XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Valladolid, 19-22 septiembre 2010

LIBRO DE RESÚMENES

SEM
Sociedad Española de Microbiología

Dedicado al Profesor Dr. Juan Ignacio Reguera Useros

In memoriam

CONTENIDOS

Pág

PROGRAMA……..…. 1

PLANOS DE UBICACIONES……..…. 7

COMITÉS
- Comité de Honor…….....……..…. 11
- Comité Científico……..…. 12
- Comité Organizador……..…. 13

CONFERENCIAS PLENARIAS Y PONENCIAS……..…. 15

COMUNICACIONES ORALES Y POSTERS
- Alimentos funcionales
  - Comunicaciones orales……..…. 55
  - Posters……..…. 58
- Conservación de alimentos
  - Comunicaciones orales……..…. 63
  - Posters……..…. 69
- Desinfección de alimentos
  - Comunicaciones orales……..…. 88
  - Posters……..…. 91
- Enología
  - Comunicaciones orales……..…. 95
  - Posters……..…. 100
- Genómica de microorganismos
  - Posters……..…. 110
- Metodología
  - Posters……..…. 112
- Microorganimos alterantes
  - Posters……..…. 115
- Probióticos
  - Comunicaciones orales……..…. 118
  - Posters……..…. 119
- Productos fermentados
  - Comunicaciones orales……..…. 126
  - Posters……..…. 131
- Seguridad alimentaria
  - Comunicaciones orales……..…. 143
  - Posters……..…. 153
- Virología
  - Comunicaciones orales……..…. 199
  - Posters……..…. 201
- Otra
  - Posters……..…. 204

AGRADECIMIENTOS……..….211

PROGRAMA

DOMINGO, 19 de septiembre de 2010

20:00 h. Recorrido en **BUS TURÍSTICO** Parada Acera Recoletos frente al nº6. Móntate y recorre Valladolid. Gentileza del Excmo. Ayuntamiento de Valladolid.

LUNES, 20 de septiembre de 2010

9:00–9:30 h. CEREMONIA DE APERTURA

Excmo. Sr. D. Francisco Javier Léon de la Riva.
Alcalde–Presidente del Excmo. Ayuntamiento de Valladolid.

Excmo. Sr. D. Francisco Javier Álvarez Guisasola.
Consejero de Sanidad, Junta de Castilla y León.

Excmo. Sr. D. Antonio Orduña Domingo.
Vicerrector de Patrimonio e Infraestructuras. Universidad de Valladolid.

9:30–10:15 h. CONFERENCIA INAUGURAL
"The role of Food Microbiology in Food Safety and Quality".
Prof. Peter Raspor, University of Ljubljana.

10:15 –11:00 h. Café patrocinado por Roche Applied Science

Sesión de Posters I (permanecerán expuestos todo el día)

Alimentos funcionales	92, 105, 141
Conservación de alimentos	69, 72, 85, 87, 88, 91, 95, 101, 109, 138, 140, 147, 200
Desinfección de alimentos	84, 112, 201, 206
Enología	68, 77, 78, 110, 131, 153, 160
Genómica de microorganismos	100
Probióticos	103, 106, 107, 127, 129
Productos fermentados	76, 81, 93, 99, 118, 128, 149, 150, 151

11:00–13:00 h. MESA REDONDA I. "**ESTRATEGIAS EMERGENTES DE CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS**" patrocinada por NC HYPERBARIC.
Moderador: Prof. Miguel Prieto Maradona, Universidad de León.

1. "Multiple Antimicrobial Hurdle Issues".
   Prof. John N. Sofos, Colorado State University, EE.UU.
2. "Modern preservation: a macroscopic and microscopic approach".
   Prof. Frank Devlieghere, Ghent University, Bélgica.
3. "Aplicación de la Biología de Sistemas Microbiológicos para garantizar la inocuidad alimentaria con tecnologías no térmicas".
   Prof. Dr. Pablo Fernández Escámez. Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia.

13:30 h. Recepción y ágape en el Excmo. Ayuntamiento de Valladolid (se ruega acudir a la Plaza Mayor, 1 con rigurosa puntualidad).

15:30–16:30 h. WORKSHOP Oxoid
BAX Q7: "Screening de patógenos alimentarios. Practicable, rápida y fiable".

16:30–17:30 h. WORKSHOP Applied Biosystems
"Sistema de detección de patógenos alimentarios por PCR-Real Time: Una solución completa".
Oscar Lenguas y Juan Antonio García.

17:30–19:30 h. MESA REDONDA II. "**AVANCES EN TÉCNICAS MOLECULARES EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**" patrocinada por LABORATORIOS CONDA–PRONADISA
Moderador: Prof. Elías Rodríguez Ferri, Universidad de León.

1. "Estrategias de detección y cuantificación de microorganismos patógenos de origen alimentario por PCR".
   Prof. Rosa Aznar, Universidad de Valencia.
2. "Taxonomía procariota: una disciplina necesaria y pragmática".
   Dra. Maria del Carmen Macián, CECT, Valencia.
3. "Ecología Microbiana: una nueva perspectiva para comprender la Microbiología de los alimentos".
   Prof. Jesús García–Gil, Universidad de Gerona.
4. "Molecular detection and typing facilitating the elucidation of a recent Austrian episode of Listeriosis".
   Prof. Martin Wagner, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria.

19:30 h. (primer grupo) y 20:00 h. (segundo grupo).
RUTA DEL HEREJE (de la novela de D. Miguel Delibes).
Gentileza del Excmo. Ayuntamiento de Valladolid. Organiza Valladolid Turismo.
Punto de encuentro Plaza de San Pablo.
Se ruega apuntarse en la secretaría técnica.

MARTES, 21 de septiembre de 2010

9:00–11:00 h. MESA REDONDA III. "**LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS MÁS ALLÁ DE LOS PATÓGENOS ALIMENTARIOS**".
Moderador: Juan Ignacio Reguera, Universidad de Burgos

1. "El tracto gastrointestinal como fuente de microorganismos funcionales".
   Dr. Baltasar Mayo, IPLA–CSIC, Asturias.
2. "Proteínas antifúngicas de ascomicetos para controlar el desarrollo de mohos toxigénicos en alimentos".
   Prof. Miguel Ángel Asensio, Universidad de Extremadura, Cáceres.
3. "Microbiota de quesos artesanales andaluces".
   Prof. Dr. Manuel Martínez–Bueno, Universidad de Granada.
4. "La metagenómica aplicada al estudio de una alteración del queso: la hinchazón tardía".
   Dra. Marta Hernández Pérez, Instituto Tecnológico Agrario, Valladolid.

11:00–11:30 h. Café – Sesión de Posters II (permanecerán expuestos todo el día)

Metodología	102, 210
Microorganismos alterantes	143, 167
Otra	71, 80, 207
Seguridad alimentaria	73, 74, 75, 86, 89, 94, 98, 104, 108, 115, 116, 117, 122, 132, 133, 134, 135, 137, 139, 144, 145, 146, 152, 155, 157, 161, 166, 168, 169, 205, 209,211,212
Virología	90, 162

11:30–13:30 h. Sesión de Comunicaciones Orales I.

Virología (1)

120 Detección y genotipado de rotavirus grupo A, un patógeno emergente en la cadena alimentaria. Marta Diez–Valcarce, Maria Isabel Fernández–Natal, Hortensia Rodríguez–Pollán, David Rodríguez Lázaro y Marta Hernández.

Seguridad alimentaria (7)

79 Bacteriófagos portadores del gen de la toxina shiga 2 en alimentos evaluados por PCR cuantitativa. Lejla Imamovic y Maite Muniesa.

97 Esponja versus mini-rodillo en la detección de *Listeria monocytogenes* y en el control de la contaminación en la industria alimentaria. Diego Gómez, Agustín Ariño, Juan José Carramiñana, Carmina Rota y Javier Yangüela.

111 Eficacia de la tecnología de pulsos de luz para la inactivación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 en caña de lomo ibérico. Elvira Barroso, Eva Hierro, Xavier F. Hospital, Susana Manzano y Manuela Fernández.

136 Estudio de patogenicidad y tipado de aislados clínicos de *Listeria monocytogenes*. Jaime Ariza–Miguel, Marta Diez–Valcarce, Katarina Kovac, María Isabel Fernández–Natal, Hortensia Rodríguez–Pollán, David Rodríguez–Lázaro y Marta Hernández.

154 Efecto combinado de CO_2 y nisina en biofilms de *L. monocytogenes* adaptados y no adaptados al cloruro de benzalconio transferidos a mejillón. Paula Saá Ibusquiza, Juan Herrera, Daniel Vázquez, Sonia Carrera y Marta Cabo.

156 Efectividad de varios desinfectantes industriales frente a biopelículas y células planctónicas de *Staphylococcus aureus*. Daniel Vázquez–Sánchez, Marta Cabo, Paula Saá, Sonia Carrera y Juan Herrera.

164 Optimización de un protocolo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos. Mª del Mar García, Félix Núñez, Elena Rodas, Josué Delgado y Elena Bermúdez.

13:30–14:00 h Entrega I Premio de Investigación OXOID a la mejor Tesis Doctoral a D. Avelino Álvarez Ordóñez "Estudio de los factores que determinan la respuesta de adaptación ácida y de protección cruzada frente al calor de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Senftenberg: mecanismos implicados".

14:00–15:00 h. WORKSHOP Bio–Rad
"New alternative methods for fast and reliable results in food testing".
Danny Debecker, Cristina Gómez y Jean-Philippe Tourniaire.

14:00–16:00 h. Comida (tickets ofrecidos en la documentación).

16:00–17:30 h. Sesión de Comunicaciones Orales II.

Enología (3)

114 Selección de cepas de levaduras autoctonas de la comunidad de Madrid para la mejora aromática de vinos ecológicos. Tania Balboa–Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos y Margarita Aznar.

165 Adaptación de la levadura vínica a las bajas temperaturas: importancia del metabolismo lipídico. María López, Marián Redón, Nicolas Rozès y José M. Guillamón.

204 Distribución de clones de *Oenococcus oeni* aislados de vinos tintos de la D. O. La Rioja. Lucía González, Rosa López , Pilar Santamaría , Patrocinio Garijo, Carmen Tenorio e Isabel López.

Productos fermentados (3)

82 Comunidades polimicrobianas en las fermentaciones de aceitunas: introducción al estudio de los biofilms mixtos bacterias lácticas–levaduras. Jesús Domínguez Manzano y Rufino Jiménez Díaz.

83 Cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. cremoris procedentes de quesos tradicionales asturianos. Elena Fernández, Ángel Alegría, Susana Delgado y Baltasar Mayo.

148 Detección de *Debaryomyces hansenii* por técnicas de PCR en tiempo real. Irene de la Casa, Alicia Rodríguez, Librada Jiménez, Rubén Gordillo y Mª Jesús Andrade

Probióticos (1)

96 Eficacia del *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en la inducción de la respuesta inmunológica en población de edad avanzada. Marco Antonio Moro, Rebeca Alonso, Isabel Cuevas, Celina Quirós, Juan Saavedra y Carlos López.

17:30–17:45 h. Pausa.

17:45–18:15 h. CONFERENCIA INVITADA.
"Control oficial de los riesgos microbiológicos".
Ilmo. Sr. D. Jorge Llorente Cachorro, Director de la Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria, Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León.

18:15 – 18:45 h: SYMPOSIUM CIENCIA – EMPRESA.
"Financiación pública nacional a la I+D+i en agroalimentación a través de Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial".
D. Carlos Ignacio Franco Alonso. Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial.

18:45–19:45 h. Sesión de Comunicaciones Orales III.

Desinfección (2)

202 Inactivation of noroviruses in strawberry puree using high hydrostatic pressure. Katarina Kovač, Marta Diez–Valcarce, Marta Hernández and David Rodríguez–Lázaro.

208 Altas presiones en la eliminación de *Salmonella enteritidis* en carpaccio de ternera. María de Alba, Daniel Bravo y Margarita Medina.

Alimentos funcionales (2)

158 Estudio de la producción de ácido linoleico conjugado (CLA) por aislados microbianos obtenidos de quesos de leche cruda. Aitana Ares–Yebra, José Ignacio Garabal, Juan Antonio Centeno y Federico Pomar.

163 Metabolismo de proantocianidinas de uva por bacterias lácticas y bifidobacterias. Raquel Tabasco, Irene Bustos, Fernando Sánchez–Patán, María Monagas, Begoña Bartolomé, M. Victoria Moreno–Arribas, Carmen Peláez, Teresa Requena.

19:45 h. Asamblea Socios SEM grupo de Alimentos.

21:00 h. CENA DE CLAUSURA en restaurante "La Parrilla de San Lorenzo" calle Pedro Niño, 1 (se ruega apuntarse en la secretaría del congreso).

24:00 h. COPA en el pub "OHM" calle San Lorenzo, 7.

MIERCOLES, 22 de septiembre de 2010

9:30–10:00 h. WORKSHOP Bruker Biosciences Española S.A.
"Microorganism Identification and Classification".
Francesc Márquez. Responsable de Aplicaciones de Espectrometría de Masas.

10:00–12:00 h. MESA REDONDA IV. "**TEMAS EMERGENTES EN SEGURIDAD ALIMENTARIA**".
Moderador: Albert Bosch Navarro, Universidad de Barcelona

1. "Nuevos enfoques para la gestión de la Seguridad alimentaria".
   Prof. Gonzalo Zurera, Universidad de Córdoba.
2. "Ecología de la resistencia a antimicrobianos: del medio ambiente al hospital".
   Prof. Bruno Gonzalez Zorn, Universidad Complutense de Madrid.
3. "Nuevas técnicas de eliminación de virus en alimentos".
   Dra. Nerea Beguiristain, Universidad de Barcelona.
4. "Modelización de la inactivación de *Listeria monocytogenes* por altas presiones hidrostáticas en jamón curado".
   Dra. Sara Bover–Cid, IRTA, Monells, Gerona.

12:00–12:15 h. Café

12:15–13:15 h. Sesión de Comunicaciones Orales IV.

Conservación (4)

70 Inactivación de *Staphylococcus aureus* mediante bacteriófagos en queso semicurado. Ana Rodriguez, Edita Bueno, Beatriz Martínez y Pilar García.

113 Aplicación del concepto de las barreras ("hurdle concept") como estrategia para aumentar la vida útil de filetes de pechuga de pollo. Jose M. Rodríguez–Calleja, Malco Cruz–Romero, Maurice O'Sullivan, María–Luisa García–López y Joseph P. Ferry.

119 Aplicación de electrones acelerados para minimizar el hinchamiento tardío de los quesos y repercusiones en la microbiota común. Raquel Velasco, Mª Concepción Cabeza, Mª Isabel Cambero, Lorenzo de la Hoz, Irene García Márquez y Juan Antonio Ordóñez.

130 Estudio de la flora microbiana del polen apícola. Inmaculada Fernández, Mª Luisa Ortiz, Ana Mª Pedregosa, María Aller, Amelia González y Ana Quintana.

13:15–14:00 h. CONFERENCIA DE CLAUSURA
Entrega I Premio CASCAJARES a joven investigador en Microbiología de los Alimentos a D. José Miguel Soriano del Castillo "La proteómica aplicada al análisis de toxinas estafilocócicas alimentarias: hoja de ruta hacia el futuro".

14:00–14:15 h. Entrega de premios:
MICROBIAL al mejor póster PCR.
Congreso a la mejor comunicación oral.

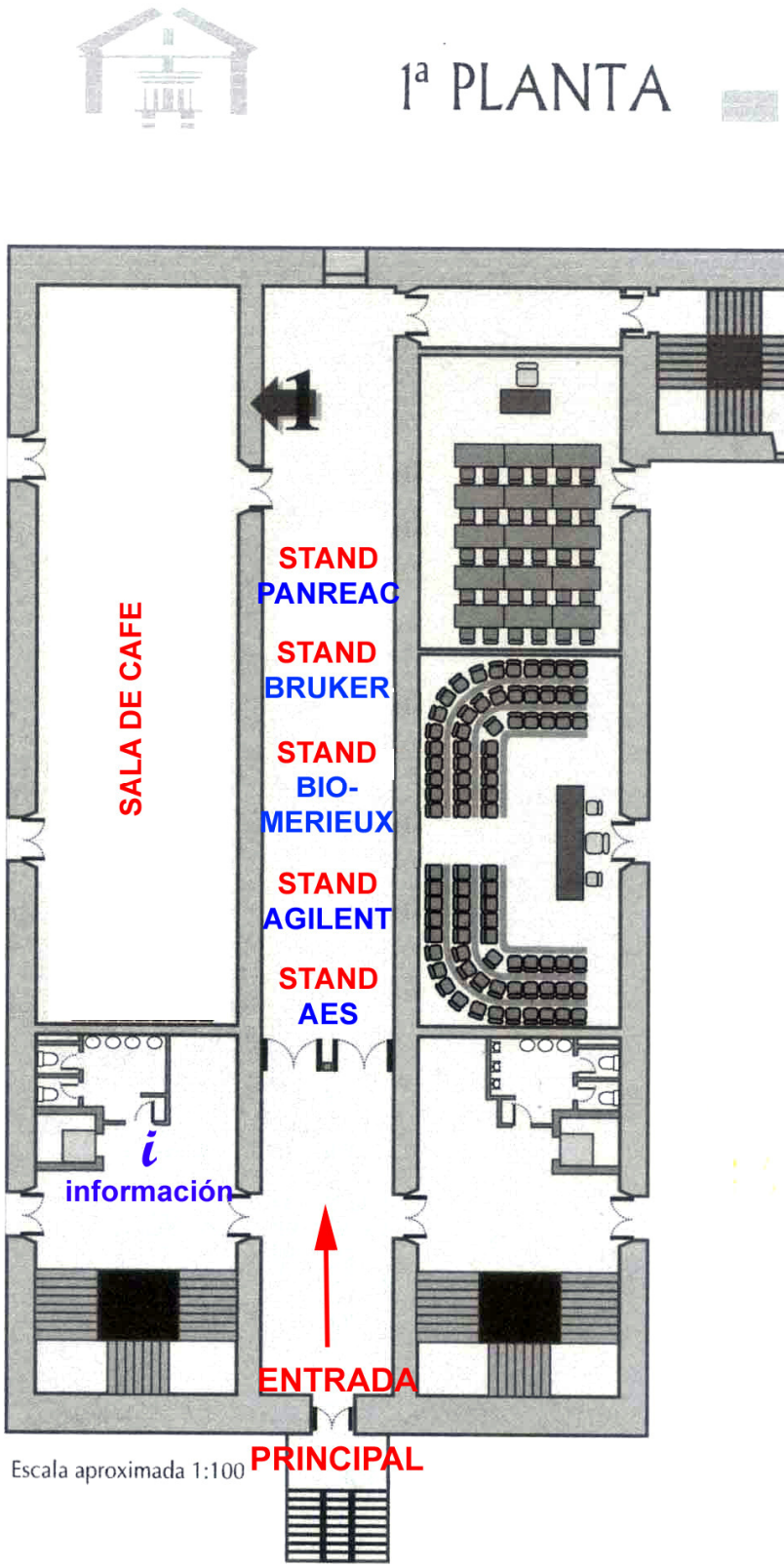
14:15–14:30 h. CLAUSURA.

Ilmo. Sr. D. Jorge Llorente Cachorro.
Director de la Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria, Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León.

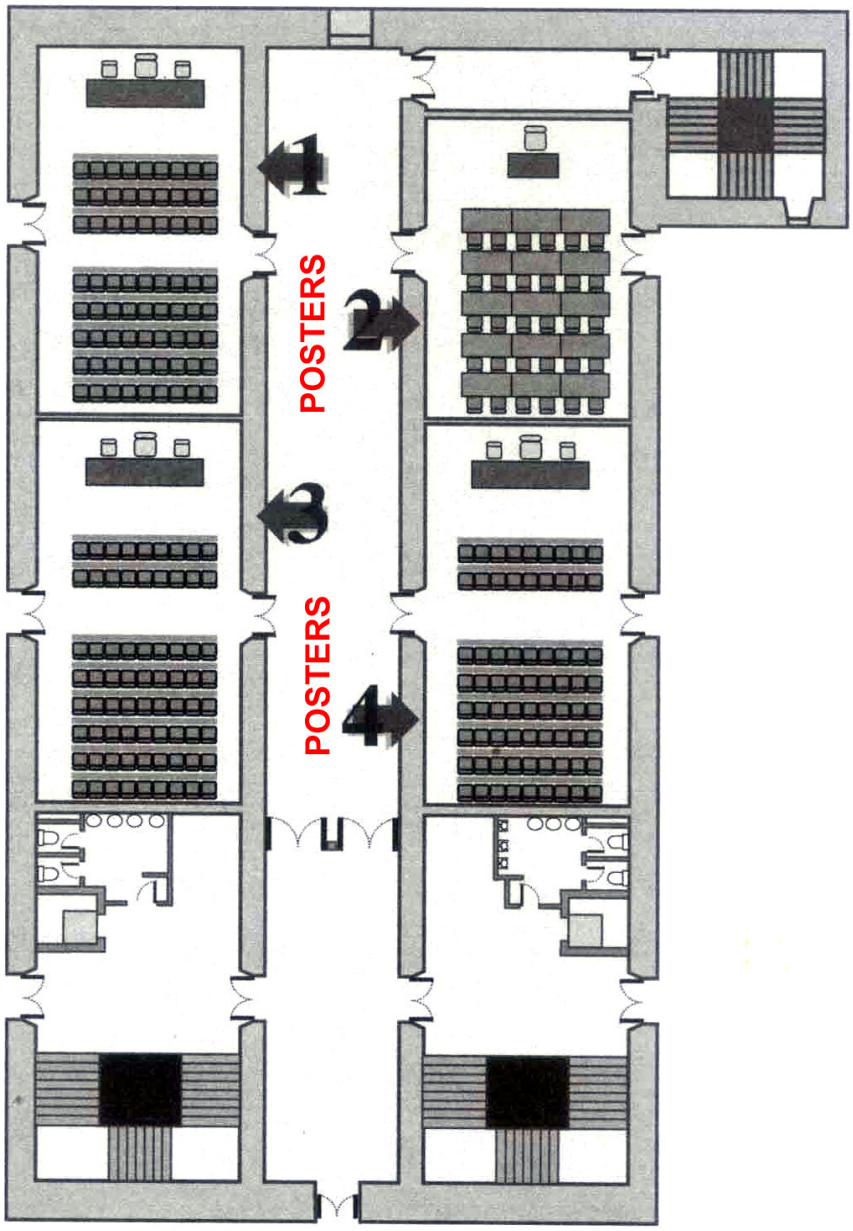
Ilmo Sr. Luis Alberto Calvo Sáez.
Presidente del Colegio Oficial de Veterinarios de Valladolid.

14:30 h. Entrega de obsequio del Congreso.

