -glucuronidasa ni α -galactosidasa. Solamente algunas cepas mostraron actividad fosfatasa alcalina, α -quimotripsina, α -glucosidasa, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. Las dos cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y una cepa de *Lactococcus* presentaron actividad lipasa con valores bajos. Para la actividad esterasa se presentaron valores entre 10 y 20 nmol de sustrato hidrolizado, en las cepas de lactobacilos, tres leuconostocs, dos enterococos y dos lactococos. La actividad β -glusidasa alcanzó valores ≥ 40 nmol para las cuatro cepas que la mostraron. Las actividades leu-arylamidasa, fosfatasa ácida y naftol-fosfohidrolasa se detectaron para todas las cepas ensayadas, con valores que oscilaron entre 5 y 40 o más nmol de sustrato hidrolizado.

Estos resultados junto con los que se deriven de posteriores estudios que tengan como objetivo determinar la actividad enzimática endocelular de las cepas, permitirá seleccionar aquellas con mejores aptitudes tecnológicas para su uso como cultivo iniciador, favoreciendo así la industrialización del queso de Genestoso.

P-39 ALGUNAS PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO DE MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES AISLADOS DE QUESOS GALLEGOS DE LECHE CRUDA

*J. A. Centeno^{*1}, P. Rodríguez-Alonso² y J. I. Garabal²*

¹Área de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas s/n, 32004 Ourense. jcenteno@uvigo.es

²Laboratorio de Tecnología de Productos Lácteos. Dpto. Producción Animal. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Consellería do Medio Rural - Xunta de Galicia, Ctra. Betanzos - Mesón do Vento, km 7. Abegondo, 15080 A Coruña.

El interés del estudio de la microbiota halotolerante presente en las producciones actuales de quesos de leche cruda reside en la evaluación tecnológica y selección de microorganismos con vistas a su empleo como cultivos adjuntos para la fabricación de queso, o de otros derivados lácteos, con el fin de salvaguardar o diversificar las características organolépticas (aroma) de estos productos. Los nuevos microorganismos contribuirán a incrementar el abanico de aptitudes de interés tecnológico de los ya disponibles.

En el presente trabajo se analizaron 20 quesos de leche cruda correspondientes a las cuatro denominaciones de origen elaboradas en Galicia (6 Arzúa-Ulloa, 4 Tetilla, 6 Cebreiro y 4 San Simón da Costa), seleccionados en función de su (mejor) perfil sensorial. Las diluciones correspondientes de las muestras se sembraron en agar tripticosa soja (TSA) adicionado de 6% de cloruro sódico, incubándose a 30 ± 1 °C durante 5 días.

Los recuentos medios de microorganismos halotolerantes estuvieron comprendidos entre 5,56 log ufc/g para el queso San Simón da Costa (quesos de 2-4 meses de maduración) y 6,88 log ufc/g para el queso Cebreiro (quesos de 2-4 semanas). De un total de 170 aislados, 17 fueron identificados como micrococáceas, 26 como estafilococáceas, 19 como bacilos Gram-positivos y catalasa-positivos, 31 como cocos Gram-positivos y catalasa negativos (presuntos enterococos), 18 como bacilos Gram-positivos y catalasa-negativos (presuntos lactobacilos) y 50 como levaduras, la mayoría (34) aisladas de quesos Cebreiro.

Diez de los cultivos de micrococáceas y 10 de los aislados de estafilococáceas ofrecieron notas aromáticas del tipo rancio-queso-picante en leche entera pasteurizada inoculada con los mismos, por lo que fueron seleccionados para su caracterización posterior. Asimismo se seleccionaron 21 cultivos de levaduras, 10 de los cuales originaron olores del tipo afrutado o mosto-vino en leche entera pasteurizada, 9 ofrecieron matices del tipo rancio-queso-picante y 2 fueron responsables de la aparición de un olor característico que se describió como a "corteza de queso de leche cruda".

Se comprobaron actividades proteolíticas exocelulares sobre caseinato de calcio para 16 de los aislados seleccionados (5 micrococáceas, 7 estafilococáceas y 4 levaduras), y actividades lipolíticas exocelulares sobre tributirina para 21 de estos cultivos (4 micrococáceas, 7 estafilococáceas y 10 levaduras). Los resultados indican un interés tecnológico de varias de las cepas seleccionadas, que deberán ser sometidas a futuras pruebas de caracterización con objeto de validar su posible utilización comercial.

Proyectos INIA RM02-004, RTA 2005-00222. Xunta de Galicia PGIDIT03PXIC50301PN

P-40 INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS EN LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DEL VINO

*P. Santamaría^{*1}, R. López¹, P. Garijo y A. R. Gutiérrez²*

**1Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Instituto de calidad de La Rioja (CIDA). Ctra. Mendavia-Logroño, P.K. 87.8, 26071 Logroño (La Rioja). microbiologia.cida@larioja.org*

²Universidad de La Rioja. Departamento de Agricultura y Alimentación. Madre de Dios 51, 26006 Logroño.

En la elaboración de un vino tinto, la composición y cantidad en compuestos polifenólicos juegan un papel importante en la calidad, ya que contribuyen a sus características sensoriales, principalmente color y astringencia, y determinan asimismo sus propiedades antioxidantes.

La composición polifenólica depende de muchos factores: variedad de uva, maceración, condiciones de fermentación, etc. Dentro de este contexto, se sabe que las levaduras se encuentran entre las causas que disminuyen el contenido en polifenoles, mediante un mecanismo exclusivamente físico, debido a la adsorción, principalmente de antocianos, que se produce en su pared celular. Durante la elaboración, la población de levaduras puede alcanzar valores superiores a 10^8 cfu/ml, lo que da lugar a una superficie de paredes celulares de 10 a 12 m² por litro de vino, por lo que es fácil comprender la capacidad de fijación de materia colorante que tiene la pared de la cepa de levadura y que se perderá con las lías. Cada cepa posee una estructura glicoproteica propia de su pared que provoca una mayor o menor adsorción de antocianos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la adsorción de compuestos polifenólicos por parte de las paredes de las levaduras, de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pertenecientes al banco de levaduras autóctonas de la D.O.Ca. Rioja, y que fueron aisladas durante dos años consecutivos durante un trabajo de selección de levaduras para la elaboración de vinos tintos.

Por una parte, se realizaron fermentaciones con mostos tintos de la variedad Tempranillo obtenido mediante estrujado y despalillado. La pasta resultante se pasteurizó, para extracción de color y esterilización, y se prensó. Los vinos elaborados mediante siembra de las diferentes cepas se analizaron en cuanto a sus parámetros de color.

Por otra se determinó la capacidad de adsorción de la pared celular, independientemente de las condiciones de fermentación, mediante adición de distintas concentraciones de lías en un vino de composición polifenólica conocida.

En ambos casos, los resultados obtenidos mostraron diferencias en la capacidad de fijación de la materia colorante entre los distintos clones y por tanto en el color de los vinos con ellos elaborados.

P-41 ACTIVIDAD β -GLUCOSIDÁSICA EN LEVADURAS VÍNICAS

M. Chacón Ocaña, M. Arévalo Villena y A. Briones Pérez*

Área de Tecnología de los Alimentos, Dpto. de Química analítica y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Castilla la Mancha. Campus Universitario, Av. Camilo José Cela s/n, 13071 Ciudad Real. Maria.Chacon@uclm.es

Una de las aplicaciones más importante de los microorganismos es la producción de enzimas. Las levaduras, forman un gran número de proteínas necesarias para su desarrollo que desempeñan funciones muy variadas. Las enzimas más importantes en Enología son las proteasas, oxidorreductoras y β -glucosidasas, siendo estas últimas el objeto del presente estudio.

Las β -glucosidasas son responsables de la hidrólisis de los precursores del aroma y por tanto del incremento de la concentración de compuestos volátiles responsables del carácter afrutado de los vinos. Hasta el momento, se han aislado de plantas, de la propia uva o de microorganismos. Las dos primeras fuentes resultan poco útiles en Enología debido a que en las condiciones de vinificación se ven fuertemente inhibidas por el bajo pH, alta concentración de azúcar al principio del proceso y alta de etanol al final quedando como alternativa más adecuada la procedente de microorganismos. Hoy en día en la elaboración del vino, y para incrementar la liberación de aromas se usan preparados enzimáticos comerciales de origen fúngico, principalmente de *Aspergillus* spp.

Sin embargo estudios recientes han puesto de manifiesto que las levaduras no *Saccharomyces*, a pesar de su poca capacidad fermentativa y baja tolerancia al etanol, poseen interesantes actividades enzimáticas, entre las que se encuentra la β -glucosidásica. Son levaduras de ecosistemas vínicos, adaptadas a su medio ecológico por lo que su interacción en el proceso no implicaría el uso de agentes externos.

Así, el objetivo de este estudio fue la búsqueda de la actividad enzimática β -glucosidásica en levaduras vínicas no *Saccharomyces*, con la finalidad de comprobar su posible contribución en la hidrólisis de los precursores del aroma en mostos y vinos.

Se partió de 13 muestras de mosto tomadas en distintas bodegas y se realizó un "screening" cualitativo sobre medio YPC con el fin de seleccionar aquellas levaduras no *Saccharomyces* que mostraban actividad β -glucosidásica. La cuantificación de la actividad tanto extracelular como asociada a la pared celular, se realizó mediante un protocolo rápido y eficaz basado en la medida de la glucosa liberada a partir de la hidrólisis de la celobiosa. Este método permitió conocer que de las 260 levaduras estudiadas, solo un 37% poseían las enzimas. Algunas cepas de *Zigosaccharomyces mellis*, *Candida vini* o *Candida apicola*, poseían la mayor actividad extracelular, no viéndose afectada por la presencia de etanol o ácido acético, lo que las hace buenas candidatas para su aplicación en procesos de vinificación.

P-42 MOMENTO Y CAUSAS DE LA GENERACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS DURANTE LA VINIFICACIÓN DE TEMPRANILLO

L. Polo, S. Ferrer e I. Pardo*

ENOLAB

Dpto. Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. C/Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot-Valencia.

Las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular, que se forman con frecuencia en bebidas y alimentos fermentados. Veinticuatro aminas diferentes se han identificado en vinos, siendo la putrescina la más abundante. También se han encontrado isoamilamina, histamina, tiramina, cadaverina y feniletilamina, aunque en concentraciones más bajas. Las aminas pueden estar presentes de forma natural en el mosto, pero también pueden ser formadas por las bacterias lácticas como consecuencia de la descarboxilación de los aminoácidos presentes en el mosto o en el vino. Las bacterias lácticas están presentes a lo largo de toda la vinificación. Las poblaciones más altas se detectan tras la fermentación alcohólica y durante la maloláctica. Algunos autores han encontrado una concentración más alta de aminas después de la fermentación maloláctica (FML). Otros han observado un aumento durante el envejecimiento.

Los objetivos de este trabajo han sido: 1) dilucidar en qué momento del proceso de vinificación se generan las distintas aminas biógenas; 2) evaluar la efectividad del uso de cultivos malolácticos seleccionados para minimizar estos compuestos y 3) conocer la influencia del tipo recipiente en el que se lleva a cabo la fermentación maloláctica (acero inoxidable o barricas de roble) sobre la concentración final de aminas.

Los resultados obtenidos muestran que el aumento de aminas durante la fermentación maloláctica no era importante, produciéndose éstas principalmente durante el periodo de envejecimiento, sobre todo en los 4 primeros meses. Durante ese periodo aumentan la histamina y putrescina fundamentalmente, aunque también hay pequeños aumentos de tiramina y cadaverina. Se ha observado que la cepa seleccionada utilizada como cultivo iniciador en la bodega, aparece tanto en vinos inoculados como en los no inoculados. Se ha constatado que los mayores aumentos de putrescina se dan en vinos no inoculados en los que hay una concentración bacteriana importante tras la FML. Las concentraciones más elevadas de histamina se dan tanto en vinos inoculados como no inoculados en los que coexisten poblaciones autóctonas y seleccionadas en altas concentraciones tras la FML. Se ha demostrado que las cepas autóctonas eran capaces de producir tanto putrescina como histamina, tanto en medios sintéticos como en vino. No parece haber correlación entre la concentración de aminas y el tipo de recipiente en el que se llevó a cabo la FML.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA VIN03-014-C3-1. Agradecemos la ayuda prestada por José María Landete y Rosana Medina.

P-43 INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DEL MOSTO DE UVA EN LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA ESPONTÁNEA

P. Santamaría-Aquilué¹, P. Garijo-Fernández¹, C. Tenorio-Rodríguez¹, R. López-Martín¹ y A. R. Gutiérrez-Viguera^{2}*

¹*Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (C.I.D.A). Ctra. Logroño-Mendavia NA-134, km 88. 26071. Logroño. enologia.cida@larioja.org*

²*Dpto. de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. Madre de Dios 51, 26006 Logroño. ana-rosa.gutierrez@daa.unirioja.es*

El vino es esencialmente el producto de la fermentación alcohólica, proceso mediante el cual los azúcares de la uva se transforman en etanol y otros productos secundarios debido a la acción de las levaduras. Las levaduras del género *Saccharomyces* y concretamente de la especie *S. cerevisiae*, son consideradas como levaduras principales porque por sí solas son capaces de conducir hasta el final el proceso de la fermentación. Dentro de la especie *S. cerevisiae* existe una gran diversidad clonal, es decir levaduras con comportamientos enológicos distintos. En el curso de una fermentación, el número de cepas distintas de la especie *S. cerevisiae* que participan varía y con ello la complejidad del vino obtenido. Se han descrito distintos factores que afectan a esta variabilidad (región, añada, tecnología de vinificación, etc.).

En este trabajo se ha estudiado la diversidad de cepas que participan en la fermentación en una bodega de la D.O.Ca. Rioja durante 9 años consecutivos (1997-2005), y su relación con el grado alcohólico del vino elaborado. Para ello, se han tomado muestras en un depósito de la bodega en tres momentos de la fermentación alcohólica espontánea (24 horas del encubado, fermentación tumultuosa y final de fermentación). En cada momento se aislaron 10 cepas de levadura que posteriormente fueron identificadas hasta nivel de clon mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial. En la campaña de 2005 se muestrearon dos depósitos (A Y B) y se aislaron 25 cepas en cada momento.

Los resultados encontrados mostraron que la mayoría de las levaduras aisladas a las 24 horas del encubado no pertenecían a la especie *S. cerevisiae*. Sin embargo, en las otras dos fases el 100% de los aislados fueron clasificados dentro de este grupo. También se pudo observar que el número de clones distintos de *S. cerevisiae* presentes disminuye drásticamente cuando el grado alcohólico del vino que se está elaborando es anormalmente elevado, debido probablemente a la incapacidad de muchas cepas para desarrollarse en esas condiciones. No obstante, otro tipo de factores influyen amortiguando o actuando sinérgicamente con el contenido en azúcar, pues en la campaña de 2005 se detecta una disminución de la diversidad en vinificaciones con grados alcohólicos normales.

P-44 ESTUDIO DE LAS POBLACIONES DE BACTERIAS LÁCTICAS DURANTE LA VINIFICACIÓN: COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO

S. Callejón, L. Polo*, S. Ferrer e I. Pardo*

ENOLAB

Dpto. Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot-Valencia.

Generalmente, el análisis de las poblaciones microbianas se circunscribe a los vinos terminados y listos para embotellar con el fin de estimar el riesgo de alteración durante el periodo de comercialización. Sin embargo, es importante conocer la evolución de la microbiota autóctona a lo largo del proceso de vinificación y envejecimiento del vino, para predecir con suficiente antelación los cambios beneficiosos o perjudiciales que pueda sufrir el vino como consecuencia del crecimiento microbiano. Este control microbiológico es tanto más importante en vinos que sufren elaboraciones complejas para conseguir vinos de alta expresión, ya que permitirá asegurar la obtención de vinos de calidad.