PLANOS DE UBICACIONES

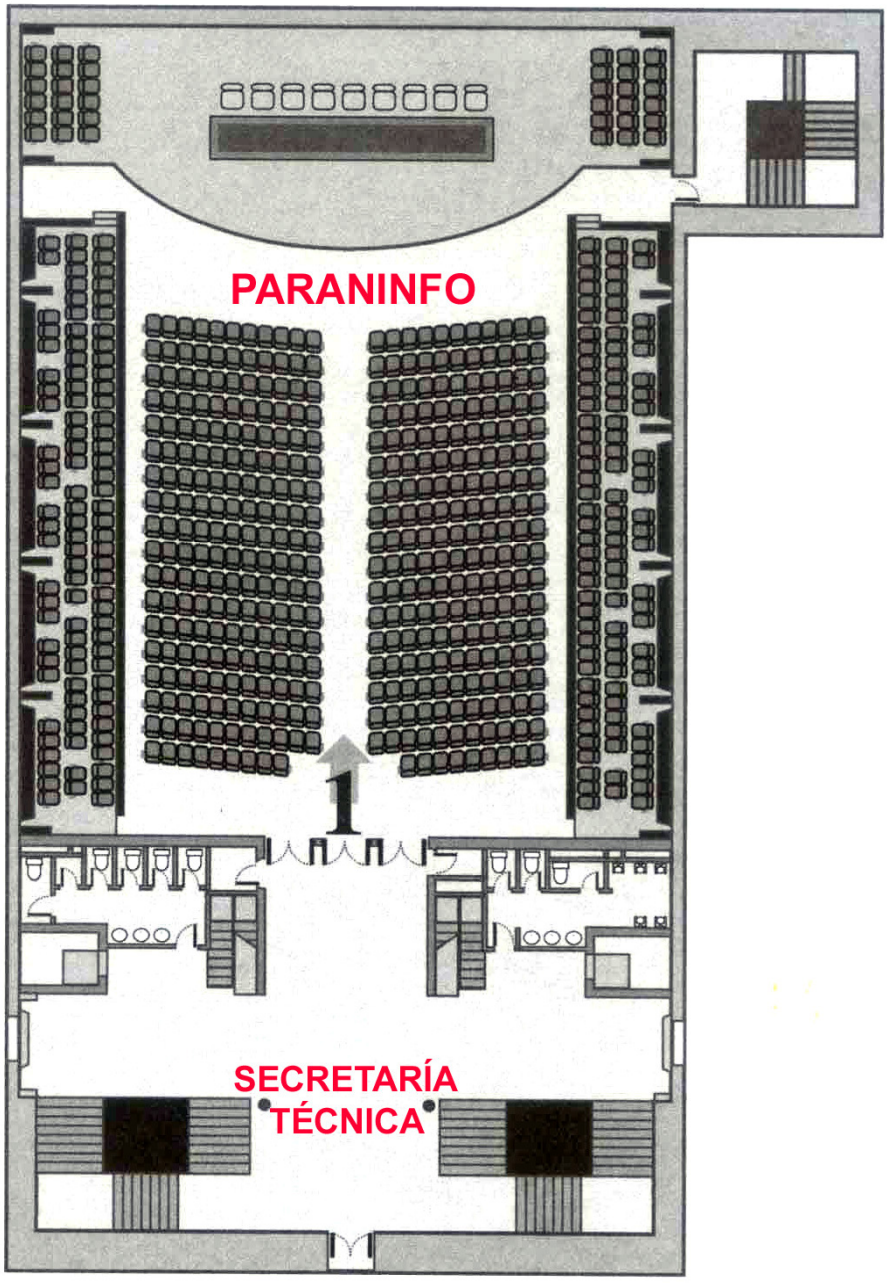


2ª PLANTA



Escala aproximada 1:100

3ª PLANTA



Escala aproximada 1:100

COMITÉS

COMITÉ DE HONOR

Presidente

Excmo. Sr. D. Juan Vicente Herrera Campo
Presidente da la Junta de Castilla y León

Vocales

Excmo. Sr. D. Javier León de la Riva
Alcalde-Presidente del Excmo. Ayuntamiento de Valladolid

Excmo. Sr. D. Francisco Javier Álvarez Guisasola
Consejero de Sanidad, Junta de Castilla y León

Excmo. Sr. D. Juan José Mateos Otero
Consejero de Educación, Junta de Castilla y León

Ilmo. Sr. D. Ramiro F. Ruiz Medrano
Presidente de la Excma. Diputación Provincial de Valladolid

Ilmo Sr. D. Jorge Llorente Cachorro
Director General de la Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria
Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León

Ilmo Sr. D. Juan Casado Canales
Director General de Universidades e Investigación
Consejería de Educación, Junta de Castilla y León

Excmo y Magfco. Sr. D. Marcos Sacristán Represa
Rector de la Universidad de Valladolid.

Excmo Sr. D. Ricardo J. Rigual Bonastre
Decano de la Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.

Excmo. Sr. D. Ricardo Guerrero Moreno
Presidente de la Sociedad Española de Microbiología

Excmo. Sr. D. Francisco Javier Carballo García
Presidente del Grupo de Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología

Excmo. Sr. D. Tomás Fisac de Frías.
Presidente del Consejo de Colegios Veterinarios de Castilla y León.

COMITÉ CIENTÍFICO

Coordinador	David Rodríguez Lázaro	Instituto Tecnológico Agrario
Vocales	Albert Bosch Navarro	Universidad de Barcelona
	Amparo Querol Simón	IATA, CSIC
	Baltasar Mayo Pérez	IPLA-CSIC
	Carmen Peláez Martínez	Instituto del Frío- CSIC
	Elena González Fandos	Universidad de la Rioja
	Elías Rodríguez Ferri	Universidad de León
	Francisco Javier Carballo García	Universidad de Vigo
	Jesús Ventanas Barroso	Universidad de Extremadura
	José Fernández-Salguero Carretero	Universidad de Córdoba
	Juan A. Ordóñez Pereda	Universidad Complutense de Madrid
	Juan Evaristo Suárez Fernández	Universidad de Oviedo
	Juan Ignacio Reguera Useros	Universidad de Burgos
	Juan Miguel Rodríguez	Universidad Complutense de Madrid
	Lorenzo de la Hoz Perales	Universidad Complutense de Madrid
	Manuel Núñez Gutiérrez	INIA
	Margarita Medina Fernández-Regatillo	INIA
	Marta Hugas i Maurici	EFSA
	Marta Hernández Pérez	Instituto Tecnológico Agrario
	Miguel Ángel Asensio Pérez	Universidad de Extremadura
	Miguel Prieto Maradona	Universidad de León
	Peter Raspor	Universidad de Lujbiana

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente	David Rodríguez Lázaro	Instituto Tecnológico Agrario
Vicepresidente	Marta Hernández Pérez	Instituto Tecnológico Agrario
Secretario	Emiliano Quinto Fernández	Universidad de Valladolid
Vocales	Alfredo Blanco Quirós	Universidad de Valladolid
	Antonio Orduña Domingo	Universidad de Valladolid
	Carlos Alonso Calleja	Universidad de León
	Eduardo Arranz Sanz	Universidad de Valladolid
	Elías Fernando Rodríguez Ferri	Universidad de León
	Javier Álvarez Benedí	Junta de Castilla y León
	José Antonio Garrote	Universidad de Valladolid
	José María Eiros Bouza	Universidad de Valladolid
	Juan Ignacio Reguera Useros	Universidad de Burgos
	Juan José Lozano Barriuso	Junta de Castilla y León
	María Purificación Gutiérrez Rodríguez	Universidad de Valladolid
	Miguel Ángel Bratos Pérez	Universidad de Valladolid
	Raúl Ortiz De Lejarazu	Universidad de Valladolid
	Rosa Cápita González	Universidad de León
	Rufino Álamo Sanz	Junta de Castilla y León
Colaboradores	Marta Diez Valcarce	Instituto Tecnológico Agrario
	Jaime Ariza Miguel	Universidad de León
	Katarina Kovac	Universidad de León

CONFERENCIAS PLENARIAS Y PONENCIAS

Correspondientes a participantes invitados

C1 THE ROLE OF FOOD MICROBIOLOGY IN FOOD SAFETY AND QUALITY

Prof. Dr. Peter Raspor
Chair of Biotechnology, Microbiology and Food safety, Department of Food Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana.
peter.raspor@bf.uni-lj.si

ABSTRACT
Food microbiology is applied science dealing with practical attitude of microbiology in food area from food producer to food consumer. Food production, processing storage and distribution all face profound changes in last decades because of extension of shelf live of food products. Understanding food safety term along the food chain has various dimensions. In the food safety program we should be able to identify all hazards, analyze them, evaluate the likelihood of their occurrence and identify measures for their control. Being (food) microbiologist is a challenge to analyze, processes and preserve food along food supply chain, but also to understand how good practices are implemented in food supply chain, where food microbiology and food microbiologists is actively involved in food safety management from producer to consumer.

INTRODUCTION
Food microbiology is applied science dealing with practical attitude of microbiology in food area from food producer to food consumer. The role of food microbiology in food safety and quality is essential due to practical solutions in food supply chain. Food production, processing storage and distribution all face profound changes in last decades because of extension of shelf live of food products. Nonetheless food microbiology is facing fast development in the last century, not just in methodology where we came from classical plating and diluting methods to molecular methods, which dramatically improved time frame in which we get reliable information abut microbial status.

FOOD MICROBIOLOGY
Food microbiology is the study of the microorganisms that inhabit, create, or contaminate food. Food Microbiology has a few directions of development technology: preservation, detection, mastering and elimination of microbes, as well as education in sanitary, technology and education of microbiologist and technologist. However, education is the one who crates basic communication network necessary for functioning. The question is how much novelty it tolerates and what would be the best principle to introduce practice into the education and vice versa to assure relevant and efficient start up learning/teaching but also later lifelong learning/teaching. One can base education on food safety on experience and also on theory and novelties. Whatever one prefers it should be based on good practice approach. Current education in food microbiology is based on natural science principles.

FOOD MICROBIOLOGY AND FOOD SAFETY

Food safety is a major focus of food microbiology. Pathogenic molds, bacteria, viruses and toxins produced by microorganisms are all possible contaminants of food. However, microorganisms and their products can also be used to combat these pathogenic microbes. Probiotic bacteria, including those that produce bacteriocins can kill and/or inhibit pathogens. Finally, bacteriophages, viruses that only infect bacteria, can be used to kill bacterial pathogens. Thorough production, processing and preparation of food we eliminate most bacteria and viruses. However, toxins produced by contaminants may not be heat-labile, and some are not eliminated by traditional and modern processing techniques. For that reason various technological and regulatory procedures were invented in past century.

Analyzing new dimensions of food safety we can see novel safety concerns via development of creations of new substrates, via GMO and also conventionally, via novel technological solution and processing and also through novel nutritional practices. Food systems are experiencing in practices new possibilities, due to fast technical and technological advancement in developed world, such as novel plant products, processing without heat treatment, in situ control of products with biosensors, fast and precise detection of unwanted/desired food grade microorganisms, control of fluxes in order to reduce unwanted side reactions, intelligent packaging and polymer restructuring for increased shelf life and novel eatables and the last but not least the use of new approaches in food preservation and distribution, not to mention convenience foods and all impacts on human health in its wellbeing. Variations of new tools based on molecular methods allowing fast and unequivocal identification of strains which are entering daily practice. Although the questions about standardization, validation, harmonization or simple application of relevant method in practice are still going on in academic and professional circles, we are able to detect unwonted agents (hazards) in our food faster and on reliable way. These methods have been successfully applied and in general, biochemical and molecular identification compared well. In the last few years the possibility of using molecular approaches and direct sampling of the DNA and/or RNA in complex microbial systems has opened up areas of research that have already been studied but were not completely understood because of the biases related to the traditional methods. With traditional techniques only easily cultivable organisms are discovered, and often microorganisms for which selective enrichment and sub culturing is problematic or impossible cannot be characterized.

We have standard microbiological methods developed to determine whether bacterial cells were dead or alive since middle of last century, but we can not relay on them since many studies have revealed the ability of both Gram-positive and Gram-negative bacteria to go into a viable but non-cultivable (VBNC) state. In this state, bacteria are still viable and show metabolic activity and respiration, but cannot be shown as colony forming units by the conventional plate counting and hence remain hidden. Regarding foods this is an important question because the answer is the basis of decisions about safety of food and drinking water. However there are selections and variations of new and novel methods entering this filed. They all affirm to be efficient and rapid. They are based on presence and viability, composition and structure, product and physiological characteristic and are now entering in application through Complex and Integrated systems.

Understanding food safety term along the food chain has various dimensions. In the food safety program we should be able to identify all hazards, analyze them, evaluate the likelihood of their occurrence and identify measures for their control. Hazard is a biological, chemical, physical agent or condition with the potential to cause an adverse health effect. Managing hazards and surrounding circumstances does not mean that we mange safety completely. Today we master food safety via: Good Agricultural Practice (GAP), Good Manufacturing Practice (GMP), Good Transport Practice (GTP), Good Warehouse Practice (GWP), Good Selling Practice (GSP), Good Catering Practice (GCP) and Good Housekeeping Practice (GKP) as well as Good Laboratory Practice (GLP) and Good Hygiene Practice (GHP) which can be involved in all practices mentioned and can be also independently applied. In all of them are HACCP elements that compose HACCP system as main system in food practice today. All mentioned practices are partial and not connected in comprehensive system. We offered novel approach of close link-up of all relevant good practices to Good Nutrition Practice (GNP), which could solve many issues since it involves the last step in food chain: the consumer. In classical food chain strategy all relevant activities are taken for benefit of human being but locating her/him outside the system as consumer. This is offering food safety platform with consumer as an active partner in the good nutrition practice (GNP). This novel proactive approach has been opening new dimension in assuring food safety in human nutrition.

FOOD MICROBIOLOGY AND QUALITY

Food science is focused on the composition of foods and on the changes that occur when they subjected to food processing. Human nutritional status, health, physical and mental faculties depend on the food we eat and how we eat it. Access to good quality food has been man's main endeavour from the earliest days of human existence. Safety of food is a basic requirement of food quality. Food quality can be considered as a complex characteristic of food that determines its value or acceptability to consumers. To manage food quality we have to understand the concept of total food quality. This concept is defined by scientific and technological criteria on one side but is also influenced by consumers judgments. Food properties contributing to total food quality include sensory characteristics, food safety, shelf life, nutritional value, functionality, service and stability, wholesomeness, sociological and psychological parameters. Among them are colour, texture, taste and functional properties connected to some molecular aspects that are still elusive, although of interest since food can have some psycho-

active effects on the consumer, thus, influencing his or her behaviour during either pre-ingestive or post-ingestive phases. Many technological and gastronomic treatments may alter food components, not just mentioned but also principle components like fats, proteins, and vitamins, thus negatively affecting any of the mentioned aspects of quality. Specific analytical strategies can be utilized both to assess and protect food quality and to correctly conduct and monitor food production.

Food systems in developing countries are not always as well organised and developed as in the industrialised world. Moreover, problems of growing population, urbanisation, lack of resources to deal with pre- and post-harvest losses in food, and problems of environmental and food hygiene mean that food systems in developing countries continue to be stressed, adversely affecting quality and safety of food supplies.

CURRENT DIRECTIONS OF RESEARCH AND PRACTICE

Complexity of food area is asking for a standardized approach. For this reason good practices entered this field very efficiently; however this is not sufficient to manage all complexity. It is proposed that we need to cluster practices under comprehensive shield of Good nutritional practice. Likewise in food cluster also in education we face new streams and new practices on learning and teaching side. They are, in principle, coming to the food education from pedagogical area. Consequently are even more divers in food processing and technology practice. We see the possibility to fuse experiences from various sides in a novel model of education in food microbiology area which would harvest good practice principles from food management with principles arising from pedagogical background. In our opinion, both concepts can be integrated into new platform good practice in education. Consequently this should reflect in efficiency of managing hazards and surrounding circumstances. We are aware that this does not mean that we mange safety completely. The importance of microbial pathogens in transmitting food borne diseases has been highlighted in recent years with several large, well-publicised outbreaks of food poisoning incidents. Many of the 'new emerging' food borne pathogenic microorganisms can be placed into one or more of the following categories (underestimated pathogens - invisible agents - opportunists - immigrants and new organisms). The introduction of the HACCP system in last decades has shown positive impact on reduction of certain microbiological contaminations. However, much of activity is still under development, since producers try to push production costs as low as possible and due to this sometimes some essential steps for food safety are partially ignored.

Being (food) microbiologist and educator is a challenge to analyze this approach and to try to understand how good practices are implemented in food supply chain, where food microbiology is actively involved in food safety management from producer to consumer. However, it looks that importance of good practice in education and training in food microbiology is still pending for further development and implementation.

REFERENCES:

Raspor, Peter. Bio-markers: traceability in food safety issues. Acta Biochim. Pol., 2005, vol. 52, no. 3, str. 659-664.

Raspor, Peter. Faces of foods on the world of food systems. Acta aliment. (Bp.), 2006, vol. 35, no. 3, str. 247-249.

Jevšnik, Mojca, Bauer, Martin, Zore, Anamarija, Raspor, Peter. Hygienic status of small and medium sized food enterprises during adoption of HACCP system. International journal of food science, technology & nutrition, 2007, vol. 1, no. 1, str. 95-113.

Plahuta, Primož, Raspor, Peter. Comparison of hazards : current vs. GMO wine. Food control. [Print ed.], 2007, vol. 18, str. 492-502

Jevšnik, Mojca, Hlebec, Valentina, Raspor, Peter. Consumer interpretation of the term food safety. Acta aliment. (Bp.), 2008, vol. 37, no. 4, str. 437-448.

Jevšnik, Mojca, Hoyer, Silvestra, Raspor, Peter. Food safety knowledge and practices among pregnant and non-pregnant women in Slovenia. Food control. [Print ed.], 2008, vol. 19, no. 5, str. 526-534.

Jevšnik, Mojca, Hlebec, Valentina, RASPOR, Peter. Consumers' awareness of food safety from shopping to eating. Food control. [Print ed.], Aug. 2008, vol. 19, no. 8, str. 737-745.

Jevšnik, Mojca, Hlebec, Valentina, Raspor, Peter. Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. Food control. [Print ed.], 2008, vol. 19, no. 12, str. 1107-1118,

Plahuta, Primož, Raspor, Peter. Comparative analysis of genetically modified yeasts in winemaking. J. wine res, 2008, vol. 19, no. 2, str. 95-107.

Raspor, Peter. Total food chain safety: how good practices can contribute?. Trends food sci. technol., 2008, vol. 19, str. 405-412.

Raspor, Peter, Jevšnik, Mojca. Good nutritional practice from producer to consumer. Crit. rev. food sci. nutr., 2008, vol. 48, no. 3, str. 276-292.

Jevšnik, Mojca, Hlebec, Valentina, RASPOR, Peter. Survey of safe and hygienic practices among Slovenian sauerkraut growers. Food control, 2009, vol. 20, str. 677-685.

Plahuta, Primož, Raspor, Peter. Comparative analysis of GMO plant foods current state and trends. International journal of food science, technology & nutrition, 2009, vol. 2, no. 2, str. 29-47.

Plahuta, Primož, Raspor, Peter. Current state of transgenes in food production. Ital. food beverage technol., mar. 2009, no. 55, str. 13-26.

Raspor, Peter. The European declaration on food, technology and nutrition: editorial. Acta aliment. (Bp.), 2009, vol. 38, no. 1, str. 3-7.

C2 MULTIPLE ANTIMICROBIAL HURDLE ISSUES

Prf. Dr. John N. Sofos

University Distinguished Professor, Center for Meat Safety & Quality, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523-1171, EE.UU.

john.sofos@colostate.edu

Food safety has become a major concern for consumers, industry, regulatory authorities, public health agencies, and research scientists throughout the world in recent years. Important food safety issues of current worldwide concern include the need to control traditional as well as emerging or evolving pathogenic microorganisms, including those of increased virulence at low infectious doses, as well as those that are resistant to antibiotics or to food processing associated stresses caused by physical (heat, cold, drying, radiation) and chemical (acids, salts,

sanitizers, etc) agents. Other important issues are control of cross-contamination of water and foods of plant origin with enteric pathogens originating from domestic and wild animals and birds, associated animal manure disposal issues, and potential for implementation of pathogen control interventions and programs at the farm level. Additional food safety concerns, which are not the subject of this communication, may include the safe use of food additives, chemical residues in foods, animal identification and traceability issues, the safety and quality of food products labelled as organic or natural, the need for and development of improved and rapid testing and pathogen detection methodologies, regulatory harmonization issues at the national and international level, products of food biotechnology or genetically modified organisms (GMO), and intentional bioterrorism concerns. These issues have been presented in some detail in recent publications (Doyle and Erickson, 2006; Sofos, 2008, 2009; Sofos and Geornaras, 2010). This communication provides an overview of food safety assurance strategies, the use of multiple antimicrobial hurdles for pathogen control in foods, the potential of sublethal hurdles to cause pathogen cell adaptation to stress and resistance development, and strategies to prevent stress adaptation and maximize pathogen control through use of multiple hurdle technologies.

A logical strategy for microbial pathogen control with the goal of improving food safety is to apply adequate cleaning, good sanitation, proper hygiene, and effective antimicrobial intervention technologies in order to: (i) harvest and ship for slaughter, processing or consumption food animals and plant foods with reduced contamination levels; (ii) reduce the potential for transfer of microorganisms to carcasses, meat, seafood, fruits or vegetables from live animals, water and the environment; (iii) apply safe and effective decontamination interventions, when approved, for reduction of microbial levels on carcasses or meat and vegetables; (iv) apply processes (e.g., heat, high pressure, irradiation, etc, when approved and useful) in order to reduce or eliminate, by killing, microbial contamination on processed or cooked products; (v) avoid or minimize cross-contamination at all stages of the food chain, from production, slaughter, processing, and preparation to consumption; and, (vi) apply antimicrobials and store products under low temperature and packaging conditions that inhibit growth of surviving microorganisms (Juneja and Sofos, 2002, 2009; Sofos, 1994, 2002, 2005; Sofos and Geornaras, 2010; Stopforth and Sofos, 2006). Additional efforts to control foodborne diseases involve proper food labelling, as well as adequate and proper education and training of food handlers and consumers (Koutsoumanis et al., 2006; Sofos, 2008). Proper design, validation, implementation, verification and documentation of such a common sense system should be through a food safety assurance management system, such as the hazard analysis critical control point (HACCP); this is the best available strategy for assurance of food safety, as well as quality.

It needs to be emphasized that the most important basic premise upon which pathogen control can be achieved is minimization of initial contamination levels in foods, which applies at all stages of the food chain. Minimization and reduction of initial levels of contamination in foods is the goal of effective cleaning as well as proper sanitation and good hygiene practices. Additional processes and interventions, including sanitization/decontamination technologies such as washing and treatment with hot water/steam, acids or other chemicals, may be applied, when allowed, as an extra insurance policy to reduce contamination incidence and levels in situations where the always necessary cleaning, sanitation and good hygiene practices may unintentionally or unknowingly fail. Maintenance of low contamination levels is desirable because its control by subsequent interventions is then easier.

In general, antimicrobial interventions or hurdles applied for pathogen control in foods include physical processes such as low and high temperature; non-thermal novel processing technologies including ionizing radiation (gamma and x rays, and electron beams), high hydrostatic pressure, pulsed electric fields, sonication, ultrasonic waves, ultraviolet light, pulsed UV-light and microwaves; packaging methods such as modified atmosphere packaging, including vacuum packaging, high oxygen, low oxygen, oxygen-free controlled atmosphere packaging, active packaging, smart packaging, coatings and antimicrobial edible films, etc. Physicochemical hurdles include acidity or low pH, low water activity, modified oxidation-reduction or redox potential (Eh), and application of chemical antimicrobial agents as food formulation ingredients or externally applied solutions or preparations. Biological interventions include introduction of starter cultures as microbial competitors (lactics) or as antimicrobial (bacteriocins such as nisin) preparations (Koutsoumanis et al., 2006). Currently in the USA, common interventions applied to reduce initial contamination levels on raw foods include water washing, thermal treatments such as blanching, hot water pasteurization and steam treatments, chemical treatments (organic acids, acidified sodium chlorite, etc), non-thermal treatments (irradiation, high pressure), and their combinations. A brief review of recent scientific literature indicated that numerous studies have evaluated chemical, physical, biological, nonthermal and combination treatments for pathogen reduction and control in fresh and processed meat products, and in fruits and vegetables with variable results (Sofos and Geornaras, 2010).