Entre las bacterias que existen en el vino están las bacterias lácticas, responsables de la fermentación maloláctica pero también de diversas alteraciones del vino. También se desarrollan bacterias acéticas responsables de la acetificación. Los métodos que normalmente se utilizan para el recuento de microorganismos son la siembra sobre medios sólidos o la observación microscópica, que puede implicar el uso de colorantes que se unen selectivamente a las células vivas o a las muertas. Estos métodos permiten únicamente el recuento pero no la identificación de las especies que aparecen en los vinos. Un método que permite a la vez ambos objetivos: el recuento y la identificación de especies microbianas, directamente de vino sin necesidad de un aislamiento previo, es la hibridación "in situ" (FISH). Esta técnica que se basa en la utilización de sondas fluorescentes específicas de especie o de grupos taxonómicos superiores, se ha adaptado recientemente para el estudio de la microbiota del vino. Para estimar la concentración de células de cada especie se utiliza el programa de análisis de imagen CellC[®].

Para este estudio procesamos en paralelo las muestras tomadas a lo largo de la fermentación y durante el envejecimiento del vino, y se analizaron utilizando la técnica de FISH y el crecimiento en placa con posterior identificación de las bacterias mediante 16S-ARDRA y PCR específica.

Los recuentos obtenidos con ambos tipos de aproximación son comparables, teniendo en cuenta que FISH permite un recuento de totales mientras que el crecimiento en placa permite sólo el de viables. Se ha observado una total correlación en los resultados de identificación observados por una y otra técnica. Ello confirma que la técnica de FISH permite cuantificar e identificar de forma rápida (unas 3 horas) las distintas poblaciones microbianas a lo largo de la vinificación, además de ser una tecnología directamente aplicable en bodega.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA VIN03-014-C3-1.

P-45 ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE LMW RNA DE ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN VINO DE LA REGIÓN DE DÃO EN PORTUGAL

L. R. Silva, M. E. Trujillo, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina y E. Velásquez*

Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca.

**Present address: Departamento das Indústrias Agro-Alimentares. Escola Superior Agrária de Viseu. Viseu, Portugal. luis@esav.ipv.pt*

La identificación de bacterias es un proceso complejo que incluye la secuenciación del gen ribosómico 16S para clasificar a los aislados a nivel de género y la hibridación de DNA total para la delimitación entre especies del mismo género. Ambas técnicas tienen limitaciones, la secuenciación del gen 16S no permite diferenciar entre especies filogenéticamente próximas del mismo género y la hibridación del DNA total no puede aplicarse a grandes poblaciones.

El análisis de los perfiles de LMW RNA es una técnica segura, fácil y rápida que puede aplicarse a un número alto de muestras y permite la diferenciación entre géneros y especies de microorganismos. Estos perfiles están constituidos por el RNA ribosómico 5S y por los RNAs de transferencia en procariotas. La separación de estas moléculas de pequeño tamaño sólo es posible utilizando una electroforesis en saltos de voltaje que se denomina “staircase electrophoresis”.

En este trabajo hemos analizado los perfiles de LMW RNA de varias cepas de bacterias aisladas a partir de muestras de vino tinto de la región del Dão en Portugal. La secuencia completa del gen ribosómico 16S mostró que las especies filogenéticamente más próximas a las cepas aisladas eran *Oenococcus oeni*, *Gluconobacter oxydans* subsp. *oxydans*, *Acetobacter aceti*, *A. pomorum*, *A. pasteurianus* y *Staphylococcus warnerii*.

El análisis de los perfiles de LMW RNA confirmó la identificación basada en la secuencia del gen 16S en la mayoría de los casos. Sin embargo, los aislados próximos a *A. aceti* mostraron diferencias en los perfiles de tRNA que sugerían su pertenencia a una especie diferente, hipótesis que fue confirmada mediante hibridación de DNA total permitiendo la descripción de la nueva especie *A. oeni*. Además, los aislados próximos a *G. oxydans* subsp. *oxydans* presentaron una banda de tRNA diferente con respecto a la cepa tipo, por lo que podrían constituir una nueva subespecie. Actualmente se está llevando a cabo la hibridación de DNA total para establecer conclusiones definitivas.

Los resultados de este estudio confirman que los perfiles de LMW RNA constituyen una herramienta muy útil para la identificación de especies bacterianas ya que permite confirmar los resultados obtenidos por secuenciación del gen ribosómico 16S y decidir en qué casos es necesaria la hibridación de DNA total para definir especies.

P-46 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y ORGANOLÉPTICO DE TAPONES DE CORCHO DESTINADOS AL EMBOTELLADO DE VINOS

F. Díaz Yubero, M. Díaz del Río, A. R. Gutiérrez Viguera, C. Olarte Martínez, y S. Sanz Cervera*

*Dpto. Agricultura y Alimentación Edificio CCT, C/Madre de Dios, 51 26006 Logroño (La Rioja).
susana.sanz@daa.unirioja.es

Un problema importante que plantea la utilización de los tapones de corcho para el cierre de botellas de vidrio, es la aparición de aromas y sabores extraños que, comúnmente se denominan como “olor y sabor a corcho” debidos a la presencia de haloanisoles, principalmente el 2-4-6 tricloroanisol. La formación de los haloanisoles es debida a la biometilación de los halofenoles por mohos. El defecto con más propiedad debería denominarse “olor y sabor de humedad o mohoso”; y produce un fuerte rechazo por parte de los consumidores.

El análisis de los haloanisoles se realiza por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura de electrones. Previamente a la cromatografía hay que realizar una extracción por maceración y una concentración de la muestra. Este análisis exige medios instrumentales costosos y mucho tiempo. Por ello sólo se puede aplicar a un número reducido de tapones por lo que su significación estadística en una partida de tapones, que siempre consta de un elevado número, es muy pequeña.

En este trabajo nos propusimos valorar un sistema de estimación de la calidad de los corchos basado en su análisis microbiológico (recuento e identificación de mohos) y organoléptico (maceración del corcho en 50 ml de agua de bajo grado de mineralización y valoración sensorial posterior), un método mucho más sencillo, rápido y de menor coste económico.

Se analizaron dos lotes de 25 corchos cada uno procedentes de una partida en la que se habían detectado problemas de “olor a corcho” en vinos embotellados. De los 25 corchos del primer lote, 5 presentaron crecimiento de mohos (un 20%) que se identificaron como pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Alternaria* y *Monilia*. En el análisis organoléptico, fueron tres las muestras que presentaron un “olor a humedad” de intensidad media.

En el segundo lote, fueron 11 las muestras que presentaron crecimiento de mohos (un 44%), correspondientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y *Sporendonema*. El olor a humedad fue detectado en dos muestras: en una de ellas este olor fue descrito como ligero y en la otra como fuerte. En ambos corchos se observó crecimiento de mohos al ser cultivados, que se identificaron como pertenecientes a los géneros *Sporendonema* y *Trichoderma* respectivamente.

La metodología propuesta podría ser una herramienta útil para detectar partidas potencialmente problemáticas de corchos. El análisis microbiológico es una información valiosa aunque hay que profundizar en su relación con el análisis organoléptico.

P-47 DETECCIÓN DE *Brettanomyces* EN VINOS TINTOS DE GALICIA

P. Blanco, S. Cortés, A. Losada e I. Orriols*

*Estación de Viticultura e Enología de Galicia. Ponte San Clodio s/n, Leiro, 32427 Ourense.
evegalab@cesga.es*

La producción de vino representa un importante sector de mercado dentro de la economía gallega. En las dos Denominaciones de Origen con mayor extensión de viñedo (Rías Baixas y Ribeiro) el vino blanco constituye la base de su producción. La elaboración de tinto tiene un papel relevante, especialmente en las DD.OO. Ribeira Sacra, Valdeorras y Monterrei, en las cuales los tintos alcanzan un elevado porcentaje de la producción total. Los tintos gallegos son vinos de consumo preferentemente jóvenes.

El seguimiento y control microbiológico durante la elaboración del vino es un factor esencial que determina la calidad y conservación del mismo. En vinos tintos es muy importante el control de ciertas levaduras que pueden causar alteraciones organolépticas y, por consiguiente, pérdidas económicas para la bodega. Una de estas levaduras capaces de deteriorar el vino es *Brettanomyces*, responsable del defecto conocido como olor a establo o sudor de caballo. Este defecto está asociado a la producción de compuestos fenólicos del tipo 4-etil fenol y 4-etil guayacol, a partir de sus precursores, los ácidos p-cumárico y p-ferúlico, que están presentes en el vino. La presencia de *Brettanomyces* y estos fenoles volátiles ha sido detectada especialmente en vinos tintos de bodega, una tendencia que últimamente se está imponiendo en varias bodegas de las DD.OO. gallegas.

La Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA), en colaboración con las distintas DD.OO. gallegas, está llevando a cabo un estudio sobre la presencia de *Brettanomyces* en vinos tintos gallegos y su efecto en la calidad de los mismos. En este trabajo se presentan algunos de los resultados obtenidos durante dicha investigación.

Para la detección de *Brettanomyces* se filtraron 50 mL de vino a través de una membrana de 0,22 µm que se incubó en placas de medio DBDM. Después de 10 días de incubación se observó la presencia ó ausencia de crecimiento y el desprendimiento de olor característico de los compuestos fenólicos. Además, se determinaron los parámetros analíticos básicos de los vinos (grado alcohólico, azúcares, pH, sulfuroso libre y total) que pueden repercutir en el desarrollo de la levadura.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que *Brettanomyces* estaba presente en algunas de las muestras de vino analizadas, aunque el porcentaje variaba de unas DD.OO. a otras. La presencia de *Brettanomyces* se relacionó con la composición química del vino y con la detección sensorial de los aromas característicos a sudor de caballo o establo, ligados a esta alteración.

P-48 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD AMINOBIOGÉNICA DE CEPAS DE *Oenococcus oeni* AISLADAS DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA DE VINOS TINTOS CENCIBEL ELABORADOS EN CASTILLA-LA MANCHA

P. Ruíz Pérez^{*1}, *S. Gómez Alonso*², *P. Izquierdo Cañas*², *S. Seseña Prieto*¹ y *M. Ll. Palop*¹

^{*1}Area de Tecnología de los Alimentos, Dpto. de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha. Avda. Carlos III s/n. 45071 Toledo. *Patricia.Ruiz@uclm.es*

²Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha. Crta. Toledo-Albacete s/n. 13700 Tomelloso Ciudad Real.

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso clave para la obtención de vinos tintos de calidad, en especial aquellos que se destinan a crianza y sufren un envejecimiento posterior en botella. Tradicionalmente, la FML se ha dejado en manos de la microbiota láctica presente de forma espontánea en las bodegas, pero actualmente se tiende a utilizar cultivos iniciadores con bacterias seleccionadas para un mejor control del proceso. Los cultivos iniciadores comercializados están constituidos por cepas de *Oenococcus oeni* si bien, y al objeto de mantener las características de identidad de los vinos, es conveniente utilizar cepas autóctonas que presenten propiedades tecnológicas adecuadas.

Por los riesgos toxicológicos que la presencia de aminas biógenas en los alimentos puede suponer, la determinación de la capacidad aminobiogénica, es uno de los primeros estudios que deben realizarse en la selección de cepas. Entre las bacterias lácticas (BL) es frecuente encontrar especies y cepas, algunos autores indican que es esta una propiedad con carácter intraespecífico, capaces de descarboxilar algunos aminoácidos, proceso que lleva a la formación de CO₂ y de la correspondiente amina biógena. Las aminas biógenas encontradas con mayor frecuencia en los vinos son la histamina, la tiramina, la putrescina y la cadaverina, si bien, y por su carácter tóxico a bajas concentraciones, es la histamina la más importante.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la capacidad aminobiogénica de 90 cepas de *Oenococcus oeni*, aisladas de muestras de vino tomadas en distintas etapas de la FML espontánea en 9 bodegas situadas en Castilla-La Mancha. Estas cepas han sido caracterizadas molecularmente mediante RAPD-PCR y son las representantes de los distintos clusters obtenidos en el tratamiento estadístico de los 682 aislados obtenidos inicialmente.

La actividad amino-descarboxilasa de las cepas se ensayó tanto cualitativa como cuantitativamente. Para el ensayo cualitativo se siguió el procedimiento descrito por Moreno-Arribas *et al.* (2003) utilizando el medio descrito por Majjala (1993) suplementado con un 0,005 % de piridoxal fosfato y un 1% de los aminoácidos L-histidina, L-tirosina, L-ornitina monohidrato y L-lisina monohidrato. Las cepas crecidas en agar MLO se sembraron por estría en placas con los distintos aminoácidos que se incubaron a 28 °C en anaerobiosis durante 7 días. Las cepas positivas en el ensayo cualitativo se sembraron en caldo Majjala y tras la incubación se determinó mediante HPLC la concentración residual de aminoácidos y de las correspondientes aminas biógenas.

Los resultados del ensayo cualitativo realizado a las 90 cepas de *Oenococcus oeni* procedentes de las 9 bodegas analizadas, indicaron que 15 de ellas eran capaces de descarboxilar, aunque en algunos casos débilmente, alguno de los 4 aminoácidos ensayados. Para la confirmación de estos resultados, las cepas han sido cultivadas en medio líquido para su posterior análisis por cromatografía líquida. Asimismo, en aquellas que resulten positivas en el análisis confirmativo, se realizarán PCRs específicas para detectar la presencia de los genes de las correspondientes descarboxilasas.

P-49 RELACIÓN ENTRE EL MOMENTO DE INOCULACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS Y LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DEL VINO

R. López^{*1}, A. R. Gutiérrez², C. Tenorio¹, P. Garijo¹ y P. Santamaría¹

^{*1}Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Instituto de Calidad de La Rioja. Ctra. Mendavia-Logroño NA-134, P.K. 87.8. 26071 Logroño. enologia.cida@larioja.org

²Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. Madre de Dios 51, 26006 Logroño.

El proceso de elaboración del vino tinto incluye dos etapas fundamentales: la fermentación alcohólica (FA), mediante la cual se transforman los azúcares de la uva en etanol y otros productos secundarios por la acción de las levaduras y la fermentación maloláctica (FML) que consiste principalmente en la transformación de ácido L-málico en ácido L-láctico, mediante la intervención de bacterias lácticas (BL), especialmente de la especie *Oenococcus oeni*, con una influencia positiva en el aroma del vino y en su calidad.

Tradicionalmente esta segunda fermentación se ha llevado a cabo por la flora espontánea de bacterias que acompaña al vino. En los últimos años se empiezan a utilizar cultivos iniciadores de bacterias lácticas seleccionadas que se inoculan en el vino una vez finalizada la FA, cuando los azúcares fermentables han sido consumidos por las levaduras para evitar el riesgo de producción de ácido acético y de ácido D-láctico. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que determinadas cepas de *Oenococcus oeni* pueden conducir la FML en mostos con bajo pH sin atacar el azúcar, por lo que el momento de la inoculación está siendo objeto de numerosos estudios, ya que permitiría una mejor adaptación de las bacterias inoculadas en ausencia de etanol y con mayor cantidad de nutrientes.

En este trabajo se elaboró por duplicado un vino de la forma tradicional con inoculación secuencial de levaduras y bacterias y otro, procedente de la misma uva, con inoculación simultánea de las mismas levaduras y bacterias comerciales. Los resultados obtenidos mostraron que la inoculación de bacterias de forma simultánea a la de levaduras, no afectó a la duración de la fermentación alcohólica, que fue de 12 días en ambos casos y que su FML tuvo lugar en 22 días frente a los 33 días en los inoculados con BL después de la FA. Así, el tiempo total de elaboración fue de 22 y 45 días respectivamente. La siembra de bacterias en el mosto junto con las levaduras afectó a la composición aromática de los vinos, que tuvieron mayor concentración de alcoholes superiores, acetatos y ésteres y menor de acetoina y butirolactona, lo que estaría de acuerdo con la mejora aromática detectada en el análisis organoléptico, y con la vocación de estos vinos para ser consumidos como vinos jóvenes.