Potential reasons for occasional failures in the control of pathogens and for the emergence of new human health threats may include: (i) changes in animal and plant food production and harvesting; (ii) modernized product processing, marketing and distribution practices; (iii) globalization of the food industry and associated increased international trade and transportation of foods from exporting to importing countries; (iv) modern food preparation practices and development of new food products to meet consumer demands and expectations for minimally processed and convenient foods; (v) increased urbanization and the associated need for transportation of large amounts of food products from centralized production and processing factories to urban centers -- food products need a shelf life adequate for distribution, marketing and consumption in distant areas; (vi) increased travel which may enhance transfer of pathogens between countries; (vii) changing consumer demographics,

lifestyles, eating habits and increased life expectancy; (viii) higher numbers of consumers at-risk for infection; (ix) climate changes as well as associated natural stresses which may induce biological changes and lead to new or emerging pathogens that may be resistant to control interventions or more virulent; (x) advances in microbial detection methodologies; (xi) inadequate food-handler and consumer education and training in proper food handling; and (xii) increased interest, awareness and scrutiny of food safety issues by consumers, news media and activist groups (Sofos, 2008, 2009; Sofos and Geornaras, 2010). Another potential reason for failures in pathogen control may be the stress-adaptation and resistance development by pathogens (Samelis and Sofos, 2003).

In most situations (with the exception of foods that are frozen, dried, canned or acidified) control of pathogenic bacteria in foods is commonly achieved with application of more than one antimicrobial treatment (Leistner and Gould, 2002) in the form of multiple sequential or simultaneous hurdles (hurdle technology concept). Presently, selection of antimicrobial hurdles and implementation of the multiple hurdle approach is empirical and experience-based. However, foods and microbes are complex systems and it is difficult to select proper combinations and sequences of hurdles for synergistic antimicrobial effects against weak microbial cell targets, which would maximize antimicrobial effects and product safety. Furthermore, consumers expect and prefer an adequate food supply that is safe, of good quality, wholesome, nutritional, and economically affordable, as well as with no additives, convenient, and exposed to only minimal processing. However, when exposed to such conditions, foodborne pathogenic bacteria may be only stressed and become resistant to subsequent food related sublethal stresses such as acid, cold, heat, drying, anaerobiosis, decontamination interventions, sanitizers, etc. The phenomenon of stress-adaptation or selection of resistant cells, which may develop multiple resistances or cross-protection to other stresses, may contribute to failures in food preservation programs (Samelis and Sofos, 2003). Stress adapted pathogens may be more difficult to control, leading to failure of preservation systems. Therefore, knowledge is needed on mechanisms of action of antimicrobial hurdles as well as microbial cell functions, in order to optimize antimicrobial hurdle systems. Better knowledge of microbial regulatory processes and hurdle mechanisms will allow optimization of hurdle application through selection of proper hurdles which are used at the right intensities or concentrations, in effective combinations. Following the correct sequence and timing of application will avoid pathogen cell stress adaptation and resistance development. Instead, proper hurdle implementation will lead to microbial death through multiple cell injuries or metabolic exhaustion (Samelis and Sofos, 2003; Sofos, 2008).

Summarizing, the microbial quality and safety of foods that reach consumers, either as raw or processed products, depends, first, on the extent of exposure to contamination and its control during food production, processing, distribution, storage, retailing and preparation for consumption. For improved food safety, there is a need to: (i) maintain contamination levels in food as low as possible by minimizing access of microorganisms to products (live animal, carcasses, fruits, vegetables) and by reducing contamination on raw products, through decontamination, when permitted; (ii) inactivate microorganisms on products without cross-contamination; (iii) prevent or inhibit growth of microorganisms which have gained access to the meat and have not been inactivated; (iv) properly cook or prepare products for consumption; and, (v) avoid development of stress-hardened pathogens that may be more difficult to control and of higher virulence. New knowledge is needed in order to design effective multiple hurdle technologies without potential development of stress- adapted, resistant to control, and potentially more virulent pathogens.

REFERENCES

Doyle, M. P., and M.C. Erickson. 2006. Emerging microbiological food safety issues related to meat. Meat Science 74:98-112.

Juneja, V. K. and J. N. Sofos (Editors). 2001. Control of Foodborne Microorganisms. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. 535 pp.

Juneja, V.K. and J.N. Sofos (Editors). 2009. Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions. ASM Press, Washington, D.C., USA. 512 pp.

Koutsoumanis, K. P., I. Geornaras, and J. N. Sofos. 2006. Microbiology of land animals. In Handbook of Food Science, Technology and Engineering. Y. H. Hui, Editor, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. Vol. 1, chapter 52.1, pp. 52.1-52.43.

Leistner, L. and G. Gould. 2002. Hurdle Technologies. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.

Samelis, J. and J. N. Sofos. 2003. Strategies to control stress-adapted pathogens and provide safe foods. In Microbial Adaptation to Stress and Safety of New-Generation Foods. A. E. Yousef and V. K. Juneja, Editors. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, USA, pp. 303-351.

Sofos, J.N. 1994. Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. In Advances in Meat Research, vol. 9: Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products, A.M. Pearson and T.R. Dutson, Editors. Chapman and Hall, Glasgow, UK. pp. 353-403.

Sofos, J.N. 2002. Approaches to pre-harvest food safety assurance. In Food Safety Assurance and Veterinary Public Health; Volume 1, Food Safety Assurance in the Pre-Harvest Phase, F.J.M. Smulders and J.D. Collins, Editors. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. pp. 23-48.

Sofos, J.N (Editor). 2005. Improving the Safety of Fresh Meat. CRC/Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. 780 pp.

Sofos, J. N. 2008. Challenges to meat safety in the 21st century. Meat Science 78:3-13.

Sofos, J. N. 2009. ASAS Centennial Paper: Developments and future outlook for postslaughter food safety. Journal of Animal Science 87:2448-2457.

Sofos, J. N. and I. Geornaras. 2010. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of Escherichia coli O157:H7 in nonintact, and Listeria monocytogenes in ready-to-eat meat products. Meat Science 86:2-14.

Stopforth J.D. and J.N. Sofos. 2006. Recent advances in pre- and post-slaughter intervention strategies for control of meat contamination. In: Juneja V.J., Cherry J.P., Tunick M.H., editors. Advances in microbial food safety, ACS Symposium 931.Recent advances in intervention strategies to improve food safety. Washington, D.C.: American Chemical Society, Oxford University Press, UK. pp. 66-86.

C3 FOOD PRESERVATION: A MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC APPROACH

Prof. Dr. Frank Devlieghere & Andreja Rajkovic
Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation, Ghent University, part of Food2Know, Bélgica.
Frank.Devlieghere@UGent.be

Number of alternative methods and technologies rose up to replace historically proven heat treatments in attempt to satisfy modern trends in food consumption. These new trends were induced by the change in the consumers' perception of food quality and nutrition. The modern consumer seeks fresh looking, convenient and nutritionally healthy food. This requires from industry to adopt new strategies in safe food production, using sustainable methods with small carbon footprint. The main change in terms of microbial food preservation is that sterilization and intensive pasteurization as we knew them are in great extent replaced by mild heat treatments, high pressure processing, pulsed electric fields, intense light pulses, application of organic acids, chlorine dioxide, etc. The ability of these technologies, alone or in combination to inactivate microorganisms, is beneficial for the applications in heat sensitive foods and ingredients and for minimization of adverse effects on the sensory characteristics of food products.

Over the years, different studies have demonstrated the success and failures of mild processing technologies in the inactivation of initial microbial load in food. For many of these technologies the potential to produce high quality foods that are microbiologically safe within the extended shelf-life was demonstrated. Several studies have shown that most of the minimal processing techniques create sublethally injured cells. The consequences of this phenomenon are double: on one side growth of sublethally injured cells is often more easily inhibited by using other mild stresses, which should be used positively by the food industry for reaching acceptable shelf lives and safe products. On the other side, sublethally injured cells more easily become resistant towards the treatment that makes them sublethally injured. This negative aspect also has to be taken into consideration when mild processing is applied by the food industry.

Applications of molecular techniques and studies on intracellular level (microscopic techniques) are essential to provide more insight in the phenomena occurring during mild inactivation followed by storage under, for the microorganisms, stressing conditions. The threat of modified properties of surviving spoilage organisms or pathogens necessitates evaluation of the microorganisms under such circumstances, with special attention given to the effect of variability at single cell level for pathogens with low infective dose. However, macroscopic research (in combination with predictive microbiology) allowing prediction of the behavior of microbial populations during mild processing and subsequent storage is also essential as this provides more fastly essential information to the food industry considering the use of mild preservation techniques.

C4 APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA DE SISTEMAS MICROBIOLÓGICOS PARA GARANTIZAR LA INOCUIDAD ALIMENTARIA CON TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS

Prof. Dr. Pablo Fernández Escámez, Paula M. Periago Bayotas y Marina Muñoz.
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena.
pablo.fernandez@upct.es

INTRODUCCIÓN

La investigación en el ámbito de la biología de los sistemas microbiológicos está experimentando un rápido crecimiento en la actualidad. Se puede considerar una evolución de la revolución de las denominadas "omics" en biología (Brul et al., 2008). Dado que existen en la actualidad muchos índices de cómo funcionan los sistemas biológicos gracias a estas herramientas, el siguiente paso consiste en intentar explicar los sistemas propiamente dichos, para poder aplicarlos a distintos fines, como por ejemplo para garantizar la inocuidad alimentaria.

Los desarrollos que pueden influir en la seguridad alimentaria en el futuro pueden tener lugar a distintas escalas, desde nivel molecular a nivel global. Ello requiere también desarrollar nuevas metodologías para la evaluación del riesgo asociado, teniendo en cuenta el impacto de los distintos instrumentos de cambio (Havelaar et al., 2010). Entre ellos, la aplicación de tecnologías no térmicas puede suponer un cambio que afecte a la inocuidad de los alimentos procesados, por lo que el uso de un método adecuado para la evaluación del riesgo en los nuevos productos obtenidos es de gran importancia.

Como posibles tecnologías no térmicas se han estudiado ampliamente el uso de antimicrobianos naturales, que pueden suponer una alternativa a tratamientos térmicos severos, y las altas presiones hidrostáticas, consideradas como una de las tecnologías no térmicas más eficaces para la inactivación de células vegetativas de microorganismos, dado que se pueden conseguir reducciones de varios ciclos logarítmicos en la población de bacterias en condiciones de procesado de equipos comerciales. *Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno alimentario de gran importancia, por ser muy ubicuo y porque la listeriosis a que da lugar provoca síntomas graves en las personas afectadas. Por ello se utiliza a modo de ejemplo para ilustrar la aplicación de estos nuevos conceptos para la producción de alimentos seguros desde un punto de vista microbiológico.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Uso de la citometría de flujo para la detección de daño celular

Se ha utilizado la citrometría de flujo para verificar la actividad antimicrobiana y la presencia de daño celular en *L. monocytogenes* expuesta a aceite esencial de romero obtenido mediante extracción por fluidos supercríticos. Para ello se ha hecho crecer este microorganismo a 30ºC en caldo de cultivo, en ausencia o presencia de 0,1 mL/100 mL de este extracto. Se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6 y 8 h, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón PBS. Las células se tiñeron con iouduro de propidio y con SYTO 9 (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos), para diferenciar células muertas, dañadas y viables y se analizaron por citometría de flujo (Facscalibur, Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Bélgica).

Estudio de la inactivación y daño subletal de L. monocytogenes tratada por altas presiones hidrostáticas

L. monocytogenes crecida a 37ºC en caldo TSBEL y envasada en bolsas metálicas al vacío se expuso a tratamientos de 350, 400 y 450 MPa a 25ºC de temperatura en un equipo de alta presión hidrostática. Los supervivientes se enumeraron en ausencia o presencia de NaCl (1%) y se estudió su crecimiento mediante un Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia) a nivel de células individuales mediante diluciones seriadas. Los datos de crecimiento se modelizaron mediante el modelo de Baranyi y se obtuvieron las distribuciones de frecuencia que mejor describían los datos experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La citometría permite diferenciar las células de L. monocytogenes vivas, muertas y dañadas, con lo que se puede determinar la presencia de un 15% de células dañadas incluso después de 8 h de exposición al aceite esencial de romero (Muñoz et al., 2009). Esto pone de manifiesto la existencia de una proporción significativa de daño, lo que supone, dependiendo de que las bacterias se encuentren en unas condiciones que permitan su recuperación o no, un riesgo potencial en aquellos alimentos que permitan la proliferación de *L. monocytogenes*. Si, por el contrario, las condiciones son desfavorables, se podría considerar que el alimento va a ser seguro, por lo que es necesario determinar si la recuperación de las células dañadas es posible o no.

Las altas presiones hidrostáticas son una técnica de procesado no térmico que permiten la inactivación de formas vegetativas de microorganismos patógenos, tales como *L. monocytogenes*. No obstante, se ha descrito la existencia de una fracción de la población resistente a esta tecnología, incluso a elevadas presiones y tiempos de exposición prolongados. La presencia de NaCl en el medio de recuperación pone de manifiesto la existencia de una fracción de la población dañada, que puede ser capaz de recuperarse en condiciones idóneas, suponiendo un riesgo para la inocuidad de los alimentos procesados con esta tecnología.

El análisis probabilístico de las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* expuestas a alta presión hidrostática y recuperadas en presencia de NaCl y a distintos niveles de pH permite cuantificar el efecto del daño. La existencia de un elevado número de repeticiones permite ajustar distribuciones de frecuencia a los datos experimentales, que pueden utilizarse para realizar simulaciones y cuantificar el riesgo potencial de presencia y crecimiento de *L. monocytogenes* tras su exposición a unas condiciones de procesado y de recuperación en un alimento determinado. En base a ello, se puede establecer el nivel de inocuidad alimentaria asociado a un determinado producto para, en base a ello, seleccionar las condiciones de producción más adecuadas para satisfacer al consumidor, garantizando un nivel de seguridad adecuado en los productos.

La aplicación de la biología de los sistemas microbiológicos en el ámbito de la inocuidad alimentaria puede permitir la aplicación eficiente y segura de nuevos métodos de conservación, al conocer adecuadamente los mecanismos de resistencia y daño de los microorganismos tratados, con lo que se puede garantizar de forma apropiada su seguridad desde un punto de vista microbiológico (Havelaar, et al., 2010). El uso de unos u otros sistemas o técnicas dependerá de los mecanismos de inactivación, daño y recuperación implicados en cada caso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brul S., Mensonides F.I.C., Hellingwerf K.J., Teixeira M.J. 2008. Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol. 128, 16-21.

Havelaar A.H., Brul S., de Jong A., de Jong R., Zwietering M.H., ter Kuile B.H. 2010. Future challenges to microbial food safety. Int. J. Food Microbiol. 139, S79-S94.

Muñoz M., Guevara L., Palop A., Fernández P.S. 2009. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of Listeria monocytogenes in broth and food systems using flow cytometry. LWT-Food Sci. Technol. 42, 220-227.

C5 ESTRATEGIAS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE ORIGEN ALIMENTARIO POR PCR

Prof. Dra. Rosa Aznar.

Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València. Av. Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot. Valencia. Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimento (CSIC). Av. Agustín Escardino, 7. 46980 Paterna. Valencia.

rosa.aznar@uv.es

La PCR a tiempo real (qPCR) es la herramienta molecular más prometedora para la detección e identificación de patógenos en alimentos. Esta tecnología se basa en el empleo de fluorocromos que se unen al DNA amplificado lo que facilita la automatización del proceso, aumenta la sensibilidad de la detección, permite visualizar el resultado durante la amplificación, evitando contaminaciones cruzadas, y ofrece la posibilidad de cuantificar los microorganismos presentes en la muestra (McKillip & Drake, 2004). La propia naturaleza de la reacción lleva

implícita la especificidad, rapidez, sensibilidad y precisión en la detección del microorganismo diana. Además, utilizando sondas, ej. TaqMan, marcadas con diferentes fluorocromos, la qPCR permite la detección simultánea de dos o más patógenos mediante una única reacción de amplificación en la que se incluyen los distintos cebadores y sondas específicos "PCR múltiple". Respecto a su aplicación en alimentos, el primer paso para establecer un procedimiento de detección de patógenos por PCR es la selección del método de extracción de DNA. Dicho método ha de asegurar tanto la liberación de los ácidos nucleicos celulares como la eliminación de los inhibidores de la reacción, en un rango amplio de matrices alimentarias, y ha ser eficiente para los microorganismos que se pretende detectar. Se resumen a continuación los resultados de estudios sobre detección por qPCR en diversos patógenos alimentarios (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus, Aspergillus carbonarius*) cubriendo estos aspectos.

En cuanto a la extracción de DNA a partir de alimentos, la comparación de cuatro métodos comerciales de extracción de DNA, aplicados simultáneamente en cebolla, brócoli y pimiento verde inoculados con *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. o *Staphylococcus aureus*, demostró que el método DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) es el más eficiente para la extracción de DNA de estos cuatro patógenos alimentarios en las matrices vegetales ensayadas, permitiendo igual o mayor nivel de sensibilidad (en más de un orden logarítmico) que el resto de métodos en la mayoría de los casos, como se observa en la Tabla 1 (Elizaquível & Aznar, 2008a).

Tabla 1. Comparación de cuatro métodos rápidos de extracción DNA comerciales, en base al nivel de sensibilidad de detección por PCR, en tres productos vegetales frescos inoculados, en ensayos independientes, con cuatro patógenos alimentarios.

Métodos comparados	Sensitivity level scored			
	Más de un orden logarítmico mayor	Un orden logarítmico mayor	Igual	Inferior
DNeasy/Ultra	5[a]	5	2	-
PrepMan/Instagene	1	5	2	4
DNeasy/PrepMan	7	3	2	-
PrepMan/Ultra	2	3	2	5

[a]Número de casos en los que la sensibilidad del primer método fue mayor (uno o más de un órden logarítmico), igual, o más bajo que el segundo.

En el caso de detección de *Bacillus cereus* por qPCR, dado que se trata de un microorganismo formador de espora, se ensayaron varios tratamientos térmicos y la adición de germinadores, en diferentes combinaciones, para asegurar la liberación del DNA a partir de esporas (Figura 1). Cuando se ensayó en huevo líquido y leche en polvo infantil inoculados (10^0 – 10^5 esporas/ml) la extracción con DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), directamente y sin tratamiento previo, resultó satisfactoria llegando a detectar 4 esporas/reacción o 60 esporas/ml (Martínez et al., 2010a).

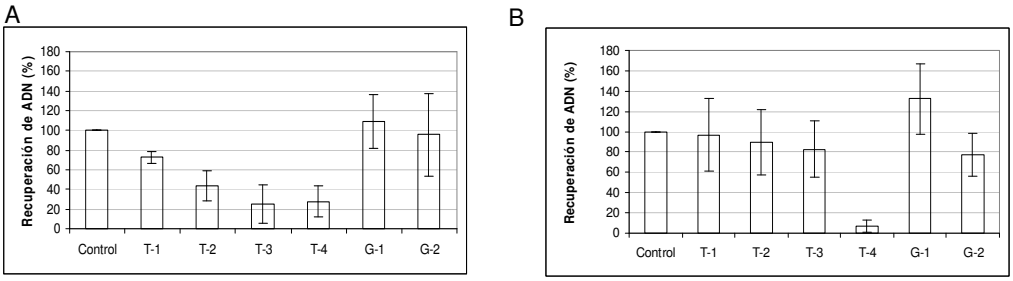


Figura 1. Eficiencia de los procedimientos de extracción de DNA estimada utilizando el kit "Quant-iT PicoGreen" (A) o qPCR con SYBR Green I (B). Control (kit DNeasy); T-1) 70 ºC, 30 min; T-2) 80 ºC, 10 min; T-3) 100 ºC, 10 min; T-4) 121 ºC, 20 min, G-1) 70 ºC, 30 min combinado with 0.5 mM de L-alanine e inosine y G-2) 80 ºC, 10 min combinado con 0.5 mM de L-alanine e inosine.

Como aproximación para el análisis de contaminación de ocratoxina A en uva, se desarrolló una reacción de qPCR específica para la especie *Aspergillus carbonarius* (Selma et al., 2009), principal responsable de la acumulación de esta toxina, y una qPCR doble para la detección simultánea de este especie y de los miembros del agregado *A. niger* que contribuyen en mayor medida a la producción de OTA (Selma et al., 2009). Para el análisis de uva se ensayó la utilización del equipo pulsifier, en el paso inicial de homogenización de la muestra, lo que favorece la liberación de los conidios de las uvas y previene la liberación de posibles inhibidores de la reacción de PCR. Combinado con el método comercial "EZNA Fungal DNA" la extracción de DNA de conidios a partir de uvas, se completa en sólo 30 min (Selma et al., 2008) llegándose a un nivel de detección de 10^2 conidios/ml (5 conidios/reacción).

Tabla 2. Cuantificación de *A. carbonarius* en uvas inoculadas a partir de las curvas estándar construidas con DNA y suspensiones de conidios.

Conidios inoculados (conidios mL^{-1})	SYBR-Green I			TaqMan		
	Positivos / Total reacciones	Cuantificación a partir de curvas estándar (conidios mL^{-1}) [a]		Positivos / total reacciones	Cuantificación a partir de curvas estándar (conidios mL^{-1}) [a]	
		DNA	Conidia		DNA	Conidia
1×10^5	9/9	$4.8\ (0.3) \times 10^4$	$9.9\ (0.1) \times 10^4$	9/9	$3.7\ (0.3) \times 10^4$	$1.0\ (0.2) \times 10^5$
1×10^4	9/9	$4.5\ (0.4) \times 10^3$	$9.7\ (0.2) \times 10^3$	9/9	$3.5\ (0.3) \times 10^3$	$9.2\ (0.3) \times 10^3$
1×10^3	9/9	$2.4\ (0.2) \times 10^2$	$3.0\ (0.1) \times 10^2$	6/9	$8.8\ (0.2) \times 10^2$	$1.0\ (0.2) \times 10^3$
1×10^2 [b]	9/9	$3.0\ (0.1) \times 10$	$3.0\ (0.1) \times 10$	0/9	-	-

[a] Los datos representan la media de 3 experimentos independientes, cada uno con muestras triplicadas. Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar para $P \leq 0.05$.

[b] Corresponde a 5 conidios por reacción.

Una vez optimizado el proceso de extracción de DNA a partir de la muestra de alimento, y aunque por PCR podemos detectar una sola célula, el máximo nivel real de sensibilidad que se consigue por qPCR es de 10 ufc/reacción (10^2 ufc/g). Esta limitación se debe al pequeño volumen de DNA de la muestra que se somete a análisis en la reacción de amplificación (1-5 µl). Cuando el análisis requiere demostrar la ausencia del patógeno en 25 g, el nivel de sensibilidad se puede aumentar hasta 1 ufc/25 g, introduciendo un paso de enriquecimiento de unas pocas horas. Pero también existen otras alternativas para aumentar el número de células de partida, sin perder la capacidad de cuantificación de la reacción de qPCR, como la concentración por métodos físicos ej. centrifugación o filtración, o inmunológicos. El alto contenido en sólidos y la viscosidad, típicos de los homogenizados de muestras de alimentos, dificultan el procesamiento de volúmenes suficientemente grandes para conseguir el nivel de detección. En este sentido, se ha descrito recientemente un método de filtración en tres etapas con el que se consigue en 15 min. la recuperación cuantitativa de *E. coli* O157:H7, a niveles por debajo de 1 ufc/g, a partir del homogenizado de 10 g de carne picada (Brewster, 2009). Por su parte, las técnicas de separación inmunomagnética, en sus diferentes formatos, constituyen la alternativa más habitual para la recuperación selectiva de patógenos y, en combinación con la PCR, han allanado el camino para la detección rápida y sensible de patógenos alimentarios (Nugen & Baeumner, 2008).

Con el fin de evaluar la qPCR como técnica diagnóstico para detección de patógenos en alimentos, abordamos la detección cuantitativa de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en un total de 306 muestras de alimentos de contaminación natural (fundamentalmente ensaladas, vegetales, especias, carnes de ave y pescados). Dichas muestras se analizaron por qPCR directamente y, en paralelo, tras un paso de enriquecimiento, por PCR convencional y mini-VIDAS (método estándar reconocido AOAC). La aplicación directa de la qPCR permitió la cuantificación en el 67 % de las muestras, revelando que *Salmonella, E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* se encontraban en niveles entre 10^2 y 10^4 ufc/g, en la mayoría de alimentos (Tabla 3). Las muestras restantes (33%) fueron positivas tras el paso de enriquecimiento, lo que indica que dichos patógenos se encontraban en niveles inferiores a 10 ufc/g. En este mismo estudio se compararon los resultados de detección directa por qPCR con los obtenidos para estos patógenos por mini-VIDAS y, a pesar de la limitación de la qPCR en cuanto al pequeño volumen analizado, se determinó una especificidad similar para ambos procedimientos, mientras que la qPCR como técnica de diagnóstico se comporta mejor en cuanto a "sensibilidad" y "seguridad" (Elizaquível et al., 2010).

Tabla 3. Valores de cuantificación para los tres patógenos in muestras de alimentos de contaminación natural obtenidos por interpolación en las curvas estándard de DNA (A) y suspensiones celulares (B).

Cuantificación	*E. coli* O157:H7 (22)[a]		*L. monocytogenes* (22)		*Salmonella* spp. (35)	
	A[c]	B[d]	A[c]	B[d]	A[c]	B[d]
<10[b]	9 (41 %)	9 (41 %)	6 (27 %)	6 (27 %)	8 (23 %)	8 (23 %)
10	4 (18 %)	-	8 (36 %)	-	6 (17 %)	6 (17 %)
10^2	3 (14 %)	4 (18 %)	7 (32 %)	7 (32 %)	5 (15 %)	5 (15 %)
10^3	4 (18 %)	3 (14 %)	1 (5 %)	8 (36 %)	12 (34 %)	8 (23 %)
10^4	2 (9 %)	4 (18 %)	-	1 (5 %)	4 (11 %)	8 (23 %)
10^5	-	2 (9 %)	-	-	-	-

[a]Número de muestras analizadas por qPCR

[b]Muestras que fueron positivas por PCR convencional tras enriquecimiento y negativas por qPCR directa

[c]Equivalentes genómicos/g

[d]Células/g

La detección simultánea de varios patógenos por qPCR múltiple requiere de una optimización exhaustiva de las condiciones de reacción para garantizar el correcto funcionamiento tanto de los cebadores como de las sondas. Para la puesta apunto de dicha reacción, la utilización del sistema en modo SYBR Green permite realizar el análisis de la curva de disociación, determinando por un lado la presencia de los amplicones esperados (en base al valor de T_m) y, por otro, la ausencia de productos de amplificación inespecíficos ej. dímeros de cebadores. En la Figura 2, se muestra el análisis de la curva de disociación para dos reacciones de qPCR desarrolladas por el grupo de investigación: A) doble para el agregado *A. niger* y *A. carbonarius* y B) múltiple para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus*. En ambos casos se observa la presencia únicamente de los picos cuya T_m corresponde a los productos de amplificación esperados.

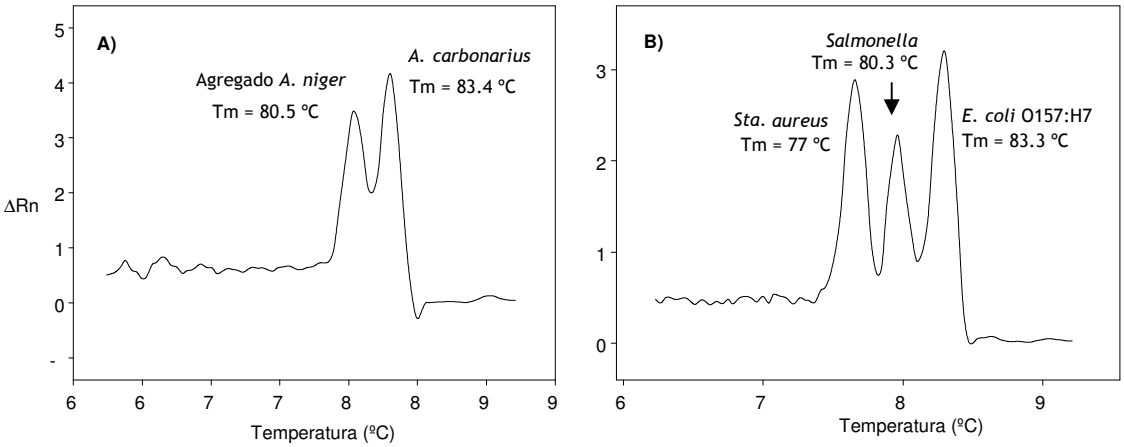


Figura 2. Curvas de disociación correspondientes a los amplicones generados mediante reacción de qPCR múltiple con SYBR Green I en las que se muestran los picos y los valores de T_m de A) *A. carbonarius* y agregado *A. niger* y B) *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus*.

La sensibilidad de la reacción de qPCR múltiple con respecto a la simple, se mantiene o disminuye ligeramente (Tabla 4). En la qPCR múltiple para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Sta. aureus* aunque la reacción simple presentó señal en el nivel más bajo (1 equivalente genómico/reacción) para los tres patógenos, los valores de C_T fueron próximos a 40 (negativo) por lo que consideramos como límite de detección 10 eg/reacción. Mediante ensayos en vegetales (espinacas y lechuga "Little Gem") inoculados con los tres patógenos, en diferentes proporciones, se observó que el patógeno presente en 10^3 ufc/g no se detecta si alguno de los otros se encuentra en 10^6 ufc/g. Cuando se inocularon en cantidades similares se determinó una sensibilidad de 10^3 ufc/g para cada uno de los tres patógenos. Tras un paso enriquecimiento de tan sólo 6 horas, mediante la qPCR múltiple se consigue la detección de hasta 1 célula de cada uno de los patógenos en 25 g (Elizaquível & Aznar, 2008b).

Tabla 4. Comparación de los valores de C_T obtenidos por qPCR simple (S) y múltiple (M) utilizando como molde para la reacción de amplificación DNA purificado de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *Sta. aureus* CECT 86^T y *S. enteritidis* ssp. *enteritidis* CECT 915^T cubriendo un rango entre 10^4 y 1 equivalentes genómicos/reacción.

		Equivalentes genómicos/reacción[a]				
		10^4	10^3	10^2	10	1
E. coli O157:H7	S	24.55±2.55[b]	32.04±2.24	32.62±1.99	35.02±0.8	39.2±1.9
	M	27.96±0.03	31.02±0.56	33.74±2.52	35.72±1.9	40±0[c]
Sta. Aureus	S	25.05±1.23	28.88±1.48	32.27±1.47	35.19±1.63	38.3±1.2
	M	25.02±0.74	28.96±0.41	32.02±0.24	34.64±0.77	40±0
S. enteritidis ssp. *Enteritidis*	S	21.59±1.59	25.11±1.58	28.47±2.46	32.19±0.81	38.9±2.6
	M	25.95±0.21	30.78±0.66	35.19±2.31	37.33±1.69	40±0

[a]Equivalentes genómicos calculados asumiendo que 1 ng de DNA de *E. coli* O157:H7 CECT 4267, *Sta. aureus* CECT 86^T y *S. enteritidis* ssp. *enteritidis* CECT 915^T equivale a $2x10^5$, $6x10^5$ y $1.7x10^5$ veces el genoma entero de cada cepa, respectivamente (http://wit.integratedgenomics.com/).

[b] Valores de C_T (media ± SD) correspondientes a tres replicados.

[c] $C_T \geq 40$, sin amplificación.

Así mismo, en el caso de la qPCR doble para la detección de los miembros del agregado *A. niger* y *A. carbonarius* (Selma et al., 2009) en muestras de uva inoculadas artificialmente, se estableció el límite de cuantificación en 10^3 conidios. Tanto la reacción simple como la doble detectan 30 genomas/reacción mientras que la simple llega a detectar 3 equivalentes genómicos/reacción.

Otra ventaja de la PCR, en comparación con los métodos clásicos basados en el cultivo, es la detección de formas viables no cultivables cuya presencia es frecuente en alimentos que han sido sometidos a procesos tecnológicos de higienización o conservación. Sin embargo, también las formas no viables son detectadas, lo que puede llevar a la sobreestimación del número de células vivas. La estrategia más utilizada para evitar dicha sobreestimación se basa en la detección del RNA como indicador del metabolismo bacteriano activo. Así pues las técnicas de retrotranscripción RT-PCR (McKillip & Drake, 2000) y "Nucleic Acid Sequence Amplification" NASBA (Cook, 2003) han sido utilizadas como aproximación para resolver este inconveniente. En este aspecto, para *B. cereus* hemos desarrollado un procedimiento para cuantificación de células viables, basado en la amplificación del RNA por RT-qPCR. Tras la optimización del proceso de extracción de RNA y del tratamiento con DNAsa, se consigue un límite de detección de 30 ufc/reacción con una eficiencia de 0,88, es decir un orden logarítmico inferior respecto a la qPCR, mientras que en su aplicación en huevo líquido inoculado el límite de detección es de 850 ufc/reacción o 1.1 x 10^4 ufc/ml de alimento, sin un paso de enriquecimiento (Martínez et al. 2010b). Además, la manipulación del RNA implica complicaciones técnicas que dificultan el análisis. Actualmente se están ensayando otras alternativas entre las que está la utilización de moléculas que se unen al DNA, i.e. la monoazida de etidio

(EMA) o propidio (PMA), como pretratamiento de la muestra antes de la PCR. Ambos se intercalan en el DNA tras un proceso de fotolisis utilizando luz visible lo que impide su amplificación por PCR (Nocker & Camper, 2006; Pan & Breidt, 2007). Este tratamiento puede combinarse con la qPCR para la detección cuantitativa de células viables como se ha demostrado recientemente en *Legionella* (Chang, et al., Appl Environ Microbiol 75:147-53, 2009).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brewster, J.D. (2009) Large-volume filtration for recovery and concentration of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.* 17: 242-256.

Cook, N. (2003) The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J Microbiol Methods* 53:165-174.

Elizaquível, P. & Aznar, R. (2008a) Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes, Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. *J. Food Prot.* 71: 2110-2114.

Elizaquível, P. & Aznar, R. (2008b) Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. by multiplex real-time PCR on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiol.* 25: 705-713.

Elizaquível, P., Gabaldón, J.A. & Aznar, R. (2010) Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of Real Time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food Control.* doi:10.1016/j.foodcont.2010.05.018

Martínez-Blanch, J. F., Sánchez, G., Garay, E. & Aznar, R. (2010a) Evaluation of a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of *Bacillus cereus* group spores in food. *J. Food Prot.* En prensa.

Martínez-Blanch, J. F., Sánchez, G., Garay, E. & Aznar, R. (2010b) Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* in food by RT-qPCR. *Food Microbiol.* (En revisión)

McKillip, J.L., Drake, M., (2004) Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J. Food Prot.* 67: 823–832.

McKillip, J.L., & Drake, M (2000) Molecular Beacon Polymerase Chain Reaction Detection of Escherichia coli O157:H7 in Milk. *J. Food Protect.* 63: 855-859.

Nocker, A., Camper, A.K. (2006). Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1997-2004.

Nugen, S.R. & Baeumner, A.J. (2008) Trends and opportunities in food pathogen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 451-454.

Pan, Y., Breidt, F. (2007) Enumeration of viable Listeria monocytogenes cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells *Appl. Environ. Microbiol.* 73:8028-8031.

Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V. & Aznar, R. (2008) Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 122-134.

Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V., Elizaquível, P. & Aznar, R. (2009) Simultaneous detection of ochratoxin A producing species by multiplex real-time PCR on wine grapes. *Food Addit. Cont.* 26, 180-188.

C6 TAXONOMÍA PROCARIOTA: UNA DISCIPLINA NECESARIA Y PRAGMÁTICA

Dra. Maria del Carmen Macián Rovira

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Edificio de Investigación. Universitat de València. E-46100 Burjassot, Valencia. m.carmen.macian@uv.es

La taxonomía procariota estudia la clasificación, la identificación y la nomenclatura de los procariotas. De estas tres disciplinas solo la nomenclatura está reglamentada en la taxonomía procariota.

Como establece el Código Bacteriológico, las cepas tipo son las cepas que formalmente quedan ligadas a los nombres de las especies (y subespecies) procariotas. Desde el año 2005 y siguiendo las normas del *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (1), las cepas tipo de las especies procariotas cultivables deben ser depositadas en al menos dos Colecciones de Cultivo (CCs) públicas de países diferentes, y estar accesibles antes de su publicación efectiva en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. La finalidad de esta duplicidad es en primer lugar, garantizar la conservación de la cepa a largo plazo y en segundo lugar, ampliar la accesibilidad de la cepa a un número mayor de usuarios potenciales.

Las CCs mantienen entre sus fondos no solo cepas tipo sino también otras cepas de referencia con interés aplicado a distintas áreas de la Microbiología. Recientemente, las CCs han constatado un aumento considerable de depósitos públicos de cepas microbianas cuyo interés no es meramente taxonómico, pero cuya disponibilidad pública es requerida cada vez más por los editores de revistas de Microbiología de ámbito internacional. Este incremento en el número de depósitos supone un reto para las CCs puesto que se aumenta la carga de trabajo con el consiguiente gasto económico tanto en personal como en material. Pero además, se amplía la diversidad metabólica y filogenética de los microorganismos que se conservan en la CC con el correspondiente incremento de dificultad en los procesos de crecimiento y conservación, generando la necesidad de aumentar la experiencia de su personal.

IMPORTANCIA DE LOS RECURSOS BIOLÓGICOS PARA LA I+D+I

La demanda de material biológico auténtico y fiable, junto a toda la información asociada al mismo, ha sufrido un aumento espectacular durante los últimos años en paralelo al desarrollo científico y biotecnológico.

La investigación científica requiere reproducibilidad y eso implica que el experimento llevado a cabo en un laboratorio debe poderse repetir en otro. Para ello es de vital importancia utilizar material de la mejor calidad; y eso incluye no solo material químico de alta pureza y equipos de alta precisión, sino también material microbiológico de referencia.

En el caso de los microorganismos, son las CCs las infraestructuras encargadas del mantenimiento del material biológico junto con la información relacionada a dicho material. Las CCs microbianas públicas son los depositarios y proveedores profesionales de una gran variedad de cepas microbianas con aplicación científica, industrial,

agroalimentaria y médica, entre otras, permitiendo el acceso sostenible a los recursos microbianos. En la actualidad, la mayoría de CCs están evolucionando a Centros de Recursos Biológicos (BRCs), siguiendo las directrices de la OECD (2). Los BRCs proporcionan una infraestructura esencial para las ciencias de la vida y la biotecnología, manteniendo y haciendo accesibles recursos biológicos conocidos, validados e identificados con precisión junto a los datos asociados a dichos recursos.

Las cepas de colección, o cepas de referencia son microorganismos definidos a nivel de género y especie, depositados y mantenidos en una CC o BRC y catalogados con el acrónimo de la CC/BRC seguido de un número identificativo. En dicho catálogo se reseña el origen de la cepa, sus condiciones de cultivo, sus equivalencias en otras colecciones y, en muchas ocasiones, algunas de sus características. La ventaja de trabajar con cepas de referencia es la trazabilidad de las mismas, y la seguridad de que han sido manipuladas por personal cualificado.

METODOLOGÍA

La aplicación de los avances metodológicos en taxonomía bacteriana se ha impuesto durante los últimos años en las CCs. Originalmente, las CCs únicamente actuaban de depositarias de las cepas, conservándolas a largo plazo. Desde hace más de una década, las CCs a la vanguardia en el panorama mundial han ido incorporando a sus procedimientos las técnicas moleculares más novedosas para la caracterización y autentificación de sus cepas. Entre las técnicas más ampliamente utilizadas están la secuenciación y posterior análisis del gen 16S rRNA, la composición relativa de proteínas celulares obtenidas mediante MALDI-TOF, la composición relativa de los ácidos grasos celulares (MIDI-Sherlock Microbial Identification System), el análisis del polimorfismo del DNA mediante AFLP, etc. La aplicación de estas técnicas supone un valor añadido a las cepas conservadas en las CCs puesto que aseguran el suministro de material autentificado.

Con la aplicación de estas técnicas de control se ha puesto en evidencia la existencia de cepas erróneamente identificadas entre las depositadas en las CCs. En tales casos, la decisión adoptada por la CC puede ir desde el cambio de nombre de la cepa, que queda perfectamente reflejado en su ficha de catálogo, hasta la eliminación de la cepa del catálogo, con el consiguiente malestar del usuario. El límite entre ambas decisiones lo marca la evidencia que se tenga acerca de si el material preservado deriva o no del original y si responde a lo que describe.

Desde el año 2004 la CECT únicamente suministra cepas que han pasado controles no solo de viabilidad sino también de autenticidad. Entre las técnicas empleadas para la realización de esos controles, la secuenciación y análisis de la secuencia parcial del 16S rRNA se viene utilizando desde el año 2002 en el control de los nuevos depósitos públicos así como en el control de los nuevos lotes de reposición. Además, desde el año 2003 la secuenciación y análisis del 16S rRNA se ofrece como uno de los servicios de identificación de procariotas. Durante el último año se ha utilizado el sistema MIDI de análisis de ácidos grasos celulares mediante cromatografía de gases, para el control de la colección de bacterias lácticas y otros géneros depositados en la CECT. Recientemente se ha ofrecido como servicio público para la caracterización e identificación de cepas bacterianas. Además, la CECT, dentro del proyecto EMbaRC financiado por el FP7 y en el que participa junto a otras 9 CCs europeas, ha puesto a punto el método de MALDI-TOF para el análisis de proteínas celulares con el que se están obteniendo muy buenos resultados en los ensayos interlaboratorio. En breve, está previsto ofrecerlo en nuestra web como un nuevo método de caracterización (identificación) de microorganismos.

CLAVES PARA ENTENDER MEJOR LA TAXONOMÍA

Como consecuencia de los grandes avances en taxonomía microbiana que se han producido en las dos últimas décadas, se ha modificado sustancialmente el esquema de clasificación de los microorganismos. Los cambios en la clasificación también originan cambios en nomenclatura. Obviamente, las CCs adoptan dichos cambios en sus catálogos, generando en ocasiones confusión entre los usuarios.

En internet existen portales fiables y gestionados por expertos que pueden ayudarnos a entender cualquiera de estos cambios; entre ellos se deben citar LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura (3), Bacterial Nomenclature Up-to-Date (4), y TOBA - Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea (5). Pero además existe la opción de contactar con expertos en las CCs, pues entre sus servicios se incluye el asesoramiento en temas relacionados con la taxonomía de los microorganismos que conserva.

En cualquier caso, es importante entender que el cambio de denominación (de especie o incluso de género) de los microorganismos depositados en una CC no supone que hayan dejado de ser lo que originalmente eran, ni que hayan perdido sus propiedades y caracteres que los hacía útiles para un determinado ensayo. Una vez más se pone en evidencia como la taxonomía influye en el quehacer de los microbiólogos, pues si bien el interés de la mayoría de microbiólogos en la nomenclatura bacteriana es escaso, sí hay un reconocimiento general en Microbiología de que el hecho de utilizar el mismo nombre para un microorganismo es esencial para la comunicación de los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Saddler (G.S.): International Committee on Systematics of Prokaryotes, Xth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 28 and 30 July 2002, Paris, France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2005, 55, 533-537.

http://www.oecd.org/dataoecd/7/13/38777417.pdf

http://www.bacterio.cict.fr/

http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14

http://www.taxonomicoutline.org/

C7 ECOLOGÍA MICROBIANA: UNA NUEVA PERSPECTIVA PARA COMPRENDER LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Prof. Dr. Jesús Garcia–Gil
Departamento de Biología. Universidad de Gerona. Campus Montilivi, 17071 Gerona.
jesus.garcia@udg.es

La Ecología Microbiana es la parte de la Microbiología que estudia a las bacterias de forma colectiva (poblaciones y comunidades) incluyendo las relaciones de éstas con el medio físico que las sustenta y las interacciones existentes entre ellas. La producción de determinados alimentos, su conservación y su deterioro son ejemplos constantes de la actividad de una amplia diversidad de bacterias cuyo conocimiento dista mucho de ser completo. Durante muchas décadas, el acceso a la composición real de los ecosistemas microbianos se ha visto limitado –y sesgado– paradójicamente, por la propia técnica microbiológica. Los métodos tradicionales de cultivo y recuento no han permitido conocer, siquiera aproximadamente, la diversidad y composición real de la microbiota presente en un hábitat determinado. En los últimos años, las técnicas de Biología Molecular, sobre todo las relacionadas con el análisis del ácido desoxirribonucleico, han irrumpido con fuerza también en la Microbiología, a pesar de que muchas de las que todavía están vigentes en Microbiología han permanecido invariables durante más de un siglo. Así, el cultivo en placa y el uso del agar-agar como soporte son todavía métodos perfectamente establecidos y adecuados para el estudio de determinadas bacterias.

De todas las disciplinas en que puede dividirse la Microbiología, la Ecología Microbiana es quizás la que ha experimentado un salto cualitativo más espectacular en las 2 últimas décadas. Sin duda, las técnicas moleculares han dotado a la Ecología Microbiana de una herramienta potente que permite una aproximación más real a las comunidades microbianas que se encuentran en un hábitat determinado. Ello no solamente ha servido para descubrir linajes filogenéticos insospechados hasta hace bien poco, sino también para conocer mejor qué grupos de bacterias están asociadas a cada hábitat concreto.

La relación entre la Ecología Microbiana y los alimentos es más intensa de lo que podríamos pensar. Por un lado, las sucesiones bacterianas permiten conseguir unos procesos de producción adecuados y ajustados a los parámetros comerciales y sensoriales. Por otro lado, la intervención en la microbiota presente en los alimentos permite controlar su conservación y por tanto su deterioro y evitar el establecimiento de patógenos. Los alimentos, por su naturaleza orgánica, constituyen un excelente sustrato para el desarrollo de sucesiones bacterianas y por tanto para un potencial ecosistema. Además de las sucesiones bacterianas, dirigidas o no, que se establecen en las matrices alimentarias, existen bacterias oportunistas colonizadoras cuya presencia suele ser indeseada e ir acompañada de problemas. Estas bacterias suelen caracterizarse por poseer requerimientos nutricionales poco complejos y elevadas tasas de crecimiento en condiciones óptimas, y entre ellas se hallan muchas de las patógenas que hoy en día amenazan a la salud pública.

Con esta visión ecológica de la Microbiología de los Alimentos, debemos plantearnos algunas preguntas cuya respuesta puede ayudar a gestionar la relación entre los alimentos y las bacterias. ¿Es una quimera mantener alejados a las bacterias patógenas de los alimentos crudos, considerando que éstos ofrecen un ecosistema por explotar? ¿Hasta qué punto es dirigible una sucesión bacteriana? ¿Cómo podemos conseguir las poblaciones bacterianas deseadas tras un largo proceso de transformación? ¿Las cepas que transforman ciertos alimentos son las que se inocularon al principio?

En la actualidad hay muy pocos trabajos científicos que conjuguen la Ecología Microbiana y la Microbiología de los Alimentos, siendo ésta última el resultado de años, sino siglos, de un trabajo en muchos casos eminentemente empírico. Una razón que quizás explique esta falta de entendimiento es que simplemente no se necesitan: lo cierto es que la metodología clásica ha funcionado perfectamente y los métodos de identificación, aunque en ocasiones tediosos, son bastante inequívocos.