P-50 RECuento, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN UN EMBUTIDO TIPO SALCHICHÓN

C. Gianni¹, M. C. López Mendoza² y R. Jordano Salinas^{*3}

¹Dpto. de Química Orgánica e Industrial. Universidad de Parma, I-43100 Parma (Italy)

²Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad Cardenal Herrera-CEU, 46113 Moncada (Valencia). clopez@uch.ceu.es

^{*3}Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba. rjordano@uco.es

Se ha llevado a cabo el recuento, aislamiento e identificación de la población de levaduras presente en un embutido tipo salchichón, elaborado en Italia, a lo largo de su proceso de maduración en una cámara a escala piloto bajo condiciones controladas. Las muestras ($n = 21$) fueron analizadas en tres etapas del proceso de elaboración: al inicio (producto fresco), tras 15 días de maduración (producto semicurado) y al término del periodo de maduración (60 días). Se partió de 10 g de muestra que se homogeneizaron en Stomacher con 90 ml de agua de peptona estéril (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK) preparándose las diluciones decimales precisas. La enumeración de levaduras se llevo a cabo en PDA agar (Merck, Darmstadt, Germany) acidificado e incubado a 25°C/72 h, expresándose los resultados en log ufc/g. Se seleccionaron un total de cien colonias representativas que fueron transferidas a agar OCYE (Oxoid) incubado a 25°C/72 h. Las cepas aisladas fueron identificadas a nivel de especie mediante un procedimiento de caracterización morfológica y bioquímica. Los valores medios del recuento de levaduras, al inicio del proceso y tras 15 y 60 días de maduración, fueron de 2,75, 3,98 y 3,90 log ufc/g, respectivamente. Los recuentos de levaduras experimentaron un incremento de 1,15 log ufc/g (41,81 %, de 2,75 a 3,90) en el curso del proceso de maduración. Los aislamientos se distribuyeron de la siguiente forma: *Candida* (33), *Cryptococcus* (3), *Debaryomyces* (8), *Geotrichum* (7), *Lodderomyces* (5), *Pichia* (39), *Rhodotorula* (4) y *Trichosporon* (1) identificándose un total de 16 especies. En producto fresco *Debaryomyces hansenii* (29,7%) fue predominante seguida de *Rhodotorula* (*R. minuta*, 21,4% y *R. mucilaginosa*, 7,1%), y *Candida japonica* y *Cryptococcus laurentii* (14,3%). En embutido semicurado *Pichia carsonii* (29,4 %) y *Candida lipolytica* (26,5 %) fueron mayoritarias. En producto acabado la presencia de *P. carsonii* experimentó un incrementó significativo (representó el 44,1% de los aislamientos) mientras que *C. lipolytica* descendió de forma acusada (supuso únicamente el 7,7 % de los aislamientos). Finalmente *D. hansenii* fue la única especie detectada a lo largo de toda la experiencia (embutido fresco, semicurado y producto acabado).

P-51 ESTUDIO DEL PROCESO MICROBIANO DE ELABORACION ARTESANAL DE ACEITUNAS DE MESA, VARIEDAD ARBEQUINA

A. Hurtado, C. Reguant, B. Esteve-Zarzoso, A. Bordons y N. Rozès*

Dpt Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Unitat d'Enologia del CeRTA, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona. albert.hurtado@urv.cat

Las aceitunas de mesa son, junto con el pepinillo, el alimento fermentado más popular en Europa. Principalmente se elaboran siguiendo procesos bien establecidos: aceitunas verdes en salmuera al estilo español, aceitunas negras al natural en salmuera y aceitunas maduras. En Cataluña, la principal variedad de aceituna es la *arbequina* y se elabora artesanalmente en un proceso que no incluye un tratamiento alcalino previo a la puesta en salmuera. Después de la fermentación y durante la conserva, no sólo ha decrecido el amargor de la aceituna sino que los valores nutricionales y las propiedades organolépticas han cambiado. Esta modificación es debida a la competencia que se establece entre levaduras y bacterias lácticas (BAL) que están presentes en la salmuera.

El propósito de este estudio ha sido evaluar las poblaciones de levaduras y BAL presentes en los depósitos de salmuera dónde la aceituna *arbequina* ha fermentado y permanece en conserva antes del envasado. Se ha hecho un estudio de profundidad - tomando muestras a 2 y 20 cm, 1 y 2 metros- durante 6 meses.

Los resultados muestran que la población microbiana principalmente está constituida por levaduras y BAL, aunque también se detectó un reducido número de enterobacterias en medio VRBG. La variabilidad de las especies de levaduras y BAL fue reducida a pesar de la profundidad estudiada y lo prolongado en el tiempo del estudio. Las principales especies de levaduras presentes fueron *Pichia membranaefaciens*, *Pichia anomala* y *Candida boidinii* mientras que las especies de BAL pertenecían al género *Lactobacillus* spp. Entre ellas se detectaron *Lb. pentosus*, *Lb. mali* y *Lb. paraplantarum*.

P-52 OPTIMIZACIÓN DE LA ELECTROTRANSFORMACIÓN DE PRS4C1 EN *Pediococcus acidilactici* P60

M. C. Rodríguez Pérez¹, M. T. Alegre Arribas² y J. M. Mesas Mesas^{*3}

¹Departamento de Fisiología Vegetal, ²Departamento de Microbiología y Parasitología, ³Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología (Tecnología de Alimentos). Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, 27002-Lugo. jmesas@lugo.usc.es

Los pediococos son bacterias lácticas (BAL) utilizadas como “starters” en la elaboración de algunos alimentos fermentados, tanto por su contribución a las propiedades organolépticas de estos, como por la capacidad de algunos pediococos de producir bacteriocinas inhibitoras del crecimiento de otras bacterias (Graham y McKay, 1985; Ramesh, y col., 2000; Giacomini, y col., 2000). La manipulación genética de los pediococos mediante electrotransformación de plásmidos, ha supuesto para la industria alimentaria el desarrollo de “starters” adecuados a procesos alimentarios concretos (Kim y col., 1992; Caldwell y col., 1996), sin embargo las eficiencias de transformación logradas en estos trabajos no son suficientemente altas como para garantizar el éxito de futuras manipulaciones de pediococos. El objetivo del presente trabajo ha consistido en optimizar la electrotransformación de una cepa estandar de *Pediococcus acidilactici* con pRS4C1, un plásmido resistente a cloranfenicol derivado de pRS4 (Alegre y col., 2004) que posee como característica relevante su expresión en BAL de interés alimentario y su carencia de expresión en BAL fecales (Mesas y col., 2006).

Se partió del protocolo de electrotransformación de Kim y col. (1992), que utiliza lisozima como agente esencial de electrocompetencia celular y genera 10² transformantes/ μ g de ADN al cabo de 16-18 horas de expresión. Tras analizar varios factores de electrocompetencia (estado fisiológico de las células, debilitadores de pared, concentración de lisozima, etc.) y varios factores de electroporación (voltaje, concentración de ADN, tiempo de expresión, etc.), hemos concluido que el empleo de altos voltajes sin necesidad de lisozima permite conseguir eficiencias de transformación de 10³-10⁴ transformantes/ μ g de ADN con tiempos de expresión de 2-3 horas. La optimización de la transformación de pRS4C1 en *P. acidilactici* P60 lograda en este trabajo, supone una mejora importante del protocolo ya que se superan en dos órdenes de magnitud las eficiencias de transformación descritas hasta el momento para los pediococos.

Alegre, M.T.; Rodríguez, M.C. y Mesas, J.M. 2004. FEMS Microbiol. Lett. 241, 73-77.

Caldwell, S.L.; McMahon, D.J.; Oberg, C.J. y Broadbent, J.R. 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62, 936-941.

Giacomini, A.; Squartini, A. y Nuti, M.P. 2000. Plasmid 43, 111-122.

Graham, D.C. y McKay, L.L. 1985. Appl. Environ. Microbiol. 50, 532-534.

Kim, W.J.; Ray, B. y Johnson, M.C. 1992. J. Appl. Bacteriol. 72, 201-207.

Mesas, J.M.; Rodríguez, M.C. y Alegre M.T. 2006. Cienc. Tecnol. Aliment. 5, 118-123.

Ramesh, A.; Halami, P.M. y Chandrashekar, A. 2000. World J. Microbiol. Biotechnol. 16, 695-697.

P-53 DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE LA LECHE MATERNA MEDIANTE PCR-DGGE Y CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS DE CLONES

R. Martín¹, H. G. H. J. Heilig², E. Jiménez^{1*}, R. Arroyo¹, L. Fernández¹, E. G. Zoetendal², H. Smidt² y J. M. Rodríguez¹

¹Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. esjimene@vet.ucm.es

²Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, Holanda

El objetivo de este estudio fue determinar las bacterias dominantes en la leche materna mediante dos técnicas independientes de cultivo basadas en el 16S rRNA: la PCR-DGGE y la construcción de librerías de clones. Además, también se pretendía dilucidar si la forma de nacimiento ejerce alguna influencia en la composición de la leche materna.

Para abordar estos objetivos se realizó un estudio en el que participaron diez mujeres sanas y sus respectivos neonatos a término, cinco nacidos por parto y cinco por cesárea programada. De cada pareja madre-niño se obtuvieron muestras de piel, frotis vaginal, frotis rectal, calostro y leche de la madre y meconio y heces del recién nacido. Tras la extracción del DNA microbiano a partir de las muestras biológicas, se procedió a la amplificación de la región variable V6-V8 con cebadores universales. Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante DGGE. El análisis de los geles se realizó mediante el soporte informático Bionumeric, que permite la comparación de los perfiles obtenidos en distintos geles realizados en las mismas condiciones. Paralelamente, se construyeron librerías de clones a partir de 4 muestras de leche, dos obtenidas de mujeres cuyos hijos habían nacido por cesárea y las otras dos de madres cuyos hijos nacieron por parto.

Los perfiles de DGGE obtenidos revelaron que la diversidad de la comunidad bacteriana de la madre y el recién nacido depende de cada madre-hijo y no está relacionada con la forma de nacimiento. Las librerías de clones contenían secuencias pertenecientes a diversas especies de estafilococos, estreptococos, bacterias lácticas, propionibacterias y algunas bacterias Gram-negativas, especialmente *Escherichia coli*. Este hecho podría explicar por qué la mayor parte de estos microorganismos se incluyen entre los primeros colonizadores del intestino del lactante. Las bandas dominantes y comunes a la mayoría de los perfiles de DGGE fueron identificadas como *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia protamaculans*, *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mitis*.

Los resultados de este trabajo indican que la leche materna posee una microbiota propia que representa la fuente importante de bacterias comensales para el intestino del lactante mientras que el tránsito por el canal del parto representaría, en el mejor de los casos, una fuente secundaria de bacterias para el recién nacido.

P-54 EFECTO DEL DESNATADO SOBRE LA MICROFLORA DE LA LECHE CRUDA Y DE LOS BIOFILMS FORMADOS DURANTE SU ALMACENAMIENTO

*J. Vázquez^{*1}, B. Orgaz², J. Kives² y C. San José²*

*^{*1}Dpto. de Bacteriología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Cd. Victoria, Tamaulipas, México. jovazque@vet.ucm.es*

²Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

Si la microflora de la leche cruda no interaccionara con la grasa, la leche desnatada en crudo tendría la misma concentración de microorganismos por mL que la entera de la que procede. Para comprobar esta hipótesis, se centrifugaron en condiciones suaves, muestras de leche cruda de baja calidad microbiológica; se separaron así dos tercios de la grasa, sin perder más del 2.5% de los microorganismos en el sedimento. La separación del 66% de la grasa en 6% del volumen total, conllevó de promedio una pérdida del 86% de los mesófilos totales. En otras palabras, la fracción lipídica resultó retener 100 veces más células microbianas por mL que la fracción acuosa. Del conjunto de los microorganismos psicrotrofos y termodúricos presentes, la proporción retenida por la grasa fue similar (88 y 90%, respectivamente).

Se quiso comprobar si ese fraccionamiento o partición de los microorganismos en dos grupos, en principio en función de su hidrofobicidad superficial, tiene como consecuencia una diferente capacidad de las fracciones resultantes para formar biofilms sobre superficies hidrofílicas. Para ello, se incubaron a 7°C muestras de leche cruda entera y las correspondientes desnatadas, sumergiendo en ambas cupones de vidrio para estudiar los biofilms. La densidad celular de la fase planctónica era en los cultivos de leche desnatada, el 30% de la observable en los de entera. La diferencia en densidad celular era menor sin embargo, en los biofilms, presumiblemente porque los organismos de la leche desnatada, al ser superficialmente más hidrofílicos, se adhieren con más facilidad a superficies también hidrofílicas, como el vidrio o el acero. En la leche desnatada en crudo quedaría pues seleccionada una microflora con mayor capacidad para colonizar muy rápidamente las superficies -generalmente hidrofílicas- de conducciones, tanques y equipos de almacenamiento y procesado. Por otra parte, esa microflora de los biofilms formados a partir de leche desnatada cruda, resultó estar enriquecida, por alguna razón, en microorganismos termodúricos, que pueden instalarse sobre las placas de los intercambiadores de calor y así recontaminar leche ya pasteurizada.

Estos resultados son preliminares. Es necesario ampliar el estudio a muestras más numerosas y diversas y averiguar el efecto de la termización de la leche cruda sobre el resultado del reparto.

P-55 INFLUENCIA DEL SORBITOL SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATAS

L. A. Sarmiento, M. Zúñiga, G. Pérez-Martínez y M. J. Yebra.*

*INST AGROQUIMICA TEC. ALIMENTOS. Polígono La Coma S/N Laboratorio.008. 46980 Paterna.
Valencia. lusarru@hotmail.com*

El sorbitol es un azúcar alcohol utilizado ampliamente en la industria alimentaria como edulcorante bajo en calorías, humectante y estabilizante. En este estudio se ha analizado su efecto potencial como prebiótico en un modelo animal y se ha comparado con un reconocido prebiótico como son los fructooligosacáridos (FOS). Se han utilizado tres grupos de ratas que bebieron durante 16 días agua+sorbitol 10% (grupo-sorbitol), agua+FOS 10% (grupo-FOS), y agua sola (grupo-control). La composición de la microflora en las heces, colon y ciego se ha estudiado por métodos culturales de los grupos bacterianos principales y por PCR de fragmentos de los genes que codifican para el rRNA 16S, seguido de una electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (PCR-DGGE). El consumo de sorbitol modificó cuantitativa y cualitativamente la microflora intestinal de una manera similar a los FOS. Los análisis de PCR-DGGE utilizando cebadores específicos del género *Lactobacillus* demostraron que la población de *Lactobacillus reuteri* y un *Lactobacillus* sp. es mayor en el colon y ciego de las ratas que han consumido sorbitol. En el grupo FOS únicamente aumenta *L. reuteri*. El aumento o persistencia de estas poblaciones bacterianas fue cuantificado mediante PCR a tiempo real.

Los ácidos orgánicos de cadena corta, acetato, propionato y butirato son un importante producto final de la fermentación de prebióticos por bacterias colónicas en el hombre y otros mamíferos. El butirato es la principal fuente energética de las células del epitelio intestinal jugando un importante papel en su crecimiento y diferenciación. La cantidad de butirato aumentó de forma estadísticamente significativa en las ratas que consumieron sorbitol respecto a las del grupo control.

P-56 ENSAYO DE TOLERANCIA ORAL DE DOS BACTERIAS PROBIÓTICAS, *Lactobacillus coriniformis* CECT5711 Y *Lactobacillus gasseri* CECT5714

F. Lara-Villoslada, S. Sierra, R. Martín, J. M. Rodríguez, M. Olivares, y J. Xaus*

Departamento de Biomedicina, Puleva Biotech S.A., 18004 Granada; Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. jmrodrig@vet.ucm.es

Recientemente se han aislado y caracterizado dos nuevas cepas de bacterias probióticas, *Lactobacillus coriniformis* CECT5711 y *Lactobacillus gasseri* CECT5714. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la tolerancia oral de estas bacterias probióticas.

Veinte ratones Balb/C fueron divididos en dos grupos (n=10) a los que se administró por vía oral CECT5711 o CECT5714 en una dosis 500 veces superior a la consumida normalmente por el hombre (10^{10} ufc/ratón/día). Diez ratones recibieron sólo el vehículo y fueron utilizados como controles. Durante los 30 días del estudio se controló semanalmente el peso, la ingesta y el estado general de los animales. También se evaluaron la translocación bacteriana a sangre, hígado y bazo, así como el estado antioxidante de los ratones y diferentes parámetros hematológicos.