No obstante la apertura de nuevos horizontes en la producción de alimentos, en particular los de última generación, pasa necesariamente porque estas dos ramas de la Microbiología entren en contacto. Conocer a las comunidades bacterianas y comprender su implicación en los procesos de transformación de los alimentos puede ser, sin lugar a dudas, de gran interés para la industria alimentaria. En este sentido, la Ecología Microbiana y la Microbiología de los Alimentos deben ir de la mano para conocer mejor los factores que determinan la presencia de determinadas bacterias y por consiguiente aprender a incidir mejor sobre las microbiotas presentes en los distintos alimentos.

C8 MOLECULAR DETECTION AND TYPING FACILITATING THE ELUCIDATION OF A RECENT AUSTRIAN EPISODE OF LISTERIOSIS

Prof. Dr. Martin Wagner and Dagmar Schoder
Institute for Milk Hygiene, Milk Technology and Food Science, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, Veterinaerplatz 1, 1210 Vienna
Martin.Wagner@vu-wien.ac.at

Listeria monocytogenes is widely present in nature and may be found in soil, cultivated and uncultivated fields, forests, and in sewage and aquatic environments. Carriage and fecal shedding of *L. monocytogenes* has also been described in

a variety of animal species as well as in humans. Although known as a pathogen for decades, listeriosis has been given resurgent interest due to an increase in clinical cases that was observed almost throughout Europe from 2002-2006 (Allerberger and Wagner, 2010)

Although *L. monocytogenes* may be present in raw food stuffs of different origin, raw materials are not the major drivers of post processing contamination scenarios. Contaminated processing environments have been shown to play a pivotal role in Listeria transmission (Pappelbaum et al., 2008). Due to its physiological characteristics, such as resistance to acidic and sodium chloride stress, ability to grow at low temperature and possibility to form biofilms, *L. monocytogenes* can adapt and persist in food processing environments for several years (Wagner et al., 1996). From unsanitized niches, a clone may be transmitted into other parts of the processing environment, therefore constituting a permanent risk of contamination to the food under processing. Therefore substantial attention has been given in the recent years to understand the ability of *L. monocytogenes* to survive in food processing plants.

As a result of an outbreak investigation on a cluster of 33 cases of listeriosis, with 8 fatalities mainly occurring in elderly, sour milk cheese was suspected to be the most likely source of infection (Fretz et al., 2010). Although first evidence was brought up by consultations of the diseased consumers, epidemiological investigations by molecular typing confirmed the initial suspect. The "Quargel" acid-cured cheese, which was distributed in Austria, Germany, the Czech Republic, Poland and Slovakia, was recalled January 23, 2010. The plant immediately ceased production, pending completion of an investigation into the origin of the contamination. The company further launched a recall action from Austrian and German supermarket chains and cheese samples of each of the recalled lots were brought to the Institute for Milk Hygiene, Milk Technology and Food Science (IMMF) for further testing. All lots of sour milk cheese were investigated by challenge tests (storage at 4°C, 15°C, 22°C). The lots were tested after delivery, at the end of shelflife (that is up to 50 days post production), and to mimick a worst case scenario, at timepoints exceeding the shelflife unless the sensorical properties remain unchanged. The tests were performed with molecular and cultural methods (ISO 11290:1&2) whereas a newly nucleic-acid based rapid method for the direct quantification of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs was used the first time on a real-time contamination scenario (Rossmanith et al., 2007; Mayrl et al., 2009; Mester et al., 2010). This method solubilizes the matrix and uses physical methods to harvest bacterial organisms for the subsequent quantification by real-time PCR. We have developed a hierarchy of solubilization procedures (buffers 1-3) that either are very cheap, or alternatively, allow the subsequent isolation of viable organisms.

Each cheese lot was positive qualitatively at each timepoint and, with exceeding times of storage, *L. monocytogenes* multiplied dramatically. The highest value found was $2.8x10^8$ colony forming units (CFU) per gram of cheese what somehow equals with $2.2x10^6$ CFU per gram in cheese that was drawn at retailer premises and from the consumer sphere by national food authorities. Both the culture method and the molecular methods (based on buffers 1-3) performed comparably with very minor und insignficant deviations. These data show the massive contamination of the acid cured cheese in the incriminated food plant and supports the assumption that a single vector, most likely smear, has played a major role in transmitting the contamination throughout the lots.

Recognizing that the environment provides a substantial reservoir of *L. monocytogenes*, our further endeavour was to identify the specific source of the outbreak clone that triggered the initial contamination of the plant. Detailed analysis of self control data suggested a plant reconstruction phase in the beginning of 2009 as a moment where the contamination could have been introduced from outside into the processing environment. To highlight the role of biotic vectors in the transmission of *L. monocytogenes* we determined the distribution patterns of *L. monocytogenes* in insects within the cheese making plant. Several environmental swab samples including insect traps taken during a previous February – March inspection period yielded *L. monocytogenes*. Molecular typing revealed that the same clone of Listeria that was present in insects was present in the smear, the product and the patients.

Taking all together the Austrian episode of listeriosis has taught that molecular tools are valueable in speeding up investigative actions, thus supporting targeted responses to contamination scenarios. Preferentially these methods should be capable of providing quantitative results rather than qualitative. Molecular typing tools were indispensable for elucidating the transmission chains. By applying both, we could therefore demonstrate the extent of the contamination scenario both in the plant environment and in the recalled product, and we could show for the first time that insects have been drivers of a dramatic outbreak of foodborne listeriosis.

REFERENCES

Allerberger F and Wagner M (2010) Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin. Microbiol. Infect. 16(1), 16-23.

Fretz R, Pichler J, Sagel U, Much P, Ruppitsch W, Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Appl G, Werber D, Stark K, Prager R, Flieger A, Karpísková R, Pfaff G, Allerberger F. (2010) Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010.Euro Surveill. 15 pii: 19543.

Mayrl E, Barbara Roeder B, Mester P, Wagner M, Rossmanith P (2009) Broad range evaluation of the matrix solubilization (matrix lysis) strategy for direct enumeration of food-borne pathogens by nucleic acids technologies. J Food Prot. 72(6), 1225-1233.

Mester P, Wagner M, Rossmanith P (2010) Ionic Liquids: a new tool in sample preparation closing the gap between rapid molecular biological and growth dependent quantification methods in bacterial pathogen diagnostics. J Food Prot. 73, 680-687.

Pappelbaum K, Grif K, Würzner R, Hein I, Ellerbroek L, Wagner M. (2008) Contamination chains of *Listeria monocytogenes* in a produce processing plant. J Food Prot. 71, 735-741.

Wagner M, Maderner A, Brandl E (1996) Random Amplification of Polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria* contamination in a Cheese plant. J. Food Prot. 59 (4), 384-389.

C9 EL TRACTO GRASTROINTESTINAL COMO FUENTE DE MICROORGANISMOS FUNCIONALES

Dr. Baltasar Mayo y Susana Delgado
Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Carretera de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias.
baltasar.mayo@ipla.csic.es

INTRODUCCIÓN

Los probióticos se definen como "microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del consumidor" (FAO/WHO, 2002). Entre los beneficios que aportan podemos citar entre otros la reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa, la mejora del estreñimiento, la reducción y una mejor recuperación en las infecciones por rotavirus y otros patógenos intestinales, la estimulación del sistema inmune y el alivio sintomático de patologías intestinales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Ouwehand y col., 2002). Aunque no hay un criterio único, existe un consenso sobre las características deseables que deben poseer los microorganismos probióticos, así como otras de las que deben carecer (Dunne y col., 2001; Mattila-Sanholm y col., 2002). Entre las propiedades más importantes cabe destacar aquéllas relacionadas con la viabilidad y supervivencia de los microorganismos tras la ingesta, como la resistencia a la acidez estomacal, a los jugos gástrico y pancreático y a las sales biliares. Sin estos requisitos los microorganismos no alcanzarán vivos las posiciones más distales del tracto gastrointestinal en las que han de actuar. La importancia de que las cepas probióticas provengan del hospedador y el nicho ecológico en el que se van a utilizar es también de primordial importancia, puesto que se supone que hay determinadas interacciones especie y nicho específicas.

Las características probióticas no son propiedades generales asociadas a un género o especie, sino que son privativas de cada cepa en particular (FAO/WHO, 2002; Ouwehand y col., 2002). Tampoco parecen existir probióticos "universales" que presenten todas las propiedades beneficiosas y aporten beneficios en todas las patologías, sino que cada cepa presenta una o unas pocas características deseables y puede ser utilizada con un fin y en una población blanco determinada. Finalmente, además de cumplir los requisitos de probiosis, las cepas probióticas deben de responder a las necesidades tecnológicas de los procesos de producción industriales (Saarela y col., 2000); sin duda, las más exigentes en muchos casos para su utilización comercial. La identificación y selección de microorganismos probióticos es por tanto un proceso largo y complejo en el que hay que ir descartando las cepas que no cumplan los criterios que se establecen a priori.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las premisas que se han mencionado en el apartado anterior, nuestro grupo ha venido trabajando en los últimos años en la caracterización de la microbiota gastrointestinal de personas sanas con dos objetivos complementarios. Por un lado, nos parece indispensable conocer en mayor profundidad los componentes relevantes (en número y actividades) de este nicho ecológico para poder aprovechar en toda su potencialidad los beneficios de los probióticos, los prebióticos y los demás alimentos funcionales. Por otro lado, a lo largo de nuestros estudios hemos ido aislando cepas de las especies microbianas más características para su utilización como probióticos, mayoritariamente lactobacilos y bifidobacterias.

En un primer momento nos centramos en la microbiología de heces y mucosa colónica y de manera más reciente trabajamos en la microbiología del estómago. En estos estudios hemos compatibilizado técnicas clásicas de microbiología de cultivo en medios selectivos y diferenciales con técnicas más novedosas cultivo-independiente como la electroforesis en geles de gradiente desnaturalizantes (DGGE) y la construcción y análisis de librerías génicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microbiología de heces y mucosa intestinal

En cuanto a la microbiología del intestino grueso, se efectuó el seguimiento de la microbiota intestinal de 8 individuos sanos a lo largo de un año. De cada sujeto se tomaron muestras mensuales de heces y, en la mayoría de los casos, se analizó una muestra de mucosa del mismo individuo tras colonoscopia. Las poblaciones microbianas controladas fueron las de microorganismos totales, clostridios, bifidobacterias, bacteroides, lactobacilos, enterobacterias, coliformes, enterococos, estafilococos y mohos y levaduras. Tal y como se ha descrito para otras comunidades humanas, se encontró una gran variabilidad individual para los distintos grupos, así como para las especies bacterianas que componen los grupos. Por ejemplo, en algunas personas se encontraron poblaciones elevadas de coliformes y/o lactobacilos (10^7-10^8 ufc/g de heces), mientras que en otras apenas se detectaban ($<10^5$ ufc/g). Además del cultivo, se llevó a cabo la construcción y análisis de librerías génicas de diversas muestras tras amplificación con cebadores universales para los genes ribosómicos 16S de procariotas. En general, los resultados de los cultivos y los resultados de la microbiología molecular fueron coincidentes. Las poblaciones mayoritarias pertenecían en todos los casos a especies de clostridios y bacteroides, pero las especies componentes en cada individuo eran distintas. También las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos fluctuaban numéricamente entre individuos y diferían en sus especies componentes entre los distintos voluntarios del estudio.

De estos dos últimos grupos, se aislaron e identificaron en total 241 cepas de muestras de heces y mucosa, de ellas 180 se identificaron como bifidobacterias (136 procedían de heces y 44 de mucosa) y 61 como lactobacilos (46 de

heces y 15 de mucosa). Los aislados pertenecían a 7 especies de bifidobacterias y 14 especies de lactobacilos. De forma conjunta, Bifidobacterium longum (85 aislados), Bifidobacterium pseudocatenulatum (35 aislados) y Bifidobacterium bifidum (31 aislados) constituían más del 95% de las bifidobacterias. En cuanto a los lactobacilos, las especies dominantes fueron Lactobacillus gasseri (con 23 aislados), Lactobacillus casei (con 15) y Lactobacillus delbrueckii (con 8 aislados). Los distintos aislados se sometieron a pruebas para evaluar sus propiedades de probiosis. Entre estas pruebas podemos mencionar la resistencia a la acidez, la resistencia a las sales biliares, la inhibición de patógenos, la unión a células intestinales, la ausencia de actividades enzimáticas indeseables y la ausencia de resistencias atípicas a antibióticos. Esta caracterización propició la selección de diversas cepas con características probióticas deseables que no son frecuentes en la cartera de cultivos de las grandes empresas mundiales de fermentos. La evaluación tecnológica de estas cepas (6 bifidobacterias de tres especies y 4 lactobacilos de 3 especies), que se está llevando a cabo en estos momentos, posibilitarán su transferencia a la industria y su futura utilización comercial.

Microbiología del estómago

El proyecto de estudiar la microbiología de la mucosa gástrica se inició también de los dos objetivos complementarios ya mencionados: contribuir al conocimiento de la microbiota asociada a este ecosistema y aislar cepas de bacterias lácticas que pudieran utilizarse como probióticos. El estómago humano se consideraba hasta hace poco un ambiente inhóspito para los microorganismos debido a las elevadas concentraciones de ácido clorhídrico y la presencia de enzimas digestivos. Pero el descubrimiento de Helicobacter pylori en el año 1984 (Marshall y Warren, 1984) supuso un cambio radical en esta concepción, lo que abrió la puerta a la existencia de una comunidad microbiana adaptada a este nicho ecológico. Dado el nicho en el que habitan, pensamos que existen grandes posibilidades de encontrar cepas con una mayor resistencia a las condiciones de acidez que la que presentan las cepas comerciales. Esta resistencia a la acidez resulta esencial para su inclusión en productos fermentados y para sobrevivir el tránsito intestinal.

En nuestro caso, examinamos biopsias gástricas de 12 sujetos, de las que se tomaron muestras de la mucosa y del líquido gástrico y se procesaron de manera independiente. La presencia de bacterias viables se detectó en 10 muestras de mucosa y en 5 muestras de líquido gástrico, con unos niveles comprendidos entre los 10^1 y los 10^4 ufc por gramo. Los aislados se identificaron mediante la técnica de ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), seguida de la secuenciación de representantes de los distintos perfiles de restricción obtenidos. La especie bacteriana predominante en todos estos aislados fue Propionibacterium acnes (42 aislados), que se encontró en ocho de los 12 individuos del estudio. Se detectaron también diversas cepas de distintas especies de estafilococos (11 aislados) y de Streptococcus salivarius (3 aislados). Con respecto a los lactobacilos, se obtuvieron 19 aislados pertenecientes a las especies L. gasseri (9 aislados), L. reuteri (4 aislados), L. vaginalis (3 aislados), L. fermentum (2 aislados) y L. paracasei (1 aislado). La tipificación por medio de la técnica de tipado REP-PCR (repetitive extragenic palindromic-PCR) indicaba que, al menos entre las especies mayoritarias, existe una gran diversidad de genotipos; p. ej. los 42 aislados de P. acnes pertenecían a 23 cepas distintas.

En estos momentos, estamos iniciando la caracterización fenotípica y de probiosis de los aislados del estómago con el fin de identificar cepas con características adecuadas para su utilización como probióticos. A esta caracterización le seguirá posteriormente su evaluación tecnológica y funcional. Al mismo tiempo, se está llevando a cabo también la caracterización microbiológica de la mucosa gástrica mediante la técnica cultivo-independientes DGGE.

CONCLUSIONES

- Nuestros estudios contribuyen al conocimiento de la microbiota del tracto gastrointestinal humano en personas sanas mediante técnicas microbiológicas de cultivo y técnicas cultivo-independientes.
- Al mismo tiempo, de los microorganismos aislados, hemos caracterizado cepas de bacterias lácticas (lactobacilos y bifidobacterias) que pudieran tener una utilidad como probióticos (específicos).
- Algunas de las cepas pertenecen a especies que no se encuentran disponibles en la cartera de las compañías de fermentos o probióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly,C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., y Collins, J.K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. J. Clin. Nutr. 73:386S-392S.

FAO/WHO. 2002. Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 (ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf).

Marshall, B.J., y Warren, J.R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1:1311-1135.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., y Saarela, M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. Int. Dairy J. 12:173-182.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., y Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek 82:279-289.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., y Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84:197-215.

C10 SELECCIÓN DE ASCOMICETOS Y CARACTERIZACIÓN DE SUS PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS PARA CONTROLAR EL DESARROLLO DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN ALIMENTOS

Prof. Dr. Miguel A. Asensio, Raquel Acosta, Andrea Rodríguez-Martín, Félix Núñez.
Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 10003 Cáceres.
masensio@unex.es

RESUMEN
Los alimentos de actividad de agua intermedia favorecen el desarrollo de una población fúngica en la superficie que puede representar un problema debido a la formación de micotoxinas. Sin embargo, algunos mohos resultan esenciales para lograr las características deseables de muchos quesos y productos cárnicos madurados. No se dispone de medios satisfactorios para controlar el peligro de la formación de micotoxinas, sin alterar sensiblemente la población fúngica responsable de las características deseables. En los últimos años se han descrito algunas especies de ascomicetos que sintetizan unas proteínas pequeñas, básicas y ricas en cisteína que muestran actividad antifúngica. Esto puede ofrecen una nueva herramienta para combatir los mohos toxigénicos, bien empleando los mohos como cultivos protectores, o bien utilizando directamente las proteínas, pero su aplicación requiere la selección de cepas adecuadas para la maduración de los alimentos y la caracterización de los compuestos activos. En el presente trabajo se ha estudiado la presencia de mohos con actividad antifúngica entre la población habitual de los productos cárnicos madurados y se han seleccionado cepas de *Penicillium chrysogenum* productoras de dos proteínas antifúngicas diferentes.

INTRODUCCIÓN
Los mohos toxigénicos constituyen un peligro claramente identificado, especialmente cuando se desarrollan en las materias primas de origen vegetal (cereales, frutas, frutos secos, café, especias) que se destinan a la elaboración de diversos alimentos. Estos mohos también pueden desarrollarse y formar toxinas en alimentos elaborados, si bien el peligro se controla con relativa facilidad mediante unas buenas prácticas higiénicas y sólo representarían un problema en casos de una negligencia grave. Sin embargo, en los alimentos que maduran con mohos el peligro por el desarrollo de hongos toxigénicos no está bien caracterizado y su control resulta complejo, especialmente en los quesos y productos cárnicos. En estos alimentos la población fúngica contribuye decisivamente a las transformaciones de los compuestos durante la maduración, siendo responsables de cambios decisivos en la textura y el sabor característicos del producto final. Por lo tanto, es preciso que en este tipo de alimentos se desarrollen los mohos adecuados. En algunos quesos se puede limitar la presencia de mohos toxigénicos pasterizando la leche antes de la fabricación del queso e incorporando los mohos deseables como un cultivo iniciador. Por el contrario, los quesos elaborados con leche cruda y los productos cárnicos madurados no admiten esa solución. En algunos productos se permite la aplicación superficial de compuestos antifúngicos. Esto puede servir para eliminar el riesgo de contaminación posterior a la elaboración, pero son adecuados para controlar el desarrollo de los mohos toxigénicos durante toda la maduración, ni para los productos en los que la población fúngica constituye un componente característico.
En los últimos años se ha comprobado que algunas especies de ascomicetos producen unas proteínas básicas con actividad antifúngica que podrían utilizarse para la conservación de alimentos (Geisen, 2000). Por ahora sólo se han descrito en un reducido número de especies productoras, incluyendo *Aspergillus giganteus* (Nakaya et al., 1990; Lacadena et al., 1995), *Penicillium chrysogenum* (Marx et al., 1995), *Aspergillus niger* (Lee et al., 1999), *Penicillium nalgiovense* (Geisen, 2000), and *Aspergillus clavatus* (Skouri-Gargouri y Gargouri, 2009). Sin embargo, no se dispone de cepas adaptadas a las condiciones ecológicas de los alimentos madurados.
Se ha estudiado la presencia de proteínas antifúngicas en *Penicillium spp.* ya que forman parte de la microbiota que contribuye a las características deseables de los alimentos madurados, sin plantear objeciones de tipo sanitario. Para obtener cepas activas a partir de estos productos es necesario utilizar métodos que permitan evaluar simultáneamente un elevado número de aislados. Como no se dispone de procedimientos estandarizados para seleccionar mohos productores de proteínas antifúngicas, se ha seguido un procedimiento que permite evitar la interferencia de posibles micotoxinas. También es necesario caracterizar las proteínas responsables de la actividad antifúngica.

MÉTODOS
Se tomaron muestras a partir de la superficie de jamones en nueve industrias de las denominaciones "Dehesa de Extremadura", "Guijuelo" y "Jamón de Huelva" (Acosta y col., 2009). Se evaluó la actividad inhibidora de 281 aislados en una prueba de inhibición radial (Geisen, 2000) frente a cepas toxigénicas de *Penicillium echinulatum, Penicillium commune* y *Aspergillus niger* (Figura 1). A partir de los aislados activos se obtuvo el medio libre de células, el extracto clorofórmico y también se utilizó el residuo acuoso restante tras la extracción con cloroformo. Los extractos se probaron individualmente frente a los mohos de referencia en placas de 96 pocillos (Figura 1), siguiendo un método microespectrofotométrico adaptado de Broekaert y col. (1990). Las proteínas activas se obtuvieron a partir de los extractos libres de células, mediante separación por FPLC con una columna de intercambio catiónico y se purificaron en columnas de filtración en gel. Se seleccionaron los aislamientos caracterizados como *Penicillium* cuyo extracto clorofórmico no mostraba actividad.

Las proteínas responsables de la actividad antifúngica se caracterizaron determinando su punto isoeléctrio, estado de glicosilación, su actividad quitosanasa y se secuenció el extremo N-terminal mediante la degradación de Edman, así como los péptidos obtenidos con tripsina mediante espectrometría de masas (ESI-MS). Se diseñaron cebadores degenerados, con los que se realizó la amplificación a partir del ADN genómico y se secuenciaron los productos de PCR.

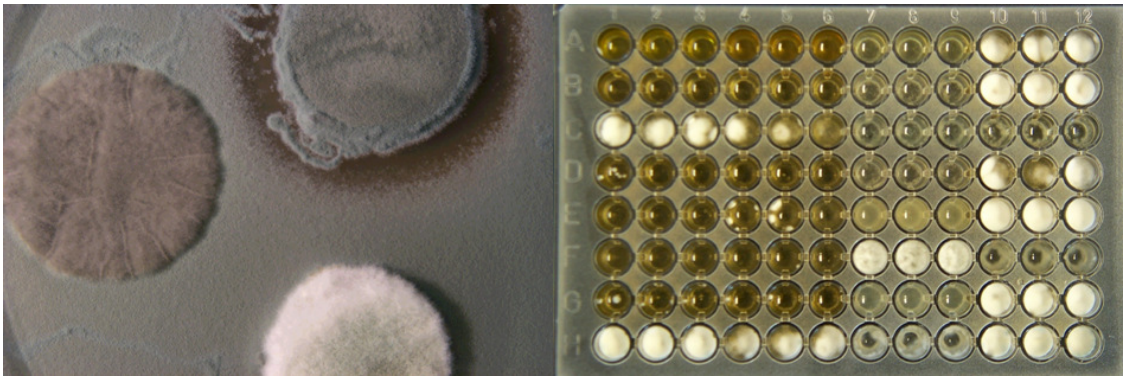


Figura 1. Ejemplo de la evaluación de la actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición radial (izquierda) y el método microespectrofotométrico en placas multipocillo (derecha).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 281 aislamientos, el 60% mostró actividad frente a alguno de los mohos de referencia en la prueba de inhibición radial. La evaluación de la actividad en 88 cepas representativas mediante el método microespectrofotométrico reveló que una buena parte de la actividad antifúngica de algunas especies se reproducía utilizando únicamente el extracto clorofórmico, por lo que no es previsible que su actividad se deba a proteínas, sino más bien a compuestos considerados micotoxinas. Sólo 16 aislamientos no mostraron actividad a partir de los extractos clorofórmicos, incluyendo las nueve cepas caracterizadas como *Penicillium chrysogenum*. El medio libre de células reprodujo la actividad inhibidora de los aislamientos, al menos frente a una de las cepas de referencia. A partir del medio libre de células de diez aislamientos seleccionados se estudió la actividad antifúngica en distintas fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico. Se detectó actividad en diferentes fracciones (Tabla 1). En algunos casos la suma de las actividades de las fracciones individuales no completaba el espectro de acción obtenido con el medio libre de células, lo cual implica que existen compuestos activos en distintas fracciones y que se requiere su acción conjunta para inhibir eficazmente al moho de referencia. De la fracción activa de la cepa RP42C, se recuperó la actividad en una sola subfracción, mientras que de las cepas AS51D y DBI23 se obtenían proteínas en dos subfracciones a partir de una fracción activa (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antifúngica de las subfracciones de interés frente a las cepas de referencia (Adaptada de Rodríguez-Martín y col., 2010b).