Nuestros resultados muestran que la administración oral de bacterias CECT5711 y CECT5714 no tiene efectos adversos en los animales. No se observaron cambios en el peso, ingesta y comportamiento de los animales a lo largo del estudio. En ningún caso se observó bacteriemia en ninguno de los grupos. El tratamiento tampoco produjo traslocación bacteriana ni a hígado ni a bazo. Además el contenido hepático de glutatión así como la concentración plasmática de MDA fueron similares en los animales del grupo control y los tratados con probióticos.

Estos resultados sugieren que las cepas CECT5711 y CECT5714 no son patógenas y su administración a humanos es probablemente segura incluso en dosis 500 veces superiores a las consumidas normalmente por el hombre.

P-57 ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE *Lactobacillus rhamnosus* PRO 344 ADMINISTRADO A RATONES INFECTADOS CON *Salmonella enterica* ser. *typhimurium*

E. Rodríguez, R. Rodríguez y M. Medina*

*Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. de A Coruña Km.7, 28040 Madrid.
minguez@inia.es*

Una de las principales funciones de la microbiota residente en el intestino es la protección frente al establecimiento de microorganismos patógenos. Entre ellos, *Salmonella* es el principal agente de toxiinfecciones alimentarias en nuestro país, presente en prácticamente el 50% de los casos registrados oficialmente.

Lactobacillus rhamnosus PRO 344 es un aislado procedente de heces de un bebé lactante. En ensayos realizados en nuestro laboratorio se comprobó su capacidad para sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal y de adherirse y excluir la adhesión de *S. Typhimurium* CECT 443 a células Caco-2 en determinaciones realizadas *in vitro*.

El objetivo del presente trabajo fue confirmar la capacidad de *L. rhamnosus* PRO 344 para sobrevivir *in vivo* las condiciones del tracto gastrointestinal, la persistencia de esta característica y su participación en la exclusión de *S. Typhimurium* CECT 443 en ratones infectados oralmente.

Para ello, se establecieron cuatro grupos de ratones. El grupo A actuó como control sin probiótico ni patógeno. Los ratones de los grupos B y C recibieron el cultivo probiótico desde el día 1 al día 9 del experimento. Los ratones de los grupos C y D recibieron un cultivo de *S. Typhimurium* el día 7. El día 9 se suspendió la administración del cultivo probiótico y los ratones se mantuvieron hasta el día 16 en que finalizó el experimento. Se determinó la presencia y los niveles de lactobacilos totales y de *L. rhamnosus* PRO 344 en las heces, íleon y colon de los ratones, antes, durante y después de la administración del probiótico. La capacidad de *L. rhamnosus* PRO 344 para excluir a *S. typhimurium* CECT 443 se determinó mediante recuentos del patógeno en medio selectivo en las heces, íleon y colon de los ratones de los grupos C y D.

L. rhamnosus PRO 344 sobrevivió a las condiciones del tracto gastrointestinal *in vivo* y se detectó en heces de ratones durante los 9 días de administración del probiótico y un día después de la suspensión del tratamiento, aunque no 5 días después. También se observó su presencia en el íleon durante los 9 días de la administración y en los 7 días siguientes. Aunque se registró una disminución más acusada de *S. Typhimurium* en el íleon y colon de los ratones infectados que habían consumido *L. rhamnosus* PRO 344 que en los ratones sin probiótico, los resultados necesitan ser confirmados mediante nuevos experimentos *in vivo*.

P-58 LACTOBACILOS VAGINALES: UNA NUEVA FUENTE DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

N. Soberón, R. Martín, C. Monjardín y J. E. Suárez*

*Área de Microbiología. Depto de Biología Funcional. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo.
Oviedo. soberonnora@uniovi.es*

El término probiótico designa a microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud (1). Los aspirantes a esa consideración son principalmente lactobacilos y bifidobacterias intestinales, que son organismos GRAS y se considera que colonizaran eficientemente. Ahora bien, en el ecosistema intestinal los lactobacilos son minoritarios, mientras que en el vaginal son dominantes y ejercen un importante papel protector.

La vagina, por tanto, podría ser una fuente alternativa de lactobacilos probióticos, ya que los que aparecen allí son un reflejo de los que se encuentran en la porción final del tubo digestivo (2). Esto indica que hay colonización cruzada de ambas mucosas y abre el camino a:

- la administración por vía oral de *Lactobacillus* destinados a colonizar la vagina
- la consideración de la vagina como un reservorio de lactobacilos capaces de establecerse en el intestino
- el uso de alimentos como vehículos óptimos para administración de los lactobacilos destinados a colonizar el ambiente vaginal.

En este trabajo se aislaron 51 cepas procedentes de exudados vaginales de mujeres sanas, que se identificaron como *Lactobacillus* por ser bacilos no esporulados, inmóviles, Gram + y catalasa -. Inicialmente, se optimizaron las condiciones de cultivo y las cepas se clasificaron por métodos genotípicos. También se determinaron sus perfiles plasmídicos, susceptibilidad a antibióticos y capacidad inhibitoria, bien por producción de bacteriocinas o bien por liberación de profagos residentes. Finalmente, se investigó si poseían genes de utilización de glucógeno ya que este polisacárido, excretado por las células de la mucosa, es la fuente a partir de la cual se genera el ácido láctico responsable del bajo pH vaginal, que protege a la mucosa de la colonización por microorganismos indeseables.

1.- Sanders, M.E. Probiotics: considerations for humans health. Nutr Rew. 2003 Marzo; 61(3): 91-9

2.- Antonio, M.A., Rabe, L.K. y Hillier S.L. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. J. Infect Dis. 2005 Agosto; 192(3): 394-8

MICROBIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN. DESTRUCCIÓN E INHIBICIÓN MICROBIANAS

P-59 ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA Y ANTIMICROBIANOS PARA CONTROLAR EL CRECIMIENTO DE *Listeria monocytogenes* FRENTE A ABUSOS DE TEMPERATURA DURANTE LA VIDA ÚTIL DEL JAMÓN COCIDO

B. Marcos Muntal, A. Jofré Fradera, T. Aymerich Calve y M. Garriga Turón*

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)-Centro de Tecnología de la Carne. Granja
Camps i Armet s/n, 17121 Monells. *tmp469@irta.es*

La creciente demanda de productos mínimamente procesados y listos para el consumo (RTE-ready-to-eat) plantea un importante reto para la seguridad alimentaria y ha conducido al desarrollo de tratamientos post-procesado suaves, que permitan inhibir el crecimiento microbiano manteniendo la calidad y frescor de los alimentos. En este contexto adquiere una especial importancia el uso combinado de barreras al crecimiento de patógenos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto combinado del tratamiento por alta presión hidrostática (APH) y la adición de enterocina y lactato a jamón cocido, sobre *Listeria monocytogenes* frente al abuso de temperatura durante su vida útil.

Se fabricaron tres lotes de jamón cocido: control, un lote con lactato diacetato, y un tercer lote con enterocina. Las lonchas fueron inoculadas (4-4,5 log ufc/g) con una mezcla de cepas de *L. monocytogenes* y envasadas al vacío. La mitad de las muestras fueron sometidas a un tratamiento APH (400 MPa) y se conservaron a 1°C y a 6°C. Las muestras se sometieron a un abuso de temperatura, simulando una posible rotura de la cadena de frío, a los 40 y 60 días de conservación para 6°C y 1°C, respectivamente.

Cabe destacar el potente efecto del lactato, que permitió controlar la población de *L. monocytogenes* durante todo el período de conservación (3 meses) a 1°C y 6°C, patente incluso después del abuso de temperatura. La combinación de baja temperatura (1°C), tratamiento APH y adición de antimicrobianos permitió reducir, a pesar de la rotura de frío, la población de *L. monocytogenes* en 3,8 y 2,7 log ufc/g en los lotes con enterocina y lactato, respectivamente.

P-60 COMBINACIÓN DE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA A 600 MPA Y ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA INACTIVAR PATÓGENOS ALIMENTARIOS EN JAMÓN COCIDO

A. Jofré Fradera, M. Garriga Turón y T. Aymerich Calvet*

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)-Centro de Tecnología de la Carne. Granja Camps i Armet s/n, 17121 Monells. España. *anna.jofre@irta.es*

En los productos cocidos loncheados, contaminaciones cruzadas producidas durante el post-procesado pueden alterar el producto y comprometer su seguridad alimentaria. La alta presión hidrostática (APH) es una tecnología alternativa o complementaria a la pasteurización por calor que en los últimos años ha adquirido una relevancia especial debido a la inactivación microbiana que produce teniendo una mínima repercusión en el color y flavor de los productos cocidos. Su combinación con los antimicrobianos naturales (bacteriocinas o sales de ácidos orgánicos) puede ser una buena alternativa para reducir los efectos de las contaminaciones cruzadas.

Con el objetivo de estudiar el efecto combinado de un tratamiento de APH de 600 MPa, la nisina y el lactato potásico se fabricó jamón cocido en cuyos ingredientes se incluyeron 800 AU/g de nisina, 1,8% de lactato potásico y una combinación de ambos. El jamón fue loncheado, inoculado con niveles de 1×10^4 ufc/g de *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, envasado al vacío y la mitad de las muestras se trataron a 600 MPa durante 5 min y se almacenaron a 1 y 6 °C.

En muestras no presurizadas, la aplicación combinada de nisina y lactato potásico fue el tratamiento más efectivo frente a *L. monocytogenes*, produciendo una reducción de los recuentos respecto al control de 4 y 6 Log ufc/g en lonchas almacenadas durante 2 meses a 1° y 6°C, respectivamente. El tratamiento de las muestras por APH comportó una disminución de 4 Log ufc/g en los recuentos de *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes*, que se mantuvieron a niveles inferiores a 10 ufc/g durante todo el período de almacenaje. En el caso de *S. aureus*, el tratamiento de APH produjo una disminución inferior a 1 Log ufc/g, consiguiéndose mediante la combinación de APH, nisina y conservación a 6 °C una reducción de 1,6 Log ufc/g a los 2 meses.

P-61 REQUERIMIENTOS BIOSINTÉTICOS PARA LA REPARACIÓN DE LOS DAÑOS SUBLETALES QUE LA APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV) CAUSA SOBRE LA MEMBRANA CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

D. García Gonzalo, M. Somolinos Lobera, S. Condón Usón y R. Pagán Tomás*

Dpto de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. c/ Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, España. dgarcia@unizar.es

La conservación de los alimentos mediante Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) permite la inactivación microbiana a temperaturas subletales, evitando, de este modo, los efectos adversos producidos por el calor.

Los estudios realizados acerca del mecanismo de inactivación de las levaduras no han permitido determinar las causas últimas de la muerte celular. En este sentido, al igual que se demostró en las especies bacterianas, se ha observado daño subletal en *Saccharomyces cerevisiae* tras la aplicación de PEAV. El estudio de los mecanismos implicados en la reparación de los daños subletales sobre las membranas celulares de esta especie contribuiría a determinar qué componentes de dichas membranas se ven afectados, lo que a su vez permitiría conocer con mayor precisión el mecanismo de inactivación de las levaduras. Además, contribuiría a seleccionar aquellas barreras que combinadas con los PEAV inhibieran la reparación de las células dañadas y, por tanto, su supervivencia.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los requerimientos biosintéticos de *S. cerevisiae* para la reparación de los daños subletales que, sobre su membrana celular, causa la aplicación de PEAV en tampón McIlvaine de pH 4,0.

La reparación de estos daños subletales se llevó a cabo incubando los supervivientes a los tratamientos PEAV en caldo Sabouraud, a temperatura ambiente, en ausencia y presencia de cloranfenicol, cerulenina, penicilina G, rifampicina y azida sódica. La presencia de daño subletal y su cuantía se determinó mediante la técnica de siembra de los supervivientes en medio no selectivo (Agar Patata Dextrosa: PDA) y selectivo (PDA con 7 % de NaCl), comparando los recuentos en ambos medios.

Se detectaron dos tipos de daños subletales. Mientras que una pequeña proporción de las células dañadas (menos del 10 %) se repararon en menos de 30 minutos tras los PEAV, la reparación del 90 % restante se prolongó durante 250 minutos. La adición de los inhibidores metabólicos al medio líquido permitió demostrar que la reparación de la mayor parte de las células dañadas únicamente precisaba de la síntesis de ATP.

Al contrario de lo observado en *Escherichia coli*, la reparación de los daños subletales en *S. cerevisiae* no precisa de la síntesis de nuevos lípidos, lo que podría indicar un mecanismo de inactivación por PEF distinto en ambos grupos microbianos.

P-62 EFECTO DEL MEDIO DE SUSPENSIÓN EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO SUBLETAL PROVOCADO POR LA APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV) SOBRE *Saccharomyces cerevisiae*

*M. Somolinos Lobera**, *D. García Gonzalo*, *J. Raso Pueyo* y *R. Pagán Tomás*

Dpto de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. c/Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, España. msomo@unizar.es

Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) son una de las tecnologías no térmicas de conservación de los alimentos más prometedoras, debido a su capacidad para inactivar microorganismos sin modificar las propiedades sensoriales de los alimentos. Estudios previos han demostrado la presencia de daños subletales tras la aplicación de PEAV, tanto en levaduras como en bacterias. Se ha demostrado que el medio de dilución y/o incubación de las bacterias tratadas por PEAV puede ser decisivo en la detección y cuantificación del daño subletal, pero la influencia de este factor en la reparación de los daños subletales en levaduras se desconoce.

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia del medio de suspensión en la detección de células de *Saccharomyces cerevisiae* dañadas tras la aplicación de un tratamiento de PEAV. Para ello, se sometió a *S. cerevisiae* a tratamientos de 50 pulsos a 12 kV/cm en tampón McIlvaine de pHs 7,0 y 4,0; seguidamente se resuspendió en diferentes medios líquidos (Caldo Sabouraud, Agua de Peptona y McIlvaine de pH 7,0 y 4,0) y, a intervalos predeterminados de tiempo, se tomaron muestras para su recuento en placa. El daño subletal se estimó comparando los recuentos obtenidos en placas de PDA con los obtenidos en PDA enriquecido con un 7% de NaCl.

La capacidad de reparación del daño subletal dependió tanto del medio de tratamiento como del medio de suspensión. Así, tras tratar *S. cerevisiae* a pH 7,0, se observó la reparación de todas las células al resuspenderlas en Agua de Peptona y Caldo Sabouraud, pero no en tampones McIlvaine de pH 7,0 o 4,0. La práctica totalidad de las células tratadas a pH 4,0 fueron capaces de repararse en Caldo Sabouraud y en el tampón de ese mismo pH, pero no en Agua de Peptona ni en McIlvaine de pH 7,0.

Podríamos concluir que, de los medios evaluados, el Caldo Sabouraud es el único que permite la reparación de las células de *S. cerevisiae* dañadas por PEAV, tanto si el medio de tratamiento es McIlvaine de pH 7,0 como 4,0. Al igual que en el caso de las células bacterianas, la capacidad de reparación de las levaduras tras un tratamiento PEAV, depende del medio de tratamiento y de recuperación; pero, puesto que estas últimas son capaces de reparar los daños en medios pH 4,0 y las bacterias no, previsiblemente el mecanismo y/o las estructuras responsables de la inactivación de ambos grupos microbianos son diferentes.

P-63 CINÉTICA DE INACTIVACIÓN DE LEVADURAS IMPLICADAS EN LA ALTERACIÓN DEL VINO MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

E. Puértolas Gracia, N. López Giral, J. Raso Pueyo y A. Álvarez Lanzarote*

Facultad de Veterinaria, Departamento PACA-Tecnología de los Alimentos. C/ Miguel Servet, 177, 50013. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España. edupg@unizar.es

Una de las alteraciones más preocupantes en el vino y que ocasiona grandes pérdidas económicas es la generación de olores anormales debido al crecimiento de levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces*. Ninguna de las estrategias utilizadas para eliminar estas levaduras alterantes (SO₂, filtración, tratamientos térmicos, etc.) resulta totalmente efectiva.

La tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) podría ser una alternativa a estos tratamientos ya que permite la destrucción de células vegetativas (levaduras y bacterias) mediante la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad durante periodos de tiempo del orden de microsegundos, sin producir un aumento considerable de la temperatura del producto tratado. La utilización de esta tecnología en la industria alimentaria requiere el estudio de la cinética de inactivación para establecer las condiciones de tratamiento necesarias (intensidad del campo eléctrico y energía aplicada) para conseguir un determinado nivel de inactivación en la población microbiana de interés.

El objetivo de esta investigación fue estudiar la cinética de inactivación por PEAV de levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces* en mosto de uva.

Levaduras de la cepa *Dekkera anomala* (CECT 1008) y *Dekkera bruxelensis* (CECT 11045) fueron tratadas en mosto comercial (EVA, mosto de uva tinta) de pH 3,5 a diferentes intensidades del campo eléctrico (16 - 34 kV/cm), número de pulsos (0 - 100) y energía específica (0 - 360 kJ/kg) a temperatura ambiente.

Para ambos microorganismos, se obtuvieron gráficas de supervivencia cóncavas a todas las intensidades del campo eléctrico investigadas. Estas gráficas se ajustaron a un modelo matemático basado en la distribución de Weibull. Para ambos microorganismos, se obtuvieron relaciones lineales entre los parámetros del modelo (parámetro de escala y de forma) y la intensidad del campo eléctrico aplicado. Estas relaciones permitieron obtener los modelos terciarios correspondientes con los que se establecieron las condiciones de tratamiento necesarias para obtener 1, 2, 3 y 4 ciclos logarítmicos de inactivación de *D. anomala*, que resultó ser la levadura más resistente a los PEAV. Así, tratamientos de 34 kV/cm y 158 kJ/kg (44 pulsos) o 19 kV/cm y 311 kJ/kg (225 pulsos) permitirían reducir en mosto hasta 4 ciclos logarítmicos de cualquiera de las dos poblaciones de levaduras del género *Dekkera*.

Estos resultados indican que los PEAV permitirían eliminar levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces*, previamente a la fermentación del mosto reduciendo el riesgo de posibles alteraciones organolépticas y las consecuentes pérdidas económicas.

P-64 CUANTIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO TÉRMICO DE UNA MERMELADA DE FRESA

A. León Alonso-Cortés^{1*}, J. I. Reguera Useros², S. Peña Burgos¹

¹ Área de Tecnología de los Alimentos, E.T.S.II.AA. de Palencia, Universidad de Valladolid.
aleon@iaf.uva.es

² Área de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos.

En este trabajo se calculan los parámetros cinéticos de termodestrucción de *Byssochlamys fulva*, ascomiceto alterante de conservas de fruta (principalmente de fresa), productor de ascosporas de gran resistencia térmica, que crece a presiones parciales de oxígeno bajas. Con estos parámetros se contribuye a cuantificar la calidad microbiológica de una mermelada de fresa.

Los parámetros cinéticos de termodestrucción se calcularon mediante el sistema de inoculación de esporas en un extracto del producto, tratado a 70, 75 y 80 °C, durante intervalos de tiempo comprendidos entre 2 y 25 min. Se realizaron recuentos en agar OGYE (siembra en masa) después de incubar a 30 °C durante 48 h. Para la elaboración de la mermelada de fresa se aplicó en planta piloto un tratamiento de cocción en un intercambiador tubular continuo, seguido de enfriamiento y posterior tratamiento de pasteurización en envase. La evolución de la temperatura de pasteurización se siguió con una sonda inalámbrica, resistente al agua, colocada en el interior del envase y el tratamiento se cuantificó como unidades de pasteurización (UP).

Se obtuvieron valores de 77,12 min para el tiempo de reducción decimal (D_{60}) y de 10,76 °C para su parámetro Z. El número de UP obtenidas en los tratamientos térmicos aplicados para la elaboración de la mermelada fue de 3.522, equivalente a 45,67 reducciones decimales de la población de *B. fulva*, valor que supera en más del doble las 20 reducciones decimales recomendadas en los tratamientos de pasteurización de conservas vegetales ácidas, con poblaciones de mohos y levaduras como indicadores de termodestrucción.

P-65 CINÉTICA DE DESTRUCCIÓN DE *Listeria* spp. MEDIANTE RADIACIONES β

M. C. Cabeza, L. de la Hoz, I. Cambero y J. A. Ordóñez*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. 28040. Madrid. ccabezab@vet.ucm.es

Se ha estudiado la radiorresistencia de cinco cepas de *Listeria monocytogenes* (Scott A y representantes de los serovares 1/2a, 1/2c, y 1/2b y 4b aislados de carne de pollo por el Dr. J. Martínez, INIA) y una de *Listeria innocua* para estudiar la cinética de destrucción por radiaciones ionizantes de *Listeria* spp. con el fin de optimizar la higienización de alimentos listos para su consumo (RTE) mediante el tratamiento con electrones acelerados.

Las cepas, inoculadas en la superficie de lonchas de jamón cocido, se irradiaron en el acelerador de electrones de la empresa ION-MED (Tarancón). Este equipo opera con una energía de 10 MeV. Las dosis utilizadas estuvieron comprendidas entre 1 y 8 kGy. La dosis absorbida por las muestras se comprobó midiendo la absorbancia de dosímetros de triacetato de celulosa irradiados simultáneamente con las matrices cárnicas.

Las gráficas de supervivencia de las cepas de listeria irradiadas rindieron líneas rectas con coeficientes de correlación (r^2) superiores a - 0,98. Los valores D (tiempos de reducción decimal) de las cinco cepas de *L. monocytogenes* estuvieron comprendidos entre 0,36 y 0,46 kGy y el de *L. innocua* fue de 0,47 kGy. Estos resultados permiten decir que se puede trabajar rutinariamente con esta cepa no patógena y extrapolar los resultados a *L. monocytogenes*, evitando así el riesgo que supone emplear con asiduidad esta especie.

La SCVPH de la EC y la ICMSF estiman un Objetivo de Inocuidad de los Alimentos (OIA) para los productos cárnicos de 10^2 ufc/g. En un dictamen del Comité Científico de la AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria) en 2005, se estima una recontaminación de los productos cárnicos procesados térmicamente de 10 ufc/g durante su transformación en RTE (loncheado y envasado). Del e-ComBase puede deducirse un incremento del número de *L. monocytogenes* de tres unidades logarítmicas a 5 °C, asumiendo una vida útil del producto loncheado de 20 días. En consecuencia, es necesario rebajar la tasa de *Listeria* spp. hasta 10^{-1} ufc/g (objetivo de rendimiento, OR), es decir, el tratamiento por electrones acelerados ha de lograr disminuir la carga en 2D (criterio de rendimiento, CR). Tal reducción se conseguiría con dosis de alrededor de 1kGy. Sin embargo, la FDA ha establecido un OIA de ausencia en 25 g. Un razonamiento similar al anterior permite calcular un OR/resultado de 4×10^{-5} ufc/g y un CR de 5,4D, lo que, en este caso, se conseguiría con un tratamiento inferior a 3 kGy.

En conclusión, la aplicación de radiaciones ionizantes es una estrategia muy útil para higienizar productos RTE.

El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos S-0505/AGR/0314 de la CAM y CPE03-012-C3-2 del INIA.

P-66 EFECTO COMBINADO DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE SAL SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Bacillus cereus* TRAS UN TRATAMIENTO TÉRMICO MODERADO

S. Martínez, I. Franco, A. Pena y J. Carballo*

Área de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas s/n, 32004 Ourense. sidonia@uvigo.es

La capacidad de supervivencia de algunos microorganismos en alimentos mínimamente procesados plantea problemas de seguridad que es necesario combatir utilizando barreras intrínsecas que frecuentemente estos alimentos no poseen. Algunas técnicas de conservación de los alimentos como los tratamientos térmicos y/o la utilización de aditivos químicos permiten reducir el riesgo en estos productos. Sin embargo, estos sistemas pueden tener efectos indeseables y resultar poco atractivos al consumidor que demanda alimentos libres de aditivos y similares a los frescos. Esta demanda se podría satisfacerse utilizando el efecto combinado del pH y el NaCl.

A pesar de la eficacia contrastada de la acidificación en un gran número de productos y el frecuente uso del NaCl en los alimentos, no es bien conocido el margen de pH en el que los diferentes microorganismos pueden recuperarse tras sufrir un tratamiento térmico en medios con diferentes concentraciones de NaCl.

Bacillus cereus es un microorganismo muy ubicuo, detectándose su presencia en gran variedad de alimentos tanto frescos como procesados, no resultando sorprendente encontrar este organismo en el interior o en la superficie de prácticamente todos los productos agrícolas frescos y en muchos productos mínimamente procesados.

Este trabajo se planteó con el fin de conocer el efecto combinado del pH y el NaCl sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de *Bacillus cereus* ATCC 7004 tras un tratamiento térmico moderado.

Los esporos de *B. cereus* ATCC 7004, obtenidos en agar nutritivo suplementado con 1 ppm de Mn^{++} a 35°C, fueron resuspendidos en caldo nutritivo y sometidos a un tratamiento térmico de 90°C durante 10 minutos. Alicuotas de las suspensiones tratadas se inocularon por duplicado en frascos estériles conteniendo 150 mL de caldo nutritivo ajustado con ácido cítrico a diferentes pHs (5, 6, 7 y 7,4) y con 0,5; 1,0; 2,0 ó 3,0% (p/v) de cloruro sódico. Posteriormente, se incubaron a 35°C durante 250 horas, obteniendo alicuotas a intervalos predeterminados de tiempos con el fin de elaborar las curvas de crecimiento. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el "Modelo de Gompertz" y empleando el programa estadístico GraphPad.Prism (GraphPad Software Inc. San Diego).

B. cereus ATCC 7004 fue capaz de sobrevivir y crecer, tras un tratamiento térmico moderado (90°C-10 minutos) en caldo nutritivo con diferentes pHs y concentraciones de sal. Los parámetros cinéticos de crecimiento se vieron condicionados tanto por la acidificación del medio como por la concentración de sal. El aumento de la concentración de sal hasta un 2-3% dio lugar a un incremento del tiempo de recuperación de las células de *Bacillus cereus* tras el tratamiento térmico y su efecto se vio condicionado por el pH, siendo más marcado a valores más ácidos.

P-67 INFLUENCIA DEL CLORURO SÓDICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Bacillus cereus* TRAS UN TRATAMIENTO TÉRMICO MODERADO

S. Martínez, I. Franco y J. Carballo*

Área de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas s/n, 32004 Ourense. sidonia@uwigo.es

Los “alimentos mínimamente procesados” han experimentado una rápida expansión en los últimos años debido a su creciente demanda. El principal objetivo de estos es ofrecer alimentos seguros, con una calidad sensorial óptima.

Aunque la seguridad de los alimentos mínimamente procesados depende fundamentalmente del tratamiento térmico recibido y de la posterior refrigeración, hay otros factores implicados que pueden afectar a la capacidad de recuperación, desarrollo y multiplicación de los microorganismos supervivientes. El cloruro sódico, además de conferir a los alimentos unas características organolépticas determinadas, puede ser utilizado como barrera para frenar el crecimiento microbiano.

Bacillus cereus es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado en alimentos mínimamente procesados. Su elevada resistencia al calor unida a su capacidad para resistir condiciones adversas de almacenamiento, le convierten en un riesgo potencial en estos productos. Sin embargo, y a pesar de su importancia, existen pocos estudios sobre los factores que condicionan su crecimiento tras sobrevivir a un tratamiento térmico.

El objetivo de este estudio fue comprobar el efecto que el cloruro sódico ejerce sobre la capacidad de desarrollo de *B. cereus* en distintos medios, tras un tratamiento térmico moderado.

Los esporos de *B. cereus* ATCC 7004, obtenidos en agar nutritivo suplementado con 1 ppm de Mn⁺⁺ a 35°C, fueron resuspendidos en caldo nutritivo y en diferentes extractos de alimentos (carne de pollo, trucha, arroz y judías) y sometidos a un tratamiento térmico de 90°C durante 10 minutos. Alícuotas de las suspensiones tratadas se inocularon por duplicado en frascos estériles conteniendo 150 mL de cada uno de los extractos suplementados con diferentes concentraciones de sal (0,5; 1,0; 2,5; y 5,0 % (p/v). Posteriormente, se incubaron a 35°C durante 250 horas, obteniendo alícuotas a intervalos predeterminados de tiempos con el fin de elaborar las curvas de crecimiento. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el “Modelo de Gompertz” y empleando el programa estadístico GraphPad.Prism (GraphPad Software Inc. San Diego).

B. cereus ATCC 7004 fue capaz de sobrevivir al tratamiento térmico (90°C-10 minutos) y multiplicarse posteriormente en todos las condiciones en estudio. El aumento de cloruro sódico en el medio hasta concentraciones de 5% no inhibió en ningún caso el crecimiento de *B. cereus*, aunque los parámetros cinéticos si se vieron afectados. La cuantía de este efecto dependió de la naturaleza del medio y de la concentración de NaCl. La naturaleza del medio en el que se desarrollaron los esporos tras el tratamiento ejerció mayor efecto sobre los parámetros de crecimiento que la concentración de sal. El NaCl resultó más efectivo en los extractos vegetales (arroz y judías) que en los extractos de pollo y trucha o en el caldo nutritivo.

P-68 MONITORIZACIÓN TURBIDIMÉTRICA DEL EFECTO DEL ESTRÉS OSMÓTICO SOBRE LA CINÉTICA DE *Staphylococcus aureus* INCUBADA A TEMPERATURA ÓPTIMA EN MEDIO ÁCIDO

A. J. Eduardo*¹, E. J. Quinto² y M. T. Mora²

¹ Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Pública, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Agostinho Neto, Huambo, Angola. agateduardo@yahoo.com.br

² Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.

Las intoxicaciones alimentarias se han incrementado en la década pasada. *Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista que se encuentra en la piel y mucosas de animales de sangre caliente. Las fosas nasales del hombre constituyen su reservorio principal, desde donde se disemina a piel, manos, rostro, etc (Eifert *et al.*, 1996). Así, los alimentos expuestos a la manipulación humana tienen la posibilidad de ser contaminados, contribuyendo para ello el incumplimiento de las normas de conservación y las medidas higiénicas por los manipuladores de alimentos (Anderson and Pascual, 2000).

La turbidimetría permite estudiar el crecimiento bacteriano por mediciones de densidad óptica (Dalgaard *et al.*, 1994; Presser *et al.*, 1998), como método alternativo a los recuentos viables totales que presenta limitaciones, como el tiempo para la revitalización, el enriquecimiento y la incubación de las muestras y las selectivas y bioquímicas complementarias.

El objetivo fue evaluar el efecto de NaCl sobre el microorganismo a temperatura constante en medio ácido, mediante turbidimetría.

A través de la monitorización turbidimétrica, utilizando el método de Begot *et al.* (1996) se calcularon los parámetros cinéticos y se compararon las curvas del incremento de la densidad óptica de *Staphylococcus aureus* sometida a estrés osmótico y ácido, incubada a temperatura de 22°C en caldo infusión de cerebro y corazón durante 24 horas.

El crecimiento fue más rápido al pH más elevado y a menor concentración de sal. La velocidad de crecimiento disminuyó con el incremento de sal. A pH 4,5 no ha sido observado incremento de la densidad óptica lo cual indica que durante el período de estudio no hubo crecimiento microbiano debido al efecto bacteriostático provocado por el sinergismo creado por la acidez y la sal.

Mediante la turbidimetría se pudo verificar que las concentraciones de sal estudiadas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en medio ácido. Al parecer, el pH 4,5 impide el inicio de la fase exponencial, mientras que el pH 5,5 impide que dicha fase termine, durante las 24 horas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, parámetros cinéticos.

P-69 EFECTO CONJUNTO DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE *Escherichia coli* EN PIENSO PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL

*R. Amado Sabela, P. Fajardo, C. Fuciños, E. Alonso, P. Fuciños, N. Pérez, L. Pastrana**

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas s/n, 32004 Ourense. pastrana@uvigo.es

Los problemas relacionados con la seguridad y trazabilidad de piensos para alimentación animal han pasado a considerarse de interés prioritario debido a las graves consecuencias de las infecciones alimentarias causadas por patógenos en la salud pública (GORRACHATEGUI, 1998).