Cepa de referencia	Aislamiento	Fracción	Pico seleccionado	Moho sensible	Actividad inhibidora[a]	Peso molecular
P. chrysogenum	AS51D	A11	A11.1	Pc332	++[b]	30772
			A11.2	Pc332	+	n.d.[c]
P. chrysogenum	RP42C	B5	B5.1	Pe321	+++	6496
				Pc332	+++	
				An261	+++	
P. viridicatum	DBI23	A6	A6.1	Pc332	+/-	n.d.
		A11	A11.3	Pc332	-	n.d.
			A11.4	Pc332	-	n.d.
		B4	B4.1	Pc332	+/-	n.d.

[a]Máximo nivel de actividad alcanzado a las 48 y 72 h de incubación.
[b]Diferencias significativas respecto al control: +, $p< 0.05$; ++, $p<0.01$; +++, $p<0.001$; - , $p>0.05$; +/-, $p<0.05$ at 48 h, $p>0.05$ at 72h.
[c]n.d., no detectado

Se han caracterizado dos proteínas de *P. chrysogenum* de la cepas RP42C y AS51D. La primera, denominada PgAFP, presenta un pI de 9,22, una masa de 6494 Da, y no está glicosilada. La secuencia de nucleótidos del gen *pgafp* se encuentra depositada en GenBank (GQ911150) y revela que se sintetiza un precursor de 92 aminoácidos que se procesa hasta los 58 aminoácidos de la PgAFP madura (Rodríguez-Martín y col., 2010a), y que es similar a otras proteínas antifúngicas pequeñas, básicas y ricas en cisteína producidas por ascomicetos (Marx, 2004). La proteína de la cepa AS51D, denominada PgChP, presenta actividad quitosanasa y dos isoformas: una glicosilada de 31 kDa y otra deglicosilada de 30 kDa. La secuencia del gen *pgchp* (GenBank HM044146) codifica una proteína de 304 aminoácidos, correspondiendo los primeros 21 a un péptido señal Rodríguez-Martín y col., 2010b). Incluye 10 cisteínas que son decisivas para su estructura terciaria (Figura 2), y mantienen la integridad de las proteínas fúngicas en el medio extracelular y desempeñan un papel activo en la incorporación de la proteína en los mohos sensibles (Batta y col., 2009).

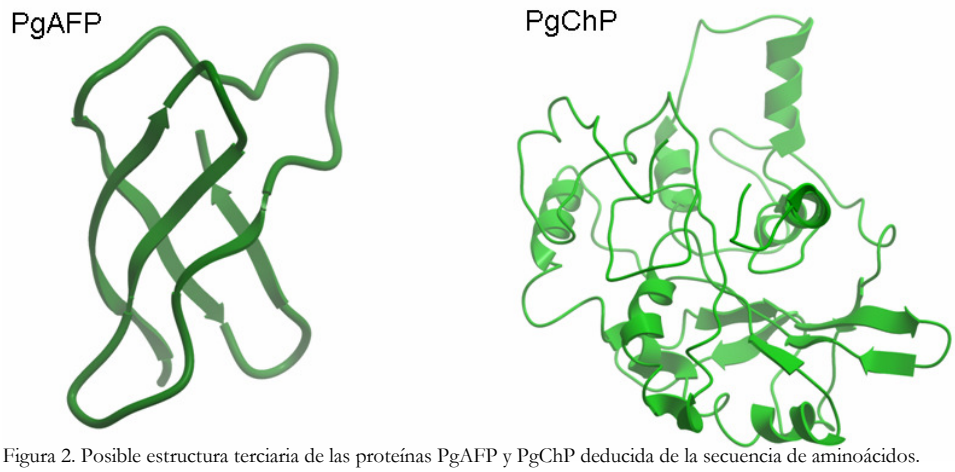


Figura 2. Posible estructura terciaria de las proteínas PgAFP y PgChP deducida de la secuencia de aminoácidos.

Dado que estas proteínas son elaboradas por *P. chrysogenum* no toxigénicos obtenidos de productos cárnicos madurados, tanto las proteínas como los mohos productores pueden ser de utilidad para controlar el desarrollo de mohos toxigénicos en alimentos. Estos mohos son activos frente a diversos ascomicetos incluyendo *Aspergillus* spp., mientras que *Penicillium* spp. parecen menos sensibles.

AGRADECIMIENTOS
Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2004-06546-ALI), Junta de Extremadura y FEDER.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta R, Rodríguez-Martín A, Martín A, Núñez F, Asensio MA (385 2009) Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. Int. J. Food Microbiol. 135:39-46.

Batta G, Barna T, Gáspári Z, Sándor S, Kövér KE, Binder U, Sarg B, Kaiserer L, Chhillar AK, Eigentler A, Leiter E, Hegedüs N, Pócsi I, Lindner H, Marx F (2009) Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF - a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. FEBS J. 276:2875-2890.

Broekaert, WF, Terras, FRG, Cammue, BPA, Vanderleyden, J, (1990) An automated quantitative assay for fungal growth-inhibition. FEMS Microbiology Letters 69:55–59.

Geisen R (2000) *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to 434 the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. Int. J. Food Microbiol. 62:95-101.

Lacadena J, Martínez del Pozo A, Gasset M, Patiño B, Campos-Olivas R, Vázquez C, Martínez-Ruiz A, Mancheño JM, Oñaderra M, Gavilanes JG (1995) Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. Arch. Biochem. Biophys. 20: 273-281.

Lee DG, Shin SY, Maeng C, Jin ZZ, Kim KL, Hahm K (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 646-651.

Marx F, Haas H, Reindl M, Stöffler G, Lottspeich F, Redl B (1995) Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. Gene 167:167-171.

Marx F (2004) Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous 459 ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65:133-142.

Nakaya N, Omata K, Okahashi I, Nakamura Y, Kolkenbrock HJ, Ulbrich N (1990) Amino-acid sequence and disulphide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. Eur. J. Biochem. 193:31-38.

Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA (2010a) Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. Peptides 31:541-547.

Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA (2010b) Characterization of the novel antifungal chitosanase PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. Appl. Microbol. Biotechnol. En prensa.

Skouri-Gargouri H, Ali MB, Gargouri A (2009) Molecular cloning, structural analysis and modelling of the antifungal peptide from *Aspergillus clavatus*. Peptides 30:1798-804.

C11 MICROBIOTA DE QUESOS ARTESANALES ANDALUCES

Prof. Dr. Manuel Martínez–Bueno
Dpto. Microbiología. Universidad de Granada.
mmartine@ugr.es

En la elaboración de un queso, los microorganismos añadidos intencionadamente al inicio del proceso o bien aquellos presentes en la propia leche, juegan un papel fundamental en el desarrollo de las propiedades organolépticas del producto final. La producción industrial a gran escala, empleando leche pasteurizada y cultivos iniciadores, ha conducido en ocasiones, a la obtención de quesos de menor riqueza microbiológica con la consecuente pérdida de cualidades de aroma y sabor con respecto a quesos elaborados de forma artesanal. Andalucía cuenta con un importante patrimonio quesero, ligado probablemente al clima templado de la región, el tipo de suelo y vegetación y por supuesto a la existencia de numerosas razas autóctonas productoras de leche. Aunque la forma de elaboración del queso se ha mantenido prácticamente invariable durante siglos, las diferentes zonas cuentan aún con numerosas recetas tradicionales que han dado lugar a una importantísima variedad de quesos artesanales muy apreciados en general por los consumidores. Todo esto, ha permitido conservar un importante patrimonio cultural, etnográfico y gastronómico, generador de riqueza y desarrollo de las zonas rurales.

A pesar de la gran diversidad existente, desde el punto de vista microbiológico los quesos andaluces han sido poco estudiados. Ello es debido, probablemente, a que la mayor parte de productores de quesos artesanales están organizados en empresas de tamaño reducido, en ocasiones familiares y con una gran atomización, lo que dificulta la realización de estudios microbiológicos apropiados. Todo esto no solo afecta negativamente a la comercialización de algunos de sus productos, sino también a la obtención de los certificados de calidad de la administración, que sin duda generan un valor añadido.

A la hora de estudiar la microbiología de los quesos, básicamente se pueden utilizar dos estrategias complementarias, los métodos tradicionales dependientes de cultivos o los más modernos independientes de cultivo. Cada uno, con sus ventajas e inconvenientes, ofrecen información diferente sobre la composición microbiológica de este producto. El utilizar una u otra depende, en última instancia, de los objetivos que se pretendan, aunque hoy por hoy no existe una única metodología que aporte la información necesaria para conocer en profundidad la microbiología de un queso.

Nuestro grupo inició hace años una investigación sobre la microbiología de los quesos artesanales andaluces, y más especialmente de aquellos elaborados con leche cruda de cabra. Gracias a estos estudios disponemos de una amplia colección de microorganismos catalogados a nivel fenotípico y genético. Al mismo tiempo hemos desarrollado metodologías rápidas y sencillas que nos permiten conocer la impronta que dejan los microorganismos en los quesos, a través de su "huella genética", lo que puede ser de gran interés para el productor/fabricante a la hora de evaluar la calidad de su producto.

Las poblaciones microbianas encontradas en quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra varían enormemente dependiendo de factores como la adición de cultivos iniciadores o el tiempo de maduración, entre otros. Así, los lactobacilos suelen ser los microorganismos que se aíslan mayoritariamente de quesos curados de tipo manchego a los cuales se les ha adicionado cultivos iniciadores definidos. Estos quesos, aunque por lo general suelen tener una diversidad microbiana más reducida, normalmente también derivan en productos más homogéneos y constantes en su composición y cualidades. Entre los lactobacilos, *Lb. paracasei*, representa hasta el 60 % del total de los microorganismos aislados, seguido de *Lb. brevis*. La presencia de otras poblaciones de lactobacilos, depende en parte del tiempo de maduración utilizado. Un buen ejemplo es *Lb. plantarum* que casi puede llegar a desaparecer (< 1 %) cuando estos periodos superan los 6-8 meses de permanencia en cámara. La presencia de enterobacterias en este tipo de quesos fue en general indetectable o escasamente representadas. Es notable que no fuera posible detectar a los cultivos iniciadores utilizados mediante técnicas de cultivo. En los quesos tipo manchego que no utilizan cultivos iniciadores, aunque los lactobacilos siguen siendo los microorganismos mayoritarios, es posible detectar otras especies pertenecientes a géneros como *Pediococcus, Leuconostoc* y *Lactococcus* en una frecuencia variable.

La composición microbiológica cambia sustancialmente cuando se trata de otros quesos, como los quesos blandos, tipo torta o con tiempos de maduración más reducidos. En éstos, si bien las bacterias lácticas siguen siendo los microorganismos mayoritarios, predominan los lactococos (*L. lactis*), que pueden representar entre el 25-40 % del total de microorganismos aislados, seguidos de los lactobacilos (*Lb. paracasei* y *Lb. plantarum*) con un 10-20 % y se detectan también enterococos hasta casi en un 20 %, según el tipo de queso. Es especialmente significativa en algunas de las muestras estudiadas, la alta presencia de enterobacterias (*Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *S. grimesii* y *Enterobacter intermedius*), que llegaron en conjunto a representar hasta el 30 % del total de microorganismos, con títulos similares a los de *L. lactis*. Estas bacterias son tradicionalmente consideradas como indicadores de contaminación fecal aunque la legislación tan solo reglamenta el límite máximo de 10^5 UFC/g para *E. coli* y la ausencia de *Salmonella* en 25 g en los quesos elaborados con leche cruda (directiva CE 2073/2005). Este grupo de microorganismos también podría estar implicado en el desarrollo del sabor de algunos quesos debido al metabolismo del citrato y las actividades proteolíticas y lipolíticas que pueden desarrollar.

De los métodos utilizados para el estudio de la biodiversidad microbiana mediante técnicas independiente de cultivo, ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) es el que ofrece mayor resolución y reproducibilidad frente a otros como el TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) o LH-PCR (Length heterogeneity-PCR). ARISA distingue las poblaciones microbianas en función de la longitud de la región del espaciador intergénico ribosómico, proporcionando de esta forma un análisis de las comunidades con alta resolución. ARISA ha resultado ser una herramienta de gran alcance para evaluar no sólo la diversidad de una comunidad microbiana compleja sino también los cambios que suceden en el tiempo. Ello tiene numerosas e importantes aplicaciones como son el estudio de la dinámica de poblaciones o los estudios de trazabilidad y seguridad alimentaria. La aplicación de ARISA en el análisis de la diversidad microbiana de quesos artesanales permite corroborar en parte los datos obtenidos mediante técnicas de cultivo, pero también generar la huella genética microbiana de la comunidad, poniendo de manifiesto taxones no detectados mediante otras técnicas.

El estudio de las características tecnológicas y funcionales de algunas de las cepas mayoritarias como los lactobacilos, reveló que muchos de los grupos genómicos mostraban actividades enzimáticas de interés, como la capacidad para fermentar azúcares complejos como rafinosa y estaquiosa, la actividad catalasa hemodependiente, la hidrólisis de la caseína, o la degradación de fitatos, detectadas principalmente en las cepas de *Lb. plantarum*. La incidencia de tales actividades, a excepción de la fermentación de la estaquiosa, entre las cepas de *Lb. paracasei* fue, sin embargo, muy inferior o incluso inexistente. Otras propiedades interesantes de las cepas han sido las asociadas a su resistencia a las condiciones gástricas (pH ácido y sales biliares), la hidrólisis de sales biliares, o la adherencia a

células Caco2, importantes para sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal. Sin embargo la capacidad de formación de biofilmes cuando se cultivan de forma aislada es escasa. Además se pudo comprobar que muchas de las cepas sintetizaban antimicrobianos tales como bacteriocinas y peróxido de hidrógeno. En general, la gran mayoría de las cepas de *Lactobacillus* aisladas podrían considerarse seguras por no presentar factores de virulencia como la capacidad de producir aminas biógenas, actividades ADNasa, gelatinasa o mucinasa o resistencias a antibióticos.
Por todo ello, los quesos artesanales podrían considerarse en general como fuente de microorganismos para ser usados en el futuro como cultivos iniciadores primarios o secundarios en la fabricación de quesos o investigados en su potencial probiótico.

C12 LA METAGENÓMICA APLICADA AL ESTUDIO DE UNA ALTERACIÓN DEL QUESO: LA HINCHAZÓN TARDÍA

Dra. Marta Hernández Pérez
Instituto Tecnológico Agrario. Junta de Castilla y León. Ctra. Burgos, km. 119. 47071 Valladolid.
ita-herperma@itacyl.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Desde que en 1674 Antonie van Leeuwenhoek observara los primeros seres microscópicos con el primer microscopio, y dos siglos después Louis Pasteur demostrara el crecimiento de los microorganismos en caldos nutritivos refutando así la teoría de la generación espontánea, la identificación de los microorganismos ha evolucionado hacia técnicas basadas en el estudio del material genómico. Las técnicas de ultrasecuenciación o pirosecuenciación desarrolladas recientemente, permiten obtener 500 millones de pares de bases en 10 h a partir de un genoma o transcriptoma o a partir de amplicones. Este avance ha permitido por tanto el desarrollo de la denominada metagenómica, también conocida como Genómica Ambiental, Genómica Ecológica, Genómica de Comunidades y cuyo térmico se acuñó por primera en 1998 por Jo Handelsman. La metagenómica comprende el análisis de material genético directamente recuperado de muestras ambientales, por lo que permite muestrear distintos genomas de comunidades bacterianas coexistentes en un mismo ambiente y permite el estudio de microorganismos no cultivables, lo cual es una gran ventaja ya que se estima que tan solo el 1% de la microbiota ambiental es cultivable y por tanto permite descubrir nuevas bacterias y nuevas funciones. Mediante pirosecuenciación podemos determinar el microorganismo más abundante, ya que es el más representativo en la secuenciación y *por ende* se puede realizar un análisis cuantitativo de la ecología. Aunque existen diferentes aproximaciones para realizar un estudio de ecología microbiana desde una aproximación metagenómica, una de las formas más utilizadas es la secuenciación tras la amplificación del gen *rrs* que codifica la subunidad menor del ARN ribosómico (16S ARNr) en procariotas. Se trata de un gen universal que permite la identificación, funcionalmente homólogo en todas las especies y con una secuencia estable evolutivamente por lo que permite clasificar taxonómicamente. En este sentido se han puesto en marcha distintos proyectos con el fin de obtener información de la diversidad bacteriana del planeta (ya que el dominio bacteria es el que más biomasa y diversidad taxonómica y funcional presenta). Así el Dr. Craig Venter, padre del genoma humano, lidera actualmente un ambicioso proyecto *Global Ocean Sampling* (GOS), que tiene como objetivo recorrer mares y océanos para caracterizar las distintas comunidades microbianas en busca de nuevas especies y funciones bacterianas. Sin embargo, la metagenómica es todavía una herramienta cara, no se ha estandarizado el volumen de toma de muestra, lo cual hay que tenerlo en cuenta a la hora de comparar distintos trabajos, porque con una cantidad mayor de muestra se puede obtener una mayor biodiversidad, y tampoco existe un protocolo de extracción de ADN normalizado, por lo que los utilizados en diferentes estudios varían en eficiencia y rendimiento. Finalmente, es muy importante el análisis bioinformático; elegir una buena base de datos para evitar problemas de cobertura o de redundancia de secuencias. Actualmente la base de datos más completa para comparación de secuencias del 16S ARNr es el *Ribosomal Database Project* (RDP, www.rdp.cme.msu.edu) con más de un millón doscientas mil secuencias y el *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Además existen herramientas específicas de análisis metagenómico (MEGAN "MEtaGenomeANalyzer" de Hudson et al., 2007) y Metagenomics RAST server (MG-RAST, de Meyer et al., 2008).
En este trabajo se ha realizado un estudio metagenómico en queso curado de oveja para determinar la microbiota causante de una alteración denominada hinchazón tardía. Se trata de una alteración de la masa del queso que aparece después de la segunda semana de maduración en quesos de leche cruda y pasterizada, por la cual el queso aparece abombado en su parte superior y al corte desprende un gas inodoro u olor pestilente inflamable, se observan cavidades irregulares, la pasta puede aparece digerida, suelta y el grano no unido. En 1995, Klijn y col., describieron a *Clostridium tyrobutyricum* como el principal agente responsable de la hinchazón tardía, y recientemente otros autores apuntan a otros clostridios como *C. sporogenes, C. butyricum o C. beijerinckii.* Sin embargo, después de analizar quesos hinchados y muestras de leche con recuentos altos de butíricos analizados por el método oficial del Número Más Probable (NMP), no hemos encontrado una presencia significativa de estos microorganismos, por lo que el objetivo es estudiar la microbiota responsable de esta alteración que debe reunir una serie de características: anaerobio o anaerobio facultativo, fermentador de lactato y productor de gas, y esporulado para resistir la pasterización.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron 234 muestras de leche de distintas explotaciones de ovino lechero de Castilla y León (Tabla 1) con distintos niveles de recuento de butíricos analizados por la técnica de Número Más Probable (NMP) (5×5) en el Laboratorio Interprofesional Lácteo (LILCYL). En estas muestras se estudió la presencia de *C. tyrobutyricum* (López-Enríquez et al., 2007) y *C. perfringens*. Aunque se ha descrito que 200 esporas/L es suficiente para producir hinchazón consideramos que 1000 esporas/L es un umbral suficientemente seguro para que aparezcan problemas en las industrias queseras. También se recogieron 15 quesos que presentaban tanto problemas de hinchazón tardía como sin ellos, considerados éstos últimos control, aunque en este caso la determinación de butíricos por NMP no se realizó ya que no existen formas esporuladas en los quesos y por tanto no se obtiene recuento alguno ya que el procedimiento incluye un calentamiento para fundir la parafina que destruye las formas vegetativas.

Tabla 1. Muestras de leche analizadas.

Recuento esporas/L por NMP	<1000	1000-3500	>3500	TOTAL
No. explotaciones	138	70	26	*234*
Recuento medio esporas/L	354	1918	10835	*2004*

También, se analizaron los tubos de NMP procedentes de 165 muestras de leche de explotaciones (Tabla 2) por DGGE según el protocolo descrito por Le Bourhis *et al.* (2005).

Tabla 2. Tubos de NMP analizados por DGGE de muestras de leche de tanque de distintas explotaciones.

Recuento esporas/L por NMP	<1000	1000-3500	>3500	media/total
Recuento medio esporas/L	362	1944	10646	*1336*
Positivas a *C. perfringens*	43 (42,57%)	25 (58,14%)	9 (69,23%)	*44,25%*
Positivas a *C. tyrobutyricum*	0	0	2 (15,38%)	*0,88%*
Negativas a los 2 *Clostridium*	58 (57,43%)	18 (41,86%)	1** (7,69%)	*53.98%*
No. explotaciones	*109**	*43*	*13*	*165*

* faltan 8 por analizar

** es positiva a Bacillus

Asimismo, se realizaron 3 fabricaciones de queso con leche inoculada con esporas viables (una vez comprobado su crecimiento en las condiciones de fabricación del queso, concentración de sal alta y pH ligeramente ácido) tanto de *C. tyrobutyricum* (4000 esporas/L en 5 quesos de vaca y 5 de oveja, ambos con su réplica control) y *C. perfringens* (dos fabricaciones de queso de oveja con bajo 4000 esporas/L y alto $1{,}48 \times 10^6$ esporas/L recuento) preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Herman *et al.* (1995). Tras la inoculación se procedió a un ciclo de pasteurización (63ºC 30 minutos) y el recuento posterior a la pasterización demostró la resistencia de las esporas a la pasterización y se procedió a la elaboración de quesos de pasta prensada que se mantuvieron hasta las 6 meses de maduración.

Leche (2), quesos hinchados y no hinchados (15), así como un tubo de crecimiento en anaerobiosis de NMP fueron analizados por pirosecuenciación. Para ello se realizó una extracción de ADN genómico total a partir de cada una de las muestras y se realizó una amplificación de la región V3 del gen 16S ARNr utilizando los cebadores descritos por Sundquist et al. (2007) a los que se les añadió los *fusion primers* necesarios en la secuenciación por el sistema Roche 454 Sequencing System.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras de leche analizadas mediante PCR a tiempo real para *C. tyrobutyricum* y *C. perfringens* tan solo 16 y 78 muestras fueron positivas respectivamente para cada uno de estos microorganismos. Además no se aisló ninguna cepa de *C. tyrobutyricum* del queso o de muestras de leche puesto que cuando se ha podido detectar la presencia de *C. tyrobutyricum* es en un porcentaje de 2:10.000 y por tanto este microorganismo queda enmascarado en el cultivo por otros clostridios ya que el medio microbiológico utilizado no resulta específico para el primero. Sin embargo si que se han aislado cepas de *C. perfringens* que fueron utilizadas en la fabricación experimental con quesos inoculados. En ninguna de las tres fabricaciones se produjo la hinchazón de los quesos, aunque se había previamente comprobado que las especies inoculadas producían gas, resistían la pasterización (ya que se inocularon en forma de espora) y crecían en medio ácido y a la concentración de sal utilizada en la prueba. En cuanto a la caracterización molecular mediante DGGE de los 165 tubos de cultivo obtenidos a partir de muestras de leche con distintos niveles de esporas, en 123 se pudo identificar especies de los géneros *Clostridium* y *Bacillus* existiendo una gran variabilidad, si bien el 36,69% de las mismas fueron *C. perfringens* (Figura 1).