Los sistemas de descontaminación habitualmente empleados en la fabricación de piensos consisten en la utilización de tratamientos químicos y/o térmicos, siendo la tendencia la aplicación de tratamientos térmicos durante tiempos cortos pero a elevadas temperaturas (en expandir superiores a 100°C) (COMA, 2001). Sin embargo, es posible lograr reducciones efectivas a menor temperatura si el tratamiento térmico se realiza en presencia de acidificantes, con la ventaja de minimizar los problemas nutricionales asociados al empleo de altas temperaturas.

Hasta el momento no se ha estudiado el efecto conjunto de acidificantes y temperatura sobre la supervivencia de patógenos en piensos. En este trabajo se aborda este estudio sobre cepas de *Salmonella* aisladas, en nuestro laboratorio, de materias primas empleadas en la fabricación de piensos, utilizando como acidificantes ácidos fórmico y acético. Para ello se realizaron diseños experimentales de tipo factorial con el fin de obtener modelos empíricos que definieran el comportamiento de los sistemas y construir las correspondientes superficies de respuesta con las que obtener las condiciones óptimas de temperatura y concentración de acidificante que proporcionen una reducción significativa de la población bacteriana.

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas estudiadas mostraron una gran heterogeneidad pudiendo agruparse de acuerdo a tres comportamientos diferenciados en función de la respuesta frente a la temperatura y la concentración de acidificante:

Comportamiento 1: se caracteriza porque incluye términos cuadráticos para ambas variables, si bien, el efecto que ejercen sobre la inhibición es diferente, así el coeficiente correspondiente a la temperatura es positivo y negativo para la concentración de acidificante.

Comportamiento 2: incluye también términos cuadráticos para ambas variables, sin embargo, ambos coeficientes resultaron positivos, lo que se traduce en un aumento exponencial de la inactivación al aumentar la temperatura y concentración de acidificante.

Comportamiento 3: incluye solamente un término cuadrático para la variable temperatura.

A pesar de esta heterogeneidad se encontraron elementos comunes a todas las cepas:

- 1.- La temperatura resultó ser la variable más importante.
- 2.- Contrariamente a lo esperado, solamente algunas cepas mostraron término de interacción entre variables, y, con un coeficiente bajo.
- 3.- El efecto del acidificante fue prácticamente nulo en muchos de los casos. Este hecho podría deberse al corto tiempo de tratamiento ensayado.

P-70 EFECTO DE LA CARBENDAZIMA EN LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A POR *A. carbonarius*

A. Medina^{a*}, F. M. Valle-Algarra^b, F. Mateo^c, E. Mateo^a, R. Mateo^b y M. Jiménez^a

^a*Dpto. de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100, Burjassot, Valencia. Angel.Medina@uv.es

^bDpto. de Química Analítica, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100, Burjassot, Valencia..

^cDpto. de Ingeniería Electrónica, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, 14. E-46022, Valencia.

Las pérdidas económicas debidas a enfermedades de las plantas producidas por hongos fitopatógenos en ocasiones consisten en la pérdida de la cosecha pero lo más frecuente es que estén relacionadas con reducciones de la misma. Estos vegetales afectados por hongos en mayor o menor grado pueden contener micotoxinas. Es una tarea de vital importancia tanto desde un punto de vista económico como en cuanto a seguridad alimentaria el controlar el crecimiento de estos hongos y como consecuencia de ello el producir alimentos seguros libres de micotoxinas.

En los últimos años la ocratoxina A ha despertado gran interés por su frecuencia en alimentos habituales en la dieta humana y animal ya que se trata de un metabolito fúngico que presenta efectos nefrotóxicos y carcinogénicos entre otros. Se produce en determinadas condiciones por diferentes especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La carbendazima (metil benzimidazol-2-il carbamato) es un fungicida sistémico con actividad preventiva y curativa perteneciente a la familia de los benzimidazoles. Es utilizada en tratamientos para el control fúngico en cereales, frutas, hortalizas y plantas ornamentales. Actúa interfiriendo la biosíntesis de ADN, aunque no inhibe el desarrollo de las esporas detiene el desarrollo del tubo germinativo provocando irregularidades en la división celular dando lugar a células anormales y finalmente a la muerte del hongo. En el caso de la vid su uso está recomendado para el tratamiento de la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) y el oídio (*Uncinula necator*).

La producción de ocratoxina A se ve afectada por un amplio número de factores, entre ellos ocupa un lugar muy destacado el uso de fungicidas. Por ello, en este trabajo se estudió a lo largo del tiempo el efecto de diferentes concentraciones de carbendazima sobre el crecimiento de *A. carbonarius* y la producción de ocratoxina A. Este estudio se llevó a cabo a diferentes temperaturas y actividades de agua, lo que permitió el análisis multifactorial de los datos.

Los resultados obtenidos indicaron que de forma general la presencia de fungicida en el rango de concentraciones empleadas produjo un aumento en la cantidad de toxina producida independientemente de la temperatura. El aumento de la cantidad de fungicida produjo un retardo en el tiempo en que el hongo empezó a desarrollarse siendo este tiempo mucho más largo al disminuir los valores de la actividad acuosa y la temperatura. En algunos casos la presencia de bajas concentraciones de fungicida resultaron en un ligero aumento de la velocidad de crecimiento.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la carbendazima, en las condiciones en que se desarrolló esta experiencia, no resultó ser un fungicida de elección en el control del crecimiento de *A. carbonarius* ni en la producción de OTA, e incluso podría ser negativo su empleo.

Agradecimientos: Los autores agradecen la financiación al Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL-2004-07549-C05-02 y una beca de investigación) y al gobierno valenciano "Conselleria de Empresa, Universitat i Ciència" por la financiación de una beca de investigación.

P-71 INFLUENCIA DE FACTORES QUE CONDICIONAN LA ACTIVIDAD DE UNA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA DE *Penicillium olsonii* DE POSIBLE USO EN ALIMENTOS

A. Rodríguez*, R. Acosta, F. Núñez y M. A. Asensio

Higiene de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad s/n, Campus Universitario, 10071.Cáceres. andreama@unex.es

Entre la población fúngica que se desarrolla en la superficie de algunos productos cárnicos y lácteos madurados es común la existencia de mohos toxigénicos. Para controlarlos pueden utilizarse como cultivos protectores mohos productores de proteínas antifúngicas. A partir de una cepa de *Penicillium olsonii* aislada de jamones madurados se ha purificado una proteína con potente actividad antifúngica frente a mohos toxigénicos tales como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium commune*, *Penicillium restrictum* y *Penicillium griseofulvum*. El uso de esta proteína en alimentos requiere un profundo estudio de la influencia en su actividad de factores que afectan a la permeabilidad de la membrana de los mohos. Se evaluó el efecto de fosfato monosódico (0,1- 100 mM), detergentes como tritón X100, polisorbatos (tween 20 y tween 80), dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido deoxicólico (todos ellos al 1%), y quelantes de calcio como EDTA y EGTA (0,01-1 mM) en la actividad de la proteína para inhibir el desarrollo de *P. restrictum*, *P. griseofulvum* y *A. niger* en placas multipocillo. Tritón X100, tween 20 y tween 80 retrasaron el crecimiento de los mohos, sumándose este efecto a la propia actividad antifúngica de la proteína en los dos últimos. El SDS inhibió totalmente el desarrollo de los mohos de referencia, lo que impidió apreciar cualquier efecto sobre la actividad de la proteína. El EDTA a alta concentración también inhibió el crecimiento de los *Penicillium*, pero no afectó a *Aspergillus* incrementando notablemente la actividad de la proteína. El ácido deoxicólico inhibió a *A. niger*, pero potenció el desarrollo de los *Penicillium* neutralizando cualquier efecto de la proteína. El empleo del péptido como aditivo podría ser de gran interés para el control de mohos toxigénicos en alimentos, especialmente los que puedan contener cualquiera de los detergentes no iónicos como tween 20 o tween 80.

Agradecimientos: Este trabajo se ha sido financiado por el proyecto AGL2004-06546-ALI del Ministerio de Ciencia y Tecnología y el FEDER. Andrea Rodríguez es beneficiaria de una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

P-72 CONSERVACION DE CONCHAS DE ABANICO (*Argopecten purpuratus*) UTILIZANDO ACIDO LACTICO Y YOGURT NATURAL

J. C. Ramos Gorbeña y T. Agurto Sáenz*

Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma, Avenida Benavides 5440, Código postal 033, Lima – Perú. juanramosgo@yahoo.es

El trabajo de investigación efectuado estudia la acción antimicrobiana ejercida por el ácido láctico utilizado a diferentes rangos de concentraciones, que comprenden del 0,2% hasta el 2% de ácido láctico comercial de uso alimentario y el empleo de yogur natural con 0,78% de ácido láctico, enfrentadas a los diversos microorganismos presentes en las “conchas” de abanico desvalvadas adquiridas en el Terminal de Pesquero de Villa María del Triunfo (Lima –Perú-).

Las Técnicas microbiológicas empleadas fueron la de Recuento en Placa por el Método de Incorporación y Diseminación y el Método de Determinación Presencia y Ausencia para los microorganismos de importancia sanitaria (*E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*) presentes en las muestras de las “conchas” de abanico (*Argopecten purpuratus*) aplicando ácido láctico y yogurt natural.

La concentración óptima de ácido láctico empleada durante el procesamiento de las muestras de “conchas” de abanico fue del 0,8% de ácido láctico, el cual inhibía el crecimiento bacteriano sin alterar sus características organolépticas, comprobado durante los recuentos bacterianos en placas.

La acción ejercida del yogurt natural 0,78% de ácido láctico sobre las muestras procesadas de las “conchas” de abanico causó una inhibición parcial en las placas sembradas con los medios de cultivos específicos para las enterobacterias (Agar Mac Conkey Merck), vibrios (Agar TCBS Merck) y salmonelas (Agar SS Merck), pero resultado positivo para las bacterias mesófilos aerobios reduciendo su número. A concentraciones mayores de 0,8% de ácido láctico comercial las “conchas” de abanico (gónadas y músculo aductor) variaban sus características organolépticas desarrollando deshidratación o resequedad además de pérdida del color, todo lo contrario ocurrió con la aplicación del yogurt natural, donde las características organolépticas no se alteraban pero era positiva la presencia de microorganismos.

Efectivamente, al ser de la concha de abanico un producto marino perecedero o/y delicado y de fácil contaminación, se hace necesario de un medio natural que proteja su contaminación y genere una mayor estabilidad y/o durabilidad del producto post-cosecha y se obtenga un producto de calidad necesaria para su comercialización, resultado que se obtiene con la aplicación del ácido láctico como producto orgánico derivado de las bacterias lácticas.

Palabras claves: Bacterias ácido lácticas; Biopreservación; Bacteriocinas; Yogurt natural; Ácido láctico.

P-73 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL

J. J. Gallardo Chacón*¹, M. Caselles Criballés¹, M. Izquierdo Pulido² y N. Rius Bofill¹

¹ Unitat de Microbiologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

² Departament de Nutrició i Bromatologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

La miel es un producto biológico muy complejo cuya composición química depende de la flora de origen, la zona y el clima. Es una solución supersaturada de azúcares, que contiene, además, otros carbohidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, vitaminas, sustancias aromáticas, pigmentos y ceras. La miel es un producto natural utilizado por sus características nutritivas y propiedades antimicrobianas desde la antigüedad.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antimicrobiana de 31 muestras de miel sobre las cepas siguientes: *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ser. *typhimurium* ATCC 14028, *Shigella sonnei* ATCC 15931, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* CECT 4513 resistente a la meticilina, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Enterococcus faecalis* ATCC 27285.

La actividad antibacteriana de la miel puede ser debida a la elevada concentración de azúcares, a la formación de peróxido de hidrógeno, a la presencia de compuestos antimicrobianos proteicos o al efecto de compuestos indeterminados. Se ha utilizado como control una miel artificial (40% de fructosa, 30% de glucosa, 8% de maltosa y 2% de sacarosa) que permite estudiar si la actividad inhibitoria es debida a la elevada presión osmótica de las muestras de miel. Para determinar si la inhibición del crecimiento bacteriano es debida al peróxido de hidrogeno o a alguna sustancia proteica, se tratan las muestras de miel con catalasa, proteinasa K y α -quimiotripsina. Para este estudio se han utilizado dos bacterias Gram negativas, *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*, y tres Gram positivas, *S. aureus* CECT4513, *S. mutans* y *E. faecalis*.

Todas las bacterias Gram negativas, excepto *P. aeruginosa*, son sensibles a todas las muestras de miel analizadas y al control a una concentración del 25%, debido a la elevada concentración de azúcares, siendo *Shigella sonnei* la más sensible. Las bacterias Gram positivas presentan diferente sensibilidad a las muestras de miel dependiendo del tipo y concentración de miel y de la cepa bacteriana. *B. cereus* y *S. mutans* son las bacterias más resistentes y *E. faecalis* la más sensible. La generación de peróxido de hidrógeno es responsable de la actividad antibacteriana sobre *S. aureus* CECT4513 y *S. mutans*. Esta inhibición es revertida en presencia de catalasa. La inhibición del crecimiento de *S. aureus* puede ser debida, además, a la composición proteica de una de las muestras de miel analizadas. *E. faecalis* es sensible a todas las muestras de miel debido a su elevada presión osmótica.

P-74 BACTERIAS LÁCTICAS COMO AGENTES DE BIOPROTECCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS

R. Trias*¹, L. Bañeras², E. Badosa¹ y E. Montesinos¹

¹Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA, CIDSAV, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071, Girona.

²Instituto de Ecología Acuática, Universidad de Girona, Campus Montilivi, 17071, Girona.
rosalia.trias@udg.es

En los últimos años se ha detectado a nivel mundial un incremento de la incidencia de toxiinfecciones alimentarias debidas al consumo de productos vegetales frescos que puedan estar contaminados por bacterias patógenas. Estas toxiinfecciones causadas principalmente por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* pueden ser consecuencia de contaminaciones debidas a ciertas prácticas agrícolas, así como a una manipulación o procesado inadecuado de las frutas y hortalizas frescas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son, potencialmente, buenos agentes de bioprotección para su uso en alimentos, ya que presentan diversos mecanismos para inhibir una gran variedad de microorganismos patógenos o deteriorantes y son consideradas como GRAS (Generally Recognised as Safe). El objetivo de este trabajo es la evaluación de BAL como posibles agentes de bioprotección de frutas y hortalizas frescas, frente a *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* CECT 515NT y *Listeria monocytogenes* CECT 4031.

Se realizó una selección de 5 BAL a partir de una colección de 496 aislados de productos vegetales en base a su capacidad antagonista in vitro. Las cepas seleccionadas se identificaron como especies de los géneros *Leuconostoc* (3 aislados), *Weissella* (1 aislado) y *Lactococcus* (1 aislado). En tres de estas cepas se detectó in vitro la producción de bacteriocinas activas contra *Listeria monocytogenes*. Los ensayos de bioactividad se realizaron en manzanas de la variedad Golden y lechuga Iceberg mediante la coaplicación de las BAL y los microorganismos patógenos. Los recuentos de viables se realizaron en el momento inicial del ensayo y a las 48 horas. *Listeria monocytogenes* fue el patógeno más inhibido; en los tratamientos con 2 de las cepas productoras de bacteriocinas, se reducía su población por debajo de los límites de detección. Tras el tratamiento con BAL, el crecimiento de *Salmonella* se reducía, llegando a una población de viables final de entre 1 y 2 unidades logarítmicas menor en relación al control. En el caso de *E.coli* ninguna de las cepas redujo el crecimiento del patógeno. Actualmente se están realizando ensayos dosis-respuesta que permitirán optimizar la bioprotección de los productos, determinando la dosis mínima necesaria.

P-75 INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS DE OZONIZACIÓN Y ATMOSFERAS MODIFICADAS SOBRE LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE LOMO DE CERDO PIETRAIN

*M. J. Cantalejo**

**Área de Tecnología de Alimentos, Dpto. de Química Aplicada. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona-Navarra.
iosune.cantalejo@unavarra.es*

El uso tanto de ozono gaseoso como de atmósferas modificadas con alto contenido de dióxido de carbono es efectivo para alargar la vida útil de productos frescos como pescados y carnes. Para la carne de cerdo existen estudios que han mostrado que es posible alargar la vida útil, pero no se ha determinado aún cuál es la concentración óptima de ozono gaseoso en combinación con atmósferas modificadas. Por ello, en este trabajo se planteó realizar diferentes combinaciones y estudiar su efecto sobre las características organolépticas de lomo de cerdo Pietrain, observando si los efectos que producía la combinación eran sinérgicos o antagónicos respecto a los tratamientos por separado cuyas condiciones de aplicación ya habíamos optimizado previamente.

Observamos que con el tratamiento de ozonización a 0.72 p.p.m. durante cinco minutos en atmósfera modificada con 100% CO₂, se redujo el número tanto de aerobios mesófilos como de lactobacilos en dos unidades logarítmicas al cabo de 8 días. También se observó en ese tiempo que los valores de pH de las muestras tratadas fueron menores que los de las muestras frescas.

Asimismo, en el caso de color, la evolución de la luminosidad fue descendente en los dos tipos de muestras, pero dichos valores fueron más elevados para las muestras tratadas que para las frescas. En el caso de la componente "b", ambas muestras siguieron evoluciones opuestas, ascendente en el caso de las muestras tratadas y descendente en las frescas.

En cuanto a la degradación de grasas, no se observaron diferencias significativas entre las muestras tratadas respecto a las sin tratar, siendo los valores obtenidos muy bajos en ambos casos.

Respecto a los atributos del perfil de textura, las muestras frescas resultaron más tiernas en todos los casos que las tratadas.

Reduciendo la dosis de ozono gaseoso y manteniendo las mismas condiciones descritas anteriormente se observó que, con dicho tratamiento combinado, los niveles de coliformes totales, *E. coli*, *Clostridium*, mohos y levaduras permanecían prácticamente constantes a lo largo del tiempo. No obstante, en el caso de lactobacilos y microorganismos psicrótrofos, se produjo un aumento de dos unidades logarítmicas en ambos casos entre los días 9 y 14. Por otra parte, las muestras tratadas fueron mejor evaluadas sensorialmente que las frescas alcanzando una vida útil de 14 días respecto a las frescas que, en el día 7, ya no eran aceptables ni desde el punto de vista microbiológico ni sensorialmente.

P-76 INFLUENCIA DE LA ATMÓSFERA DE ENVASADO EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CARNE DE AVESTRUZ

R. Capita, T. Álvarez-González, M. Prieto y C. Alonso-Calleja*

Área de Nutrición y Bromatología, Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León-Campus de Ponferrada. Avenida de Astorga, s/n, 24400 Ponferrada, León. dhtcac@unileon.es

Como consecuencia principalmente de las recientes crisis alimentarias que han afectado a las carnes tradicionales, se ha producido en los últimos años en los países desarrollados un considerable incremento en el consumo de carnes alternativas que anteriormente habían registrado un interés marginal, como es el caso del avestruz. La carne de avestruz presenta buenas propiedades nutritivas, siendo un alimento interesante para grupos de población con alimentos restringidos por razones religiosas o sanitarias. No obstante, la escasa vida útil de este alimento limita sustancialmente su comercialización (Alonso-Calleja et al., 2004). El objetivo de este trabajo ha sido determinar la combinación de gases de envasado más adecuada para reducir la carga microbiana de la carne de avestruz durante el almacenamiento, y contribuir así a prolongar su vida útil.

Se estudiaron los niveles de microorganismos (flora aerobia viable –FAV-, enterococos, micrococáceas, mohos y levaduras, pseudomonas fluorescentes y *Brochothrix thermosphacta*) en filetes de carne de avestruz (*Iliofibularis*) envasados en atmósferas de diferente composición de gases: A (70% O₂ / 30% CO₂), B (30% O₂ / 30% N₂ / 40% CO₂), C (20% O₂ / 30% N₂ / 50% CO₂), D (50% N₂ / 50% CO₂), E (20% N₂ / 80% CO₂), F (100% CO₂), vacío y aire. Las determinaciones microbiológicas se realizaron los días 0, 1, 3, 7 y 15 de almacenamiento (3±1° C).

El grupo microbiano, el día de almacenamiento y la atmósfera de envasado influyeron ($P < 0,001$) en los resultados obtenidos. Los niveles microbianos del día 0 (log₁₀ ufc/g) fueron 3,21±0,63 (FAV), 0,00±0,00 (enterococos), 0,40±0,84 (micrococáceas), 0,40±0,84 (mohos y levaduras), 1,45±3,06 (pseudomonas fluorescentes), y 0,00±0,00 (*Brochothrix thermosphacta*). Los niveles inferiores al límite de detección se equipararon a 0 para realizar el análisis estadístico de los datos. El día 15 de almacenamiento presentó niveles de FAV comprendidos entre 7,62±0,42 (atmósfera F) y 9,96±0,20 (aire). Tanto las atmósferas modificadas como el envasado a vacío fueron eficaces, respecto al envasado en aire, para reducir la carga microbiana de la carne de avestruz a lo largo del almacenamiento. El mayor efecto inhibitor del crecimiento microbiano se observó en las atmósferas que contenían niveles de CO₂ del 50% o superiores, siendo especialmente efectiva la atmósfera con 100% de CO₂.

Alonso-Calleja, C., Martínez-Fernández, B., Prieto, M. y Capita, R. (2004). Microbiological quality of vacuum-packed ostrich meat in Spain. *Food Microbiology* **21**, 241-246.

Este estudio ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (INIA, CAL 00-30).

P-77 EFECTO DEL FOSFATO TRISÓDICO Y EL CLORITO SÓDICO ACIDIFICADO EN LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Pseudomonas fluorescens* Y *Brochothrix thermosphacta*

*E. del Río, B. de Caso, M. Prieto, C. Alonso-Calleja y R. Capita**

Área de Nutrición y Bromatología, Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León-Campus de Ponferrada. Avenida de Astorga, s/n, 24400 Ponferrada, León. dhtrcg@unileon.es

El Reglamento (EC) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y el Consejo, de aplicación a partir de enero de 2006, proporciona una base legal para el uso de tratamientos antimicrobianos en carne de ave. El fosfato trisódico y el clorito sódico acidificado han sido propuestos por la Comisión con esta finalidad. El objetivo del presente estudio ha sido conocer el efecto de ambos compuestos en los parámetros de crecimiento de algunos microorganismos alterantes de la carne de ave.

Las cepas *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 y *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509 fueron inoculadas (aproximadamente $5 \log_{10}$ ufc/mL) en matraces con caldo triptona de soja (TSB) y 0,6% de extracto de levadura (pH 6.2). En algunos matraces el TSB se adicionó con fosfato trisódico al 1,74% (TSB-FTS), o con clorito sódico acidificado a 210 ppm (TSB-CSA). La incubación se realizó a 28° C durante 48 horas en un incubador orbital (Minitron, Biogen Científica S.L., Barcelona), realizándose recuentos del número de bacterias cada 2 horas. El cálculo de la fase de latencia (horas), el ritmo de crecimiento (incremento de concentración /hora) y concentración máxima de bacterias en la fase estacionaria (\log_{10} ufc/mL) se realizó usando la ecuación de Gompertz modificada (Garthright, 1991). La comparación de datos se llevó a cabo con un análisis de varianza.

Ambos compuestos prolongaron significativamente la fase de latencia de *Pseudomonas* ($1,236 \pm 0,489$ en TSB, $5,470 \pm 1,664$ en TSB- FTS y $15,061 \pm 5,575$ en TSB- CSA). En el caso de *Brochothrix* la duración de la fase de latencia en TSB-CSA ($10,358 \pm 3,323$) fue superior a la observada en TSB ($4,481 \pm 1,054$) y en TSB-FTS ($3,971 \pm 1,117$). El ritmo de crecimiento de *Pseudomonas* ($0,386 \pm 0,032$ en TSB) disminuyó en presencia de FTS ($0,261 \pm 0,070$) y de CSA ($0,101 \pm 0,033$). Sin embargo, el ritmo de crecimiento de *Brochothrix* fue similar en los tres grupos de muestras: $0,402 \pm 0,045$ (TSB), $0,419 \pm 0,126$ (TSB-FTS) y $0,529 \pm 0,197$ (TSB-CSA). El CSA hizo disminuir la concentración de *Pseudomonas* en la fase estacionaria ($8,285 \pm 0,773$) respecto al medio sin compuesto ($9,232 \pm 0,116$) o con FTS ($9,393 \pm 0,145$). En el caso de *Brochothrix* se observaron mayores concentraciones bacterianas en TSB-FTS ($8,998 \pm 0,274$) que en TSB ($8,619 \pm 0,096$) y en TSB-CSA ($8,473 \pm 0,052$). Nuestros resultados muestran la mayor sensibilidad de *Pseudomonas* frente a los compuestos estudiados, observándose una gran resistencia de *Brochothrix* frente al FTS.

Garthright, W. E. (1991). Refinement in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiology* **8**, 239-248.

Este estudio ha sido subvencionado por el Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS PI 040722).

P-78 DESARROLLO DE PROTECCIÓN CRUZADA FRENTE AL CALOR TRAS LA HABITUACIÓN ÁCIDA EN *Salmonella senftenberg*

A. Álvarez, A. Fernández, A. Bernardo* y M. López

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, Campus Vegazana s/n.
24071 León. dhtaba@unileon.es

Salmonella senftenberg posee un marcado interés tecnológico por su elevada resistencia térmica intrínseca en relación con el resto de serovariedades del género *Salmonella*, lo que la convierte en un buen modelo biológico.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del pH del medio de crecimiento (BHI tamponado con Sorensen 0,2 M, BHI y BHI acidificado con HCl hasta pHs 6,0; 5,0 y 4,5) sobre la termorresistencia de *Salmonella senftenberg* (CECT 4384), en suspensiones bacterianas recién obtenidas y en cultivos almacenados a refrigeración durante 7 días. Las suspensiones microbianas obtenidas en caldo BHI en las diferentes condiciones fueron incubadas a 37°C el tiempo necesario para alcanzar un estado avanzado de la fase estacionaria. Las determinaciones de termorresistencia se realizaron en un termorresistómetro TR-SC a 63°C utilizando como medio de calentamiento caldo BHI.

Para la interpretación de los resultados obtenidos se empleó el modelo matemático de Weibull, por ser el que mejor ajustaba las curvas de inactivación obtenidas.

En las suspensiones celulares recién obtenidas los valores n estimados (parámetro de forma) nos permitieron clasificar los resultados en dos grupos: células crecidas en BHI y BHI tamponado, con un n medio de 0,79 (cuyas gráficas de supervivencia se aproximaron a una cinética de primer orden) y suspensiones bacterianas acidificadas, con un n medio de 0,26 (cuyas gráficas de supervivencia fueron cóncavas). El valor b estimado (parámetro de escala) para las células crecidas en BHI pH 4,5 fue 6 veces mayor que el obtenido para las suspensiones acidificadas a pHs 6,0 y 5,0.

A partir de los valores b y del tiempo requerido para la disminución del recuento de viables en tres ciclos logarítmicos se dedujo la existencia de un fenómeno de adaptación ácida dependiente del pH extracelular en las suspensiones acidificadas que originó una protección cruzada frente al calor, que incrementaba con la acidez.

En las suspensiones refrigeradas no se observó el fenómeno de protección cruzada, siendo el tiempo requerido para reducir 3 ciclos logarítmicos a pH 5,0 y 4,5 la mitad que el necesario para las células control y tamponadas. Finalmente, las células crecidas en medio control y tamponado no vieron modificada su termorresistencia por la refrigeración previa al tratamiento térmico, mientras que en las suspensiones celulares acidificadas la refrigeración provocó una clara disminución de la resistencia térmica, dependiente del pH (el descenso más marcado lo presentaron las células crecidas en BHI a un pH de 4,5).

P-79 SUPERVIVENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN CARNE DE CERDO PICADA TRATADA CON BIOCONSERVADORES

M. C. López Mendoza*¹, P. Ruiz García¹ y C. M. Mata Anguiano¹

*¹Departamento de Producción Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Cardenal Herrera-CEU. Edificio Seminario s/n. 46113 Moncada (Valencia), España. clopez@uch.ceu.es

Listeria monocytogenes se ha detectado en numerosas ocasiones en carne y productos cárnicos, los cuales pueden servir de vehículo para la diseminación del microorganismo (Schillinger *y col.*, 1991). Su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración le permite desarrollarse rápidamente en el alimento alcanzando dosis infectivas durante el almacenamiento en refrigeración (Ray, 2001). Por ello, es importante desarrollar nuevos procedimientos que permitan destruir o limitar el crecimiento de este microorganismo en la carne cruda. Actualmente las técnicas de actuación contra *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos consisten en la adición de bacteriocinas y ácidos orgánicos.

El objetivo de este trabajo fue investigar la actividad antilisteriana de la nisina y el ácido láctico, añadidos individualmente o en combinación, en carne de cerdo picada y refrigerada a 4° C.

La carne de cerdo picada se inoculó con una cepa de *Listeria monocytogenes* y se distribuyó en seis lotes. A cada lote se añadió una combinación diferente de nisina (N) y/o ácido láctico (AL) (300 ppm N; 500 ppm N; 2% AL; 300 ppm N and 2% AL; 500 ppm N and 2% AL). Todas las muestras se almacenaron a 4° C durante 7 días. La inactivación de *L. monocytogenes* se consiguió en mayor medida con la combinación de 500 ppm N + AL.

P-80 COMPARACIÓN DEL GRADO DE DESINFECCIÓN DE PRODUCTOS DE LAVADO USADOS EN LA FABRICACIÓN DE TAPONES DE CORCHO NATURAL

M. Moliner Recuero¹, P. Jove Martín^{1}, R. Juanola Cadena¹, M. Rodríguez González², M. A. Calvo² y R. de la Vega³*

¹*Cork Center Laboratory, Instituto Catalán del Corcho. Miquel Vincke i Meyer, 13, 17200 Palafrugell. mmoliner@icsuro.com*

²*Dpto. Sanidad y Anatomía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona. Edificio V Campus UAB. 08193 Bellaterra. mariangels.Calvo@uab.es*

³*INIA-CIFOR, Apdo. Correos 8111, 28080 Madrid, adrados@inia.es*

En el proceso de fabricación de los tapones de corcho natural se realiza una operación de lavado de los tapones que consiste en sumergir o pulverizar los tapones con productos desinfectantes. El principal objetivo de esta operación es la disminución del número de microorganismos presente en el corcho, si bien en algunos casos se produce también una decoloración del tapón.

Este trabajo pretende comparar el grado de reducción del número de hongos filamentosos y levaduras producido por distintos productos de lavado usados habitualmente en la industria del corcho: peróxido de hidrogeno, ácido peracético, activador orgánico y ácido sulfámico.

La determinación del grado de desinfección de cada uno de los productos de lavado se realiza mediante dos tipos de ensayos: análisis microbiológicos de tapones de corcho no lavados (control) y lavados con los distintos productos y ensayos de inhibición directa de los productos de lavado sobre el crecimiento de dos especies de hongos filamentosos.

Los análisis microbiológicos de los tapones se realizan mediante la metodología indicada en la norma UNE 56921 y se analizan dos tipos de tapones: tapones lavados a escala de laboratorio y tapones lavados a escala industrial, con el objeto de contrastar los resultados obtenidos.

La evaluación del grado de actividad antifúngica de los productos de lavado por inhibición directa se ha realizado mediante la técnica estándar de difusión en disco de Andrews.

El lavado con todos los tipos de productos ensayados en este estudio ha tenido un efecto desinfectante de los tapones de corcho.

Según la tipología de productos de lavado, se ha observado que, tanto en las muestras de tapones de corcho natural lavadas a escala industrial como en las pruebas de inhibición directa del crecimiento de hongos filamentosos específicos de corcho, los lavados con peróxido de hidrógeno, ácido peracético y el activador orgánico son los que han reducido en mayor grado el crecimiento de los hongos filamentosos y levaduras. El lavado con ácido sulfámico se ha observado como el lavado que reduce en menor grado el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras, tanto al analizar los tapones como al realizar los ensayos de inhibición directa.