No se ha encontrado significación estadística entre el recuento de esporas/L y la presencia de una determinada especie bacteriana. Si bien es cierto que *C. perfringens* es la especie más abundante pero no se observa una correlación con su presencia en aquellas muestras con recuentos altos. Los recuentos más altos de esporas se encontraron en presencia de *C. butyricum, C. sporogenes, C. sporosphaeroides* y *C. tyrobutyricum*. El análisis metagenómico de los quesos, de dos muestras de leche y de un tubo de NMP, tampoco esclarecieron la identificación de un único agente causal de la hinchazón. Las secuencias se ensamblaron con el programa CAP3 y previamente al análisis de comparación fueron filtradas para descartar aquellas de longitud menor de 61 pb, se compararon con una base de datos de 760.000 secuencias de ARN ribosómico 16S bacteriano utilizando la herramienta BLAST. Se asignó especie con un porcentaje mínimo de identidad que osciló del 89% al 96% y se calculó el porcentaje de identidad de las lecturas que correspondían a un determinado organismo respecto al total de secuencias obtenidas. La longitud de lectura media fue de 185,25 pb±31,28 y el número de secuencias identificadas por muestra estuvo comprendido entre 3006 y 16174 secuencias

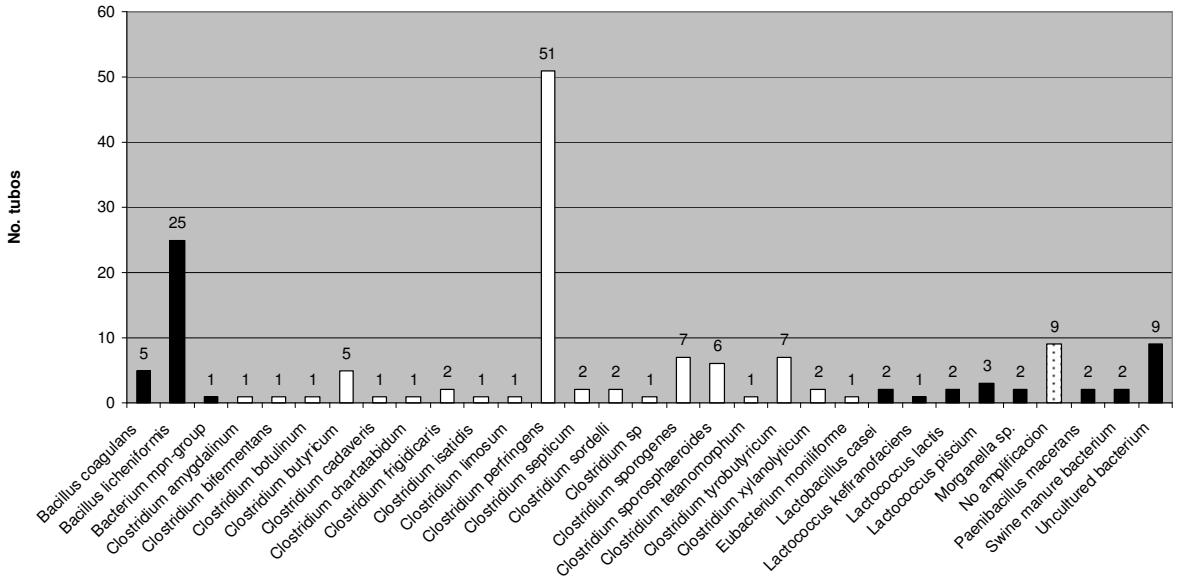


Figura 1. Representación de las especies más abundantes crecidas en los tubos de NMP identificadas por DGGE. *C. perfringens* se identificó en casi la mitad de los tubos analizados.

Se observó una mayor diversidad en el número de especies identificadas en las muestras de leche, predominando *Pseudomonas*. En el tubo de NMP únicamente se identificaron dos géneros Bacillus (0,04%) y Clostridium (86,87%). Entre los quesos hinchados y no hinchados analizados se observó una cierta variabilidad en las especies identificadas y sobre todo en el porcentaje de especies mayoritarias, pero podría ser atribuida a la distinta procedencia de los quesos. Lo que si es destacable es que en en los quesos hinchados siemrpe se dentificó alguna especie del género *Clostridium*, aunque tan sólo en un queso hinchados se identificaron secuencias de *C. tyrobuturicum*.

CONCLUSIONES

Del trabajo realizado en este estudio es de destacar que hay que destacar que existen varios tipos de hinchazones con distintos signos que no se corresponden a lo que se conoce como hinchazón tardía causada por butíricos, si no a otros tipos de hinchazón causadas por bacterias coliformes, por defectos de fabricación, etc. De las muestras de leche con recuentos altos de butíricos y quesos analizados no se ha encontrado de forma significativa la presencia de *C. tyrobutyricum*, la especie bacteriana descrita *a priori* como responsable de la hinchazón tardía (Klijn *et al*., 1995) pero tampoco se ha identificado una bacteria anaerobia esporulada, que produzca gas, fermente el lactato y que pudiera ser candidata a agente causal. No obstante, *Clostridium perfringens* se encontró en una mayoría de los tubos cultivados a partir de muestras de leche analizadas para comprobar su tasa de butíricos. Sin embargo elaboraciones experimentales de quesos de leche de oveja y vaca previamente inoculados con esporas tanto de *C. tyrobutyricum* como *C. perfringens* tampoco han revelado signos de hinchazón. Podríamos concluir que podría existir una coexistencia de varios agentes implicados en la hinchazón tardía o bien tratarse de un desajuste en el crecimiento de la microbiota y que no permite desarrollarse a la microbiota láctica de forma predominante, pero en ningún caso hemos encontrado que *C. tyrobutyricum* esté jugando un papel primordial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Huson, D.H.; Auch, A.F.; Qi, J., y Schuster, S.C. MEGAN Analysis of Metagenomic Data, Genome Research. 17:377-386 (2007).

Meyer, F.; Paarmann, D.; D'Souza, M.; Olson, R.; Glass, E. M.; Kubal, M.; Paczian, T.; Rodriguez, A.; Stevens, R.; Wilke, A.; Wilkening, J.; Edwards, R. A. The Metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics, 9:386 (2008).

López-Enríquez, L., Rodríguez-Lázaro, D.; Hernández, M.. Quantitative detection of Clostridium tyrobutyricum by real-time PCR in milk. Applied and Environmental Microbiology, 73, 3747-3751 (2007)

Le Bourhis, A.G., Saunier,K., Dore, J.; Carlier, J.-P.; Chamba,J-F. ; Popoff, M.-R. ; Tholozan, J.L. Development and Validation of PCR Primers to Assess the Diversity of Clostridium spp. in Cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 71, 29–38 (2005).

Sundquist, A.; Bigdeli, S.; Jalili, R.; Druzin, M.L.; Waller, S.; Pullen, K.M. El-Sayed, Y.Y. Taslimi, M.M.; Batzoglou, S.; y Ronaghi, M. Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. BMC Microbiology 7:108 (2007).

Herman, L.M.F., J.H.G.E. de Block, and G. M.A.V.J. Waes. 1995. A direct PCR detection method for Clostridium tyrobutyricum spores in up to 100 milliliters of raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4141-4146.

Klijn, N., F.F. Nieuwenhof, J.D. Hoolwerf, C.B. van der Waals, and A.H. Weerkamp. 1995. Identification of Clostridium tyrobutyricum as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. Appl Environ Microbiol. 61: 2919-2924.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por los proyectos de investigación RTA2008-00068-00-00 y 04/06/PA/0018.

C13 ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE DETERMINAN LA RESPUESTA DE ADAPTACIÓN ÁCIDA Y DE PROTECCIÓN CRUZADA FRENTE AL CALOR DE SALMONELLA TYPHIMURIUM Y SALMONELLA SENFTENBERG: MECANISMOS IMPLICADOS

Dr. Avelino Álvarez Ordóñez
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León.
aalvo@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis supone un grave problema para la Salud Pública y, en contra de lo que cabría esperar por la continua mejora de los procedimientos de elaboración y conservación de los alimentos así como de los sistemas preventivos de control, su incidencia aumenta cada año de forma alarmante, en gran medida debido a la creciente presencia en el mercado de una amplia gama de alimentos mínimamente procesados, sometidos a tratamientos de conservación lábiles (D´Aoust, 2000). Según el Informe Europeo sobre zoonosis, agentes zoonóticos y resistencias antimicrobianas, la salmonelosis ocupa uno de los primeros puestos en la lista de enfermedades infecciosas causadas por el consumo de alimentos en la Unión Europea (prevalencia para salmonelosis, 131.468 casos registrados confirmados laboratorialmente en 2008). En España, oficialmente se registra una incidencia de 14,1 casos por 100.000 habitantes y año, si bien las estimaciones realizadas indican que ésta podría ser al menos 10 veces mayor (EFSA, 2010). En los últimos años se está realizando un importante esfuerzo investigador con el objetivo de adecuar los sistemas de conservación a las tendencias del mercado, lo que ha conducido al desarrollo de nuevas tecnologías de procesado y conservación de los alimentos y al lanzamiento de nuevos productos, con sabores más naturales, libres de aditivos o que sufren tratamientos térmicos más suaves. La industria alimentaria debe garantizar la calidad microbiológica de esos alimentos mínimamente procesados. En este sentido, uno de los enfoques que más atención está recibiendo es la tecnología de los procesos combinados que consiste en la aplicación simultánea o sucesiva de varios métodos de conservación a baja intensidad (acidificación, descenso de la actividad de agua, modificaciones del potencial redox, tratamientos térmicos, etc), que, actuando de forma sinérgica o aditiva, garanticen la inactivación microbiana (Leistner, 2000). La correcta aplicación de la tecnología de los procesos combinados requiere un conocimiento profundo de cómo diversos factores medioambientales afectan a la resistencia bacteriana a los diferentes agentes de conservación de los alimentos, así como de los mecanismos moleculares implicados en las respuestas adaptativas microbianas frente a las condiciones de estrés utilizadas.

OBJETIVOS

El objetivo de la Tesis Doctoral fue estudiar la respuesta adaptativa de dos serovariedades del género *Salmonella*, *S*. Typhimurium y *S*. Senftenberg, frente a la acidificación, uno de los métodos más comúnmente empleado por la industria alimentaria, por fermentación o por adición de ácidos orgánicos, para el control del crecimiento o supervivencia de microorganismos patógenos. Los objetivos específicos derivados fueron determinar la influencia de la adaptación a la acidez sobre la resistencia de *S*. Typhimurium y *S*. Senftenberg a condiciones letales de estrés térmico, ácido, alcalino, osmótico y oxidativo, examinando el efecto de diversos parámetros medioambientales (temperatura y pH de crecimiento y tratamiento, tipo de ácido orgánico utilizado, composición de los medios de cultivo y tratamiento), y esclarecer los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de adaptación ácida en ambas serovariedades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos han permitido demostrar que el crecimiento de *S*. Typhimurium y *S*. Senftenberg en ambientes ácidos moderados origina respuestas adaptativas de tolerancia ácida, que se manifiestan por un incremento en su posterior resistencia a condiciones ácidas letales, y de protección cruzada frente a tratamientos térmicos, tanto en medios de laboratorio como en zumos de naranja y manzana. Sin embargo, ocasiona una sensibilización frente al estrés osmótico y oxidativo, que puede tener importantes repercusiones para el control de la salmonelosis en quesos y otros productos fermentados. En cuanto a los tratamientos alcalinos, el desarrollo de protecciones cruzadas estuvo condicionado por el agente alcalinizante utilizado. Diversos factores ambientales condicionaron la expresión y magnitud de dichas respuestas adaptativas. La resistencia a condiciones ácidas letales se vio incrementada a medida que disminuía el pH del medio de crecimiento, y fue máxima para suspensiones celulares obtenidas en presencia de ácido acético, cítrico y láctico, hecho preocupante teniendo en cuenta su habitual utilización como agentes de descontaminación de canales o como aditivos en la industria alimentaria (Smulders y Greer, 1998). El aumento en la temperatura de crecimiento en el rango 10-37ºC incrementó de forma exponencial la resistencia bacteriana a la acidez extrema y al calor, aunque temperaturas más elevadas, 45ºC, sólo ocasionaron un incremento en la termorresistencia. Este comportamiento, unido a la sensibilización frente a los tratamientos térmicos observada tras la aplicación secuencial de acidificación y refrigeración, pone de manifiesto que la utilización conjunta de dichas barreras de conservación en la elaboración de alimentos mínimamente procesados puede llegar a ser una medida eficaz para el control de la salmonelosis. Las respuestas de tolerancia ácida y de protección cruzada frente al calor resultaron más intensas en alimentos (extractos de carne y zumos de naranja y manzana) que en medios de laboratorio. La elevada resistencia ácida encontrada en zumos de naranja y manzana indica la posibilidad de supervivencia microbiana en el ambiente ácido del estómago, justificando la frecuente implicación de estos productos en casos de salmonelosis (Vodjani y col., 2005), lo que hace aconsejable

la implantación de tratamientos de pasterización durante su procesado. El elevado nivel de supervivencia exhibido por las células adaptadas a la acidez en extractos de carne sugiere que algún componente de la fracción proteica de los alimentos desempeña un importante efecto protector. De hecho, la inclusión de arginina y lisina en un medio mínimo (MM) originó un incremento significativo de la resistencia ácida de las células adaptadas a la acidez, sin modificar sensiblemente la de las no adaptadas, lo que pone de manifiesto la importancia de los sistemas homeostáticos "arginina decarboxilasa" y "lisina decarboxilasa" en el desarrollo de respuestas de tolerancia ácida en *Salmonella* spp., hecho que hecho pudo ser confirmado tras determinar el nivel relativo de expresión de los genes que codifican para los componentes de dichos sistemas homeostáticos. La lisina decarboxilasa (CadA) actúa en cooperación con un sistema transportador lisina/cadaverina (CadB) contribuyendo al mantenimiento del pH intracelular al decarboxilar la lisina intracelular, produciendo cadaverina y consumiendo un protón. Posteriormente, la cadaverina es intercambiada por lisina extracelular a través del transportador CadB. Como consecuencia, se produce un incremento del pH intracelular, por el consumo de un protón en el proceso (Lee y col., 2007, 2008). De forma análoga, la arginina decarboxilasa (AdiA) convierte la arginina intracelular en agmatina, que es expulsada de la célula mediante un transportador arginina/agmatina (AdiC), consumiendo un protón, con el consiguiente incremento del pH intracelular (Kieboom y Abee, 2006). No obstante, también hemos constatado que otros mecanismos moleculares, como las modificaciones en la composición en ácidos grasos de la membrana celular, están también involucrados en estas respuestas adaptativas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el pH y la temperatura de crecimiento originan una serie de cambios lipídicos de membrana íntimamente relacionados con la resistencia ácida y térmica de este microorganismo. La acidificación del medio en el rango de temperaturas de 10 a 37ºC dio lugar a un descenso en la proporción de ácidos grasos insaturados y un incremento en el contenido en ácidos grasos cíclicos derivados del ciclopropano. Estos cambios observados en la composición lipídica se vieron reflejados en modificaciones en la relación entre ácidos grasos insaturados y ácidos grasos saturados, parámetro habitualmente utilizado como un indicador indirecto de la fluidez de la membrana, que, en el rango de temperaturas de 10 a 37ºC se vio disminuido para las células adaptadas a la acidez. Los resultados obtenidos demuestran que la adaptación de *Salmonella* a la acidez induce la conversión de gran parte de los ácidos grasos insaturados en sus derivados cíclicos y produce un descenso en la fluidez de la membrana bacteriana, y confirman los obtenidos por otros grupos de investigación que afirmaron que la síntesis de ácidos grasos cíclicos puede servir como medida protectora frente a distintas condiciones estresantes, como la acidificación o el calor (Grogan y Cronan, 1997; Kim y col., 2005).

Las respuestas adaptativas frente al estrés ácido descritas en la Tesis Doctoral para *S.* Typhimurium y *S.* Senftenberg tienen importantes repercusiones para la seguridad alimentaria y evidencian la necesidad de realizar en los próximos años un mayor esfuerzo investigador centrado en la adquisición de un conocimiento más completo de los mecanismos moleculares responsables de la inactivación microbiana por los diferentes agentes de conservación con el objetivo de poder realizar una selección inteligente de barreras que puedan ser utilizadas de forma sinérgica en la tecnología de procesos combinados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

D´Aoust, J.Y., 2000. *Salmonella.* En: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.). The Microbiological Safety and Quality of Foods. Aspen, Gaithersberg, Maryland, USA, pp. 1233-1299.

EFSA. 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*, 1496.

Grogan, D.W. y Cronan, J.E., 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 429-441.

Kieboom, J. y Abee, T., 2006. Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188, 5650-5653.

Kim, B.H., Kim, S., Kim, H.G., Lee, J., Lee, I.S. y Park, Y.K., 2005. The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 151, 209-218.

Lee, Y.H., Kim, B.H., Kim, J.H., Yoon, W.S., Bang, S.H. y Park, Y.K., 2007. CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189, 2417-2425.

Lee, Y.H., Kim, J.H., Bang, I.S. y Park, Y.K., 2008. The membrane-bound transcriptional regulator CadC is activated by proteolytic cleavage in response to acid stress. *Journal of Bacteriology*, 190, 5120-5126.

Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181-186.

Smulders, F.J.M. y Greer, G.G., 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 149–169.

Vojdani, J.D., Beuchat, L.R. y Tauxe, R.V., 2005. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection*, 71, 356–364.

C14 CONTROL OFICIAL DE LOS RIESGOS MICROBIOLÓGICOS

Ilmo. Sr. D. Jorge Llorente Cachorro

Director de la Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria, Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León.

llocacjo@jcyl.es

La seguridad alimentaria puede ser definida como el conjunto de actuaciones encaminadas a preservar que todas las etapas de la producción, transformación y distribución de alimentos, se desarrollen utilizando procedimientos que garanticen a la luz de los conocimientos científicos disponibles, un nivel elevado de protección de la salud de la población consumidora. Bien es cierto que en este concepto debe tenerse en cuenta también dos principios elementales como son el "principio de precaución" y el principio de que el riesgo "0" no existe.

Dentro de las actividades que realiza la administración sanitaria, la protección de la salud se erige como un pilar fundamental de nuestra sociedad del bienestar. Así los artículos 43 y 51 de la Constitución disponen que los poderes públicos organizarán y tutelarán la salud pública a través de medidas preventivas. En este sentido, la seguridad alimentaria, es el concepto que agrupa las medidas preventivas que protegen la salud frente a los riesgos físicos, químicos y biológicos, que pueden presentarse en los alimentos.

En la aludida sociedad de bienestar existen factores que propician la aparición, emergencia o reemergencia de peligros microbiológicos que precisan de la adaptación de los implicados en materia de seguridad alimentaria a nuevos retos. Entre estos los factores, algunos de ellos quizás "irreversibles", cabe citar:

- La globalización del comercio alimentario, que permite el rápido intercambio de alimentos a nivel mundial, pero que puede propiciar la también rápida difusión de peligros alimentarios. Vivimos en la llamada "sociedad del riesgo global".
- El creciente desarrollo e innovación tecnológica, que incorpora nuevas técnicas de producción, elaboración y conservación de alimentos. Lo que algunos autores denominan "los riesgos del desarrollo".
- Los cambios en los hábitos alimenticios de los consumidores, reflejo de la sociedad actual, que demanda alimentos de mayor vida útil, precocinados, comidas preparadas para consumir tanto dentro como fuera de casa o consumo de comidas exóticas.
- La evolución de los propios microorganismos, cambios en virulencia o patogenicidad, nuevas cepas o la aparición de resistencias.

La inspección de los alimentos es una tarea con larga experiencia en nuestro entorno pero sin duda, la aplicación de la nueva normativa europea conocida coloquialmente como "paquete de higiene" ha mejorado y consolidado aspectos muy importantes de la seguridad alimentaria.

El Reglamento 882/2004 define el Control Oficial y marca sus objetivos así como el funcionamiento, las actividades, los métodos y las técnicas de control. Dado que la responsabilidad de la disposición de alimentos inocuos corresponde al operador (empresario) y que el Control Oficial verifica el cumplimiento de las obligaciones legales de éste, no encontramos ante un sistema de "control público del autocontrol privado".

Para el desarrollo de esta competencia de control público la Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria (APSSA) dispone de un Plan de Control Oficial enmarcado en el Plan Plurianual de Control de la Cadena Alimentaria de España, con los siguientes objetivos:

1.- Conseguir un elevado y adecuado nivel de protección de la salud de los ciudadanos.
2.- Prevenir las enfermedades trasmisibles por vía alimentaria, así como reducir su incidencia y prevalencia.
3.- Minimizar la presencia de los peligros biológicos, físicos y químicos en los alimentos.
4.- Prevenir nuevas amenazas o riesgos emergentes-reemergentes.
5.- Informar a los ciudadanos y aumentar su confianza.

La consecución de estos objetivos exige de una organización y de los medios necesarios que permitan afrontar con éxito la complejidad del sistema alimentario. Podemos reflejar esta complejidad en los siguientes aspectos:

- Un elevado número de industrias y establecimientos alimentarios en Castilla y León. Existen más de 8.400 industrias alimentarias y cerca de 40.000 establecimientos alimentarios.
- La heterogenicidad de las actividades y de los sectores; se trabaja con 18 sectores diferentes.
- La amplia normativa reguladora del sector alimentario. La Agencia maneja en su Plan más de 570 disposiciones legales entorno a la seguridad alimentaria.
- La ingente cantidad de requisitos a verificar. En algunos sectores superan los 400 requisitos, lo que conlleva a que en las actividades de Control Oficial que realizan los inspectores se generen más de 8 millones de datos que deben ser registrados y evaluados.

En la realización del Plan de Control Oficial la APSSA cuenta con 636 agentes de la autoridad sanitaria (inspectores) que trabajan en 157 zonas básicas de salud realizando anualmente más de 140.000 controles oficiales que incluyen actuaciones de inspección, así como la supervisión y verificación de los planes de autocontrol de todos los operadores del sector de la industria y establecimientos alimentarios.

Igualmente la Consejería de Sanidad dispone de una Red de Laboratorios de Control Oficial que practican las pruebas analíticas que con significado sanitario se realizan en el campo de la seguridad alimentaria. La APSSA viene realizando un importante esfuerzo en la acreditación de los laboratorios a la norma ISO/IEC 17025, e incrementando el número de técnicas y matrices con objeto de apoyo a los programas o planes de Control Oficial.

Es importante remarcar que ningún Plan de Control oficial va tener éxito sino se aplica de forma completa, es decir, desde el principio de la cadena alimentaria "de la granja a la mesa". La integración entre el Control Oficial del área competencial de la salud pública y el Control Oficial de la administración competente en materia de producción primaria (Consejería de Agricultura y Ganadería) es la piedra angular de la seguridad alimentaria. Debemos por lo tanto poner en práctica efectiva el principio "from the farm to the fork" que no es otro que la versión moderna y ampliada de nuestro conocido "hygia pecoris salus populi". Este planteamiento completo e integral pretende actualmente consolidarse y fortalecerse con el anteproyecto de la nueva Ley de Salud Pública y Seguridad Alimentaria de Castilla y León.