P-81 IMPLANTACIÓN DE UN SISTEMA DE CALIDAD PARA EL CONTROL DE TEMPERATURAS EN ESTUFAS DE CULTIVO

A. M. Sánchez Cánovas, M. A. Castaño Garrido, G. Martínez Reina, M. D. Vilella Martínez, M. J. Barnés Campos y A. Ruíz Hernández*

**Laboratorio de Microbiología. Consejería de Sanidad de Murcia. Ronda de Levante, 11 C.P. 30008 Murcia. Ana.Sanchez@carm.es*

Para la implantación del Sistema de Calidad en el Laboratorio de Microbiología, uno de los puntos importantes era el control de temperaturas en las diferentes estufas de cultivo. Estuvimos estudiando varios sistemas: manuales, semiautomáticos y automáticos.

Vimos que era necesario escoger un equipo adaptado a las necesidades teniendo en cuenta las obligaciones en materia de trazabilidad.

Los termómetros de máxima y mínima indican únicamente la desviación de la temperatura, pero no la duración del defecto. Buscábamos algún sistema, con el cual esto se subsanara y optamos por la puesta a punto del Sistema Labguard (Temperanet); este sistema controla la temperatura con la ayuda de registradores automáticos en tiempo real y puede prevenir un problema mediante alarmas sonoras, telefónicas, etc.

Una calibración de calidad se hace gracias a una sonda calibrada que garantiza la precisión de los resultados. Ésta es de fácil instalación, sin cableado entre emisores y receptores. Es modular. Las informaciones numeradas se transmiten a través de la red eléctrica hasta un PC.

El sistema a priori parecía sencillo. Pero todo tiene un periodo de implantación y adaptabilidad.

En el Laboratorio contamos con siete estufas a diferentes temperaturas; los límites que tenemos establecidos son +/- 1° C, excepto para la estufa de 44°C que es +/- 0,5 °C , por lo cual no pueden salirse de los límites.

Cada estufa tiene una sonda de lectura a la que se le asignó un número de vía.

Los problemas que encontramos fueron los siguientes:

Debíamos estar atentos a las alarmas cuando sobrepasaban los límites establecidos. Esto al principio ocurría bastante, hasta que optamos por abrir las estufas las menos veces posibles, sólo a principio y fin de la jornada.

Si la sonda de lectura que se encuentra en el centro de cada estufa se desplazaba y tocaba alguna pared de la estufa o del material que teníamos introducido dentro, también veíamos que variaba la temperatura.

En Murcia en verano hay temperaturas ambientales altas (pueden llegar a 42-45 °C). Si se apagaba el aparato de A/A al terminar la jornada (no trabajamos por la tarde), las temperaturas de las estufas también subían.

A lo largo de tres/cuatro años que tenemos instalado este sistema, hemos ido subsanando estos problemas.

El seguimiento actual del sistema lo llevamos a cabo a diario y una vez en semana, hacemos registros en papel de las curvas de temperatura de cada una de las estufas; además de la creación de fichas de No Conformidad.

P-82 SISTEMÁTICA DE CONTROL DE LA PRECISIÓN DE LOS MÉTODOS CUANTITATIVOS EN MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS PARA UNA EVALUACIÓN GLOBAL DE LA CALIDAD DE LOS ENSAYOS

*E. Razquin Megías^{*1}, M. de Simón Serra², S. Sabaté Camps², A. Luque Lorenzo² y M. D. Ferrer Escobar²*

*^{*1}Unitat de Garantia de Qualitat, Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Avda. Drassanes 13, 08001 Barcelona. erazquin@aspb.es*

²Servei de Microbiologia, Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Avda. Drassanes 13, 08001 Barcelona.

Este trabajo presenta el diseño experimental de control de calidad interno de la precisión de métodos microbiológicos cuantitativos en alimentos, los resultados obtenidos y su aplicación en el marco de un sistema de calidad global basado en la norma ISO 17025.

El diseño se ha fundamentado en el análisis por duplicado tanto de muestras naturales como de muestras naturales adicionadas previamente a la toma de las porciones analíticas. Los análisis por duplicado se han estructurado siguiendo un análisis de la varianza de 1 factor (ISO 5725-3:1994) para poder estimar las contribuciones a la dispersión de resultados, por un lado asociadas a la repetibilidad y por otro lado a la de un conjunto de factores que incluyen: analistas, medios de cultivo, niveles de contaminación, submuestreo.

Los métodos sometidos a este control han sido los recuentos de aerobios, de microorganismos indicadores y de patógenos (11 métodos), y el número de muestras mínimo para estimar la precisión se fijó en 15 por método y matriz.

La selección de matrices se realizó teniendo en cuenta la relevancia de las mismas para cada tipo de microorganismo diana y la cobertura de las categorías alimentarias más frecuentemente analizadas por el laboratorio (productos cárnicos, productos de la pesca, platos preparados, productos lácticos, alimentos deshidratados,...).

Los resultados de precisión, expresados como desviación estándar de los logaritmos decimales de los recuentos, en aquellos casos en que los niveles de contaminación fueron $\geq 10^2$ ufc/g oscilaron entre 0,04 – 0,09 para la repetibilidad y entre 0,06 – 0,17 para el factor estudiado. Las diferencias entre resultados para un 95% de confianza (ISO 5725-6:1994) oscilaron entre 0,11 – 0,26 para la repetibilidad (r) y entre 0,22 – 0,53 para las condiciones intermedias de reproducibilidad. En aquellos casos en que la mayoría de resultados analíticos se concentraron en 10^1 ufc/g, los límites de repetibilidad y reproducibilidad oscilaron entre 0,35 – 0,45 y 0,44 – 0,57 respectivamente.

Este diseño experimental permite monitorizar la precisión de los resultados analíticos y su evaluación ante variaciones de las condiciones del laboratorio como cambios de analistas, equipos y modificaciones de los métodos. Así mismo permite cumplir con otros de los requerimientos estipulados en los esquemas de acreditación, como pueden ser: revalidación de los métodos analíticos en sus matrices de aplicación, ampliación de la validación de los métodos a nuevas matrices, cualificación de los analistas, estimación de la incertidumbre incluyendo el submuestreo y el estudio del límite de cuantificación de forma realista sobre muestras naturales.

ÍNDICE DE AUTORES

A badias Seró M	119
Abalde J	123
Abriouel H	114
Acosta R	163
Adelantado Faura C	109, 122
Agurto Sáenz T	164
Alegre Arribas M T	143
Alegre Vilas I	119
Alonso E	161
Alonso-Calleja C	168, 169
Álvarez A	170
Álvarez Lanzarote A	155
Álvarez-González T	168
Amadeo Sabela R	161
Anguera Farran M	119
Angulo S	82
Antón A	125
Araujo A B	98
Arenas R	129
Arévalo Villena M	132
Argudín M A	104
Arosemena L	109, 122
Arroyo R	144
Asensio M A	163
Avalos I	125
Aymerich Calve T	151, 152
Aznar A	86
Aznar R	73

B adosa E	166
Bances González M	95, 96
Bañeras L	166
Baquero F	82
Barberá V M	124
Barnés Campos M J	92, 118, 173
Barrajón Simancas N	79
Ben Omar N	114
Benítez Santana I	117
Bermejo B	125
Bernárdez M	83
Bernardo A	78, 170
Blanco P	138
Bordons A	142
Bravo D	84
Bravo Vázquez V	94
Briones Pérez A I	79, 132

C abeza M C	157
Cabo M L	83
Cahill S	41
Callejón S	135
Calvo Torras M A	109, 122, 172
Camero I	157
Campos-Montiel R	93
Cantalejo M J	167
Capita R	168, 169
Caro I	93
Carballo J	98
Carballo J	158, 159
Carrascosa Iruzub. C	117
Carvalho A P	48
Caselles Criballés M	165
Caso J L	61
Castaño Garrido M A	92, 118, 173
Catalán V	124
Cebrián Auré G	87
Centeno J A	77, 128, 130
Chacón Ocaña M	132
Cobo A	114
Coll A	102
Coll Jordá D	94
Condón Usón S	87, 153
Conte-Junior C A	75
Cook N	102
Cortés S	138
Corujo Fernández A	100
Costarrica M L	41

D e Caso B	169
De la Fuente Canet A	122
De la Hoz Perales L	88, 157
De la Vega R	172
De Pablo Busto B	94
De Simón Serra M	174
Del Campo R	82
Del Río E	169
Díaz del Río M	137
Díaz Yubero F	137
Diéguez M F	123
Diez M	121

E cheita A	96
Eduardo A J	160
Esteve-Zarzoso B	142

Etcheverry Suárez E 117

Fajardo P 161
Fernández A 78
Fernández A 170
Fernández Álvarez M 75, 88
Fernández L 144
Fernández P S 32, 86
Fdez-Salguero J 127
Ferrer Escobar M D 174
Ferrer S 80, 133, 135
Fidalgo P 123
Franco D 123
Franco I 158, 159
Fresno J M 129
Fuciños C 161
Fuciños P 161

Galán E 127
Gallardo Chacón J J 165
Gálvez A 114
Garabal J I 77, 128, 130
Garay E 73
García Gonzalo D 153, 154
García P 81
García-Albiach R J 82
García Jalón I 72, 99, 121
García-López I 74, 106, 107
García-López M L 74, 106, 107
Garijo-Fernández P 131, 134, 140
Garrido V 72, 99, 121
Garriga Turón M 151, 152
Gianni C 141
Gimeno-Adelant. J V 113
Gómez Alonso S 139
Gómez M 124
Gómez R 127
González L 78, 129
González-Hevia M A 95, 96, 104
Grande Burgos M J 114
Guiu Comadevall N 109, 122
Gutiérrez A R 131, 140
Gutiérrez González P 115
Gutiérrez-Viguera A R 134, 137

Heilig H G H J 144

Hernández M 101
Hernández-Cháv. J F 93
Herrera J J R 83
Herrero Fresno A 95, 96, 97
Hervada Vidal X 58
Hierro Paredes E 75, 88
Hugas M 43
Hurtado A 142

Imanovic L 71
Iniesta García A 120
Izquierdo Cañas P 139
Izquierdo Pulido M 165

Jewell K 38
Jiménez E 144
Jiménez M 113, 162
Jofré Fradera A 151, 152
Jofre J 71, 91
Jornado Salinas R 141
Jove Martín P 172
Juanola Cadena R 172

Kives J 115, 145

Lara-Villoslada F 147
León Alonso-Cortés A 156
Lobote M M 115
López Abarquero P 100
López Alonso V 100
López Giral N 155
López M 170
López Mendoza M C 141, 171
López R 131, 140
López Romalde J 25
López-Martín R 134
Losada A 138
Lucas R 114
Luque Lorenzo A 174

Malcata F X 48
Manca de Nadra M C 116

Mañas Pérez P 87
 Mañas R 80
 Marcos Muntal B 151
 Marín Sillué S 85, 110, 111, 112
 Márquez M C 45
 Marsilla de Pasc. B A 105
 Martín Martín M C 97, 104
 Martín R 61, 149
 Martín R 144, 147
 Martín Ruiz J 51
 Martínez A 32
 Martínez B 103
 Martínez-Blanch J F 73
 Mtnez Cañamero M 114
 Mtnez Gonzáles N E 116
 Martínez Molina E 136
 Martínez Pérez O M 120
 Martínez Reina G 92, 118, 173
 Martínez S 158, 159
 Martínez Suárez J V 100
 Martínez Uceda J 120
 Martínez Viedma P 114
 Mata Anguiano C M 171
 Mata C 113
 Mata Vallespín L 76
 Mateo E 162
 Mateo F 113, 162,
 Mateo J 93
 Mateo R 113, 162
 Mateos P F 136
 Medina A 113, 162
 Medina M 84, 148
 Mendoza Fdez M C 95, 96, 97, 104
 Mesas Mesas J M 143
 Millán de Larriva R 117
 Moliner Recuero M 172
 Monjardín C 61, 149
 Montesinos E 166
 Montiel R 84
 Mora M T 160
 Morales Valle H 85, 110
 Moreno Temprado R 100
 Muniesa M 71, 91
 Muñoz J J 103
 Muñoz Andrade M G 116

Nadal A 102
 Navarro Hidalgo V 116
 Navas Fernández J 100
 Núñez F 163

Olarte Martínez C 137
 Olivares M 147
 Ordóñez Pereda J A 88, 157
 Orgaz B 115, 145
 Oria Eraso C 94
 Orozco Hdez L O 116
 Orriols I 138
 Ortega E 114
 Ortiz Jareño S 100
 Otero Carballeira A 107

Pablos-López M 74, 106, 107
 Pagán Tomás R 153, 154
 Palacios-Vargas S 93
 Palop A 32, 86
 Palop M Ll 139
 Palou E 29
 Pardo I 80, 133, 135
 Pastoriza L 83
 Pastrana L 161
 Peleato Sánchez M L 76
 Pena A 159
 Peña Burgos S 156
 Pérez Álvarez M J 108
 Pérez García E 117
 Pérez N 161
 Pérez-Martínez G 146
 Periago P M 32
 Pino A 127
 Pla M 102
 Polo L 133, 135
 Pozuelo M J 82
 Prados F 127
 Prieto M 168, 169
 Puértolas Gracia E 155

Quinto E J 160

Ramos Girona A J 85, 110, 111, 112
 Ramos Gorbeña J C 164
 Raso Pueyo J 35, 154, 155
 Razquin Casquero P 76
 Razquin Megías E 174

Reguant C 142
 Reguera Useros J I 156
 Reina Martínez G 120
 Rimblas Corredor M E 105, 118, 120
 Rius Bofill N 165
 Rivas Esteban C I 105
 Rodicio Rodicio M R 95, 96, 97, 104
 Rodríguez A 103
 Rodríguez A 163
 Rodríguez E 148
 Rodríguez Fdez I 97
 Rodríguez Glez M 109, 122, 172
 Rodríguez I 61, 81
 Rodríguez J M 144, 147
 Rodríguez López L A 108
 Rodríguez Pérez M C 143
 Rodríguez R 148
 Rodríguez-Alonso P 77, 128, 130
 Rodríguez-Calleja J M 74, 106, 107
 Rodríguez-Lázaro D 101
 Rozès N 142
 Ruiz García P 171
 Ruiz Hernández A 173
 Ruiz Pérez P 139

Sabaté Camps S 174
 Sacristán N 129
 Sagarzazu Grau N 87
 San José C 115, 145
 Schez Cánovas A M 92, 118, 173
 Schez Valenzuela A 114
 Sanchis Almenar V 85, 110, 111, 112
 Sandoval H 78, 129
 Sanjuán Velázquez E 117
 Sampedro G 83
 Santamaría-Aquilué P 131, 134, 140
 Santos J A 74, 106
 Sanz Cervera S 137
 Sarmiento L A 146
 Serra-Moreno R 91
 Seseña Prieto S 139
 Sevilla Miguel E 76
 Shiva Ramayoni C 109, 122
 Sierra S 147
 Silva L R 136
 Smidt H 144
 Smienk H G F 76
 Soberón N 61, 149
 Somolinos Lobera M 153, 154
 Soto-Simental S 93
 Suárez J E 61, 81, 149

Tello Anchuela O 54
 Tenorio-Rodríguez C 134, 140
 Tornadijo M E 78, 129
 Torres E 123
 Torres Sanchis R 119
 Torres Vitela M R 116
 Trias R 166
 Trujillo M E 136

Valero Rello A 112
 Valle-Algarra F M 113, 162
 Vázquez J 115, 145
 Velásquez E 136
 Ventosa A 45
 Vilella Martínez M D 92, 118, 173
 Villa López M I 105, 120
 Viñas Almenar I 119
 Vioque M 127
 Vitas A I 72, 99, 121
 Vivas Gil A 92
 Voysey P 38

Xaus J 147

Yáñez M A 124
 Yebra M J 146

Zancajo Villa A 105
 Zigorraga Arrien C 94
 Zoetendal E G 144
 Zúñiga M 146