La APSSA de la Consejería de Sanidad dispone actualmente de 182 instrucciones y procedimientos que se agrupan en 6 programas con objeto de realizar su Plan de Control Oficial.

1º. Programa de autorizaciones y registros sanitarios. Se trata de un mecanismo de control mediante el cual se somete a los operadores a registros, autorizaciones, comunicaciones y declaraciones que se establecen en el ordenamiento sanitario. La instalación, funcionamiento, modificación y cierres de las actividades sometidas a autorización, deben ser comunicadas y autorizadas por la APSSA. El registro es la base de la planificación del Control Oficial y permite actuar con rapidez en casos de alertas o emergencias.
2º. Programa de vigilancia y control en industrias y establecimientos alimentarios (PVyC). Este programa consiste en una serie de actuaciones permanentes que lleva a cabo la Agencia para verificar el cumplimiento de la legislación en el ámbito de la seguridad alimentaria. Se basa principalmente en métodos y técnicas de inspección, verificación, supervisión y auditoria de los planes de autocontrol. Estos controles oficiales se realizan basándose en procedimientos documentados con el objeto de que el criterio sea uniforme y constante y la frecuencia de estos es proporcional al riesgo y a la naturaleza del peligro.
3º. Programa de control analítico. La toma de muestras y el análisis de alimentos (más de 13.000 determinaciones analíticas anualmente) constituye una herramienta adecuada para verificar el cumplimiento de la normativa sobre seguridad e higiene de los alimentos. Las tomas de muestras para análisis en el marco de este programa de control pueden ser reglamentarias o prospectivas dependiendo del tipo de control que se lleve a cabo.
4º. Programa de situaciones de alertas, emergencias y crisis. En este programa se recogen los procedimientos y actuaciones que deben realizarse cuando se producen situaciones de alertas, de brotes de intoxicaciones alimentarias o en situaciones de emergencia o crisis. La situación de alerta viene definida por la existencia de un riesgo grave para la salud del consumidor y que requiere de una actuación rápida y eficaz de las autoridades sanitarias y los operadores. Cuando confluyen situaciones excepcionales de alertas cuya gestión es compleja y no solucionables por los métodos habituales podrían llegarse a situaciones de crisis.
5º. Programa de auditorías del control oficial. El artículo 4 del Reglamento 882 establece que las autoridades competentes deben realizar auditorías internas u ordenar que se realicen auditorías externas del Control Oficial. El objetivo de las auditorías al Control Oficial no es otro que la mejora del sistema de inspección y son realizadas por estructuras diferentes a las que realizan la inspección en Control Oficial.
6º. Programa de promoción de la salud. La promoción de la salud, la educación sanitaria y la comunicación del riesgo es otra de las actuaciones desarrolladas por la APSSA. De esta manera se realizan importantes campañas enfocadas a los riesgos y los hábitos que previenen de los mismos. Para estas labores se presta especial atención a los contenidos que se proporcionan a través del portal de salud, www.salud.jcyl.es/seguridadalimentaria como herramienta clave de comunicación en nuestra sociedad moderna y además las Agencia dispone de 370 expositores distribuidos por más de 300 centros públicos que facilitan la difusión de los mensajes sanitarios.
Los resultados del Control Oficial en 2009 pueden resumirse en las siguientes cifras:
1.- 141.650 controles oficiales donde en el 3,31% de industrias/establecimientos se han detectado incumplimientos/infracción. Dentro de estos incumplimientos el 26,8% son debidos a la higiene de los locales, el 16,6% a higiene en los procesos y el 3,7% a la higiene personal.
2.- 789 expedientes sancionadores resueltos.
3.- 38 alertas alimentarias (9 de ellas de origen biológico).
4.- Vigilancia sanitaria en 29 brotes de intoxicaciones alimentarias.

C15 FINANCIACIÓN PÚBLICA NACIONAL A LA I+D+I EN AGROALIMENTACIÓN A TRAVÉS DE CENTRO PARA EL DESARROLLO TECNOLÓGICO INDUSTRIAL.

D. Carlos Franco Alonso
Dpto. de Coordinacion y Dinamización. Dirección de tecnología – Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial CDTI. C/ Alfonso XI, 6 28014 Madrid.
CIFA@cdti.es

El CDTI es una Entidad Pública Empresarial creada en 1977 adscrita al Ministerio de Ciencia e Innovación, siendo su objetivo ayudar a las empresas españolas a elevar su nivel tecnológico mediante:

- Apoyo a la realización de proyectos empresariales de I+D
- Gestión y promoción de la participación de empresas españolas en programas internacionales de cooperación tecnológica.
- Apoyo a la creación de empresas de base tecnológica.
- Apoyo a la transferencia tecnológica y la cooperación en el ámbito empresarial.

Actuaciones en el ámbito nacional

- ⇨ Evaluación y financiación de proyectos de I+D+i (ayudas reembolsables, ayudas parcialmente reembolsables y subvenciones).
- ⇨ Emisión de informes motivados para deducciones fiscales en I+D+i.
- ⇨ Financiación de nuevas empresas de base tecnológica (NEOTEC y NEOTEC Capital Riesgo).

Actuaciones en el ámbito internacional

- ⇨ Gestión de programas internacionales de cooperación tecnológica (Programa Marco, Eureka, Iberoeka, bilaterales…).
- ⇨ Apoyo a la transferencia de tecnología al exterior (Red Exterior).

Actuaciones en aeronáutica, espacio y retornos Tecnológicos

- ⇨ Ayudas a la I+D+i Aeronáutica.
- ⇨ ESA.
- ⇨ Suministros tecnológicos (CERN/ESRF, Hispasat /Eumetsat/Spainsat).

Principios de actuación en el apoyo de CDTI a la I+D empresarial:

1. Principal organismo a nivel de la AGE para la financiación de la I+D empresarial
2. Unicidad de proyecto.
3. Convocatoria abierta.
4. Interlocución continua en la evaluación.
5. Máxima cobertura financiera posible.
6. Máxima intensidad posible.
7. Refuerzo coordinación con CC.AA.

Iniciativa Neotec

Su objetivo es desarrollar una estructura de apoyo físico y virtual que facilite la generación y consolidación de nuevas empresas de base tecnológica innovadora, priorizando las iniciativas empresariales surgidas de los resultados de I+D del ámbito universitario y/o de centros de investigación".

- Programa de apoyo a emprendedores noveles, no diversificación de empresas existentes. Debe reflejarse en la estructura del accionariado.
- Antigüedad de la empresa menor de 2 años.
- El presupuesto recoge todos los gastos de la empresa a dos años desde la solicitud.
- La empresa deberá aportar en capital al menos el 30% del presupuesto total. No se exigirán garantías adicionales.
- Informe auditado de gastos I+D > 15%. Calificación de empresa joven e innovadora. Recomendado por agencia de certificación acreditada por ENAC.
- Compromiso de permanencia del personal vinculado

Modalidad de financiación en Neotec:

- Ayuda reembolsable: Crédito sin interés hasta el 70% del presupuesto o hasta 350.000€. Para empresas de Biotecnología puede llegar a 600.000€.
- Pago por CDTI en dos veces: anticipo a la firma del contrato (entre 40-60%) y a la finalización del proyecto el resto.
- A devolver cuando la empresa obtenga cash-flow positivo en cuotas anuales de entre el 10-20% del cash-flow generado hasta la amortización total del préstamo.

Características generales de la financiación CDTI:

- ➢ Los solicitantes / beneficiarios directos de la ayuda CDTI tienen que ser sociedades mercantiles, sociedades cooperativas o SAT (se excluyen las sociedades civiles)
- ➢ Los organismos de investigación en los proyectos CDTI han de ir subcontratados, tanto en proyecto individuales como en cooperación (no pueden ser socios del consorcio)
- ➢ Presupuesto mínimo por proyecto individual (y por subproyecto en proyectos en cooperación): 240.000 Euros.
- ➢ Capítulos del presupuesto:
  - Activos Fijos utilizados en el proyecto (amortización)
  - Mano de obra
  - Materiales (fungibles, materias primas, prototipos…)
  - Colaboraciones Externas (subcontrataciones con otras empresas, centros de investigación, autónomos…)
  - Otros gastos (Costes indirectos, auditoría de gastos)
- ➢ La empresa tiene que asumir con los recursos que genera un mínimo del 25% del presupuesto total del proyecto.
- ➢ Con el fín de asegurar el carácter incentivador de la ayuda, sólo se pueden financiar proyectos que NO hayan comenzado antes de la fecha de solicitud, salvo la realización de estudios de viabilidad.
- ➢ No se exigirán garantías a pequeñas empresas por debajo de 500.000 Euros de riesgo vivo con CDTI.
- ➢ Anticipo del 25% de la ayuda para todas la empresas (con un límite de anticipo de 300.000 Euros)
- ➢ Posibilidad de solicitar prefinanciación bancaria (crédito puente); Si la empresa eligiera esta opción, percibiría un alto porcentaje de la aportación CDTI (hasta un 75%) vía un préstamo bancario en condiciones preferentes, cuya amortización se produciría con el desembolso de la aportación CDTI (último hito del proyecto). El tipo de interés es Euribor - 1

Criterios de evaluación de los proyectos presentados en CDTI

- ➢ Calidad y viabilidad económica, técnica, comercial y financiera del proyecto.
- ➢ Calidad del plan de trabajo planteado.
- ➢ Resultados económicos esperados. Mercado potencial. Impacto socio-económico.
- ➢ Valoración económico-financiera del proyecto.

Además, en los consorcios:

- Complementariedad y equilibrio del consorcio.
- Desarrollo tecnológico relevante para la región y con proyección internacional
- Trabajo en equipo entre empresa y centros de investigación
- Valoración económico financiera de las empresas del consorcio.
- Impacto en la comunidad autónoma.

Condiciones financieras de los instrumentos CDTI de apoyo a proyectos de I+D empresarial

- Financiación de hasta el 75% del presupuesto.
- Ayuda Parcialmente Reembolsable (APR):
  - Tramo Reembolsable: Crédito con 0% interés a devolver en 10 (7+3) años.
  - Tramo No Reembolsable

Proyectos individuales:

Tipo de Proyecto	% de la APR
Proyectos de Cooperación Internacional (Eureka, Iberoeka, Bilaterales…)	33 %
Proyectos de Investigación en Colaboración con Centros de Investigación (Universidad, OPI, Centro Tecnológico)	25%
Resto de Proyectos	15%

Proyectos en cooperación:

	% de la APR	
Región	Integrados y Coop. entre pymes	Cooperación Interempresas
Convergencia, *phasing in* y *phasing out*	33%	Hasta el 25 %
Competitividad	Hasta el 25%	Hasta el 20%

C16 NUEVOS ENFOQUES PARA LA GESTIÓN DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Prof. Dr. Gonzalo Zurera Cosano
Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Córdoba
gzurera@uco.es

En las últimas décadas, el alcance y complejidad de la gestión de la seguridad alimentaria a nivel operacional ha aumentado de forma significativa. Los cambios en el estilo de vida, composición demográfica y el efecto de la globalización en el mercado internacional de alimentos, a hecho crecer rápidamente en tamaño y variedad el suministro de alimentos. Para mantener el ritmo en todas las escalas de la cadena alimentaria y la diversificación de alimentos en el mercado, ha sido necesario adaptar y mejorar los sistemas de gestión de seguridad alimentaria continuamente. En la actualidad el control sobre la seguridad y la calidad de los alimentos producidos se está llevando a cabo con la solvencia y eficacia alcanzables. Los sistemas de seguridad alimentaria como el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC), las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) están proporcionando unas herramientas excelentes (van Schothorst, 2004). Excelentes con tal de que se usen para diseñar y aplicar un proceso industrial a un alimento específico de una manera apropiada y diligente. Habitualmente, gobiernos e industria alimentaria deben ponerse de acuerdo para desarrollar buenos planes APPCC y sistemas de seguridad alimentaria que estén basados en principios comparables, que sean muy específicos y que faciliten la producción de alimentos para los que se han desarrollado.

Se han producido considerables avances en el establecimiento de procedimientos para mejorar la gestión de seguridad microbiológica alimentaria. El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI) y la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) han jugado un papel significativo en este proceso. El ICMSF publicó un volumen en el que discutió la introducción de los Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSOs) en la gestión de seguridad alimentaria como un medio para traducir "riesgo" en los objetivos definibles para los sistemas de gestión operacional de seguridad alimentaria (ICMSF, 2004).

ILSI Europa ha publicado varios informes en los que pretendía describir cómo las herramientas disponibles de gestión de seguridad alimentaria, actúan recíprocamente entre sí. Estos incluyen el uso del APPCC (ILSI, 1998) y su validación y comprobación (ILSI, 1999). En el año 2003 se celebró un workshop conjunto ILSI Europa/ICMSF, sobre "Impacto de los Objetivos de Seguridad Alimentaria en la Gestión de la Seguridad Microbiológica de los alimentos", en el que se consideró el potencial del nuevo concepto de objetivos de seguridad alimentaria en los procedimientos existentes de gestión de seguridad alimentaria (ILSI, 2004).

OBJETIVOS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA. UN NUEVO CONCEPTO PARA LA GESTIÓN DE LA SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS.

En muchas áreas de la cadena alimentaria, la seguridad microbiológica es la mayor preocupación de riesgo que ha llevado a un enfoque más amplio de la salud pública y de los métodos para establecer claros objetivos de salud. Dada la dificultad de usar metas de salud pública como un nivel apropiado de protección (ALOP) para establecer las medidas de control, el concepto de objetivos de seguridad alimentaria (FSOs) fue introducido para proporcionar una guía significativa a la gestión de seguridad alimentaria en la práctica.

Mientras que los científicos involucrados en la ICMSF, FAO, OMS y el Códex han ido participando y debatiendo sobre el desarrollo y aplicación de los ALOPs y FSOs, la comunidad científica en general ha tenido una información más limitada de estos conceptos. Con el workshop conjunto ILSI/ICMSF (ILSI, 2004), se proporcionó la primera oportunidad a los profesionales de la gestión de la seguridad alimentaria para considerar estos problemas a fondo. Se produjo un acuerdo unánime en que la unión entre la gestión práctica de seguridad alimentaria y los objetivos de salud pública proporcionados por el concepto ALOP/FSO era deseable y plausible. Sin embargo, considerado el impacto de la integración del concepto con las herramientas de gestión de seguridad alimentaria actuales, puede producirse una confusión considerable en la terminología utilizada, particularmente para objetivos de rendimiento, criterios de funcionamiento, de proceso y de producto. En la siguiente tabla se clarifican dichos términos:

También se consideró un momento oportuno para renovar las estrategias de colaboración internacional en la colección de datos microbiológicos. Deben desarrollarse pautas en el formato y tipo de datos con los que poder hacer las valoraciones de riesgo microbiológico y el desarrollo sucesivo de ALOPs y FSOs que lleven a solventes y objetivas decisiones políticas. Es muy importante que los FSOs se alcancen mediante las buenas prácticas de fabricación y de consumo y cuando se busque mejorar las normas de protección de salud pública, la industria debe poder alcanzar tales normas en la práctica comercial. Este proceso presentará un nuevo desafío enfocado a que el gobierno, la ciencia y la industria actúen en el futuro de forma conjunta.

ARMONIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA EN EL COMERCIO INTERNACIONAL.

Con el incremento del comercio internacional de alimentos y el hecho de que las industrias en un país puedan proporcionar materias primas o productos terminados a otros fabricantes para un gran número de consumidores que vivan en países importadores, es extremadamente importante establecer una armonización de los procedimientos de control de la seguridad alimentaria. La Organización Mundial del Comercio (OMC) ha sido una fuerza esencial para estimular el concepto de equivalencia, introducido en el Acuerdo en Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (WTO, 1995). En este acuerdo, y a causa de las diferencias, cada miembro de la OMC debe aceptar las medidas sanitarias de otros miembros como equivalentes a sus propias medidas, con tal de que ellos ofrezcan el mismo nivel de protección. En 2003, la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) adoptó las pautas para la valoración de equivalencia de las medidas sanitarias asociadas a la inspección de alimentos y sistemas de certificación (CAC, 2003). Previamente, la FAO y la OMS celebraron una consulta colectiva en Kiel para explorar los principios y establecer las pautas para incorporar la valoración del riesgo microbiano en el desarrollo de normas de seguridad alimentaria, pautas y textos relacionados (FAO/WHO, 2002). En esta consulta, conceptos como el ALOP y los FSOs se discutieron en detalle. El Codex Alimentarius, bajo los auspicios de FAO y OMS, está diseñando las pautas para la gestión de riesgo microbiológico en la que se espera que se amplíen estos conceptos.

En el año 1995 la CAC solicitó a la ICMSF el desarrollo de un documento sobre la gestión de patógenos en los alimentos en el comercio internacional. La ICMSF concluyó en 1996 que dicha gestión debería utilizar documentos que existían en el Codex y que deberían estar en la línea de los requisitos del Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio, que establecía que los alimentos podrían importarse sin restricciones si no ponían en peligro el ALOP para el consumidor en el país importador. En ese mismo acuerdo se identificaba la E*valuación del Riesgo (ER)* como una herramienta para establecer si un alimento ponía o no en peligro el ALOP, pero no abordaba cómo tendría que expresarse dicho nivel de protección, o cómo debería establecerse.

La ICMSF reconocía que sería difícil para la industria demostrar que un producto cumple el ALOP de un país importador si ese nivel se expresa en términos como «el número de casos por 100,000 habitantes que provoca un determinado peligro en un alimento dado». Por otra parte, las herramientas del Codex para garantizar la seguridad del alimento eran: i) los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) y las Buenas Prácticas de Higiene (BPH), ambos recogidos en el documento del Codex *Principios Generales de Higiene de los Alimentos*, revisados por última vez en el año 2003 (CAC, 2003); y ii) los *Principios para Establecer y Aplicar Criterios Microbiológicos en Alimentos* (CAC, 1997).

En el sistema APPCC, los peligros se controlan eliminándolos del alimento o reduciéndolos hasta niveles aceptables. La CAC entendía que tales niveles aceptables no deberían poner en peligro el ALOP. Sin embargo, mientras el ALOP no se exprese como «el nivel de un peligro que sería aceptable en un alimento», la industria no sabría cuál es el nivel aceptable en el sistema APPCC. La ICMSF sintió así la necesidad de desarrollar el concepto de Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO), de acuerdo con el concepto de objetivos de calidad en los estándares de aseguramiento de calidad y de gestión de calidad y con la incorporación de los FSOs en un sentido global.

La intención era que el FSO convirtiera el ALOP en la máxima frecuencia y/o concentración de un peligro considerado como admisible para proteger al consumidor. El FSO se trasladaría a la industria alimentaria en forma de nivel y /o frecuencia que no se debe superar en un alimento en el momento del consumo a través de un procesado eficaz en la industria.

Se consideró que el resultado de una evaluación del riesgo, al estar expresado en las mismas unidades que el ALOP (p. ej., número estimado de casos al año), sería útil para establecer el FSO.

Así pues, en 1996 la ICMSF recomendó a la Secretaría del Codex seguir un método, constituido por fases, para la gestión de patógenos en alimentos consistente en: *(a)* llevar a cabo una evaluación del riesgo microbiológico; *(b)* desarrollar un FSO; *(c)* confirmar que el FSO se puede lograr técnicamente aplicando sistemas APPCC y BPH; *(d)* establecer los criterios microbiológicos cuando fuese necesario y *(e)* establecer otros criterios de aceptación para alimentos en el comercio internacional.
La ICMSF hacía la recomendación de que los gobiernos establezcan los FSOs para comunicar a las industrias el límite máximo de un peligro en un alimento.

MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA COMO HERRAMIENTA EN LA GESTIÓN DE LA SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

La microbiología predictiva es un área de la microbiología de los alimentos que estudia las repuestas microbianas a factores medioambientales bajo condiciones controladas y definidas; por esta razón, la microbiología predictiva se viene denominando en los últimos tiempos como «ecología cuantitativa microbiana de los alimentos». Las respuestas son cuantificadas y resumidas mediante ecuaciones matemáticas que, mediante interpolación, pueden predecir respuestas microbianas a nuevas condiciones, es decir, aquéllas que no han sido estudiadas. Uno de los aspectos más importantes del desarrollo de modelos predictivos es asegurar que las predicciones dadas por el modelo son aplicables a situaciones reales. Este proceso se denomina validación. Una vez que un modelo ha sido validado en un producto, puede emplearse en cualquier punto de la cadena de la granja a la mesa", desde la producción primaria, transformación en industria hasta la distribución y venta del producto. Los modelos predictivos se están empleando ya en los sistemas APPCC, en el desarrollo de nuevos productos y en la ERM.
La Evaluación del Riesgo microbiológico (ERM) trata de estimar la probabilidad y severidad de adquirir una enfermedad alimentaria debido al consumo de un alimento o grupo de alimentos que son susceptibles de contaminación por un patógeno. Dentro de la ERM, la evaluación de la exposición estima la exposición de una población al patógeno; esto es, el número de patógenos (dosis) ingeridos con el alimento. Por tanto, si se quiere obtener una información exacta, habría que "quitar de las manos del consumidor" el producto y analizarlo; esto es, cuando menos, impensable. Sin embargo, las definiciones de ERM y evaluación de la exposición no se modifican pese a los impedimentos prácticos. El panorama que se le presenta al asesor del riesgo le obliga a tomar, por lo general, una de estas dos decisiones: *i)* asumir que los datos de concentración del patógeno en el alimento en un determinado momento a lo largo de la cadena "de la granja a la mesa" (p. ej., recién traído de la industria al punto de venta) son los mismos que en el momento de consumo; o *ii)* aplicar modelos predictivos adecuados en aquellas etapas de la cadena "de la granja a la mesa" en las que se modifique la concentración de patógeno en el alimento. La primera decisión es muy acertada cuando se demuestra que no existe crecimiento ni inactivación del patógeno previo al consumo del alimento. La segunda opción, la aplicación de modelos predictivos, es una práctica ampliamente extendida en todas las evaluaciones de riesgo cuantitativas disponibles, http://www.foodrisk.org/risk_ assessment.cfm).
Además de su aplicación en el ámbito de la ERM, la microbiología predictiva juega también un papel muy importante en la consecución de algunos criterios microbiológicos. Tal es el caso de los criterios que establece el Reglamento (CE) Nº 2073/2005, *de 19 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios* para *L. monocytogtenes* en la categoría de «alimentos listos para consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales».

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAC (Codex Alimentarius Commission) 1997. *Principles for the stabhlisment and application of microbiological criteria for foods,* CAC/GL 21-1997. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome.
CAC (Codex Alimentarius Commission) 2003. *Guidelines for the judgement of equivalence of sanitary measures associated with food inspection and certification systems*, CAC/GL48-2003. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome.
FAO/WHO, 2002. *Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts.* Report of a joint FAO/WHO consultation. Kiel, Germany.
ICMSF, 2004. *Microorganismos de los alimentos 7: Análisis microbiológico en la gestión de la Seguridad Alimentaria.* Acribia, Zaragoza.
ILSI (International Life Sciences Institute) 1998. Food safety management tools. Report series. Washington, DC: ILSI Press
ILSI (International Life Sciences Institute) 1999. Validation and verification of HACCP. Report series. Washington, DC: ILSI Press
ILSI (International Life Sciences Institute) 2004. Food safety objectives- role in microbiological food safety management. ILSI Europe Report series. Washington, DC: ILSI Press
Reglamento (CE) Nº 2073/2005, de 19 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios
van Schothorst, M. 2004. *A simple guide to understanding and applying the Hazard Analysis Critical Control Point concept.* (3rd ed.). Concise Monograph Series, ILSI Europe, Brussels.
WTO (World Trade Organisation) 1995. The WTO agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures (SPS Agreement). http://www.wto.org/ english/tratop_e/sps_e/spasagr_e.htm.

C17 ECOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS: DEL MEDIO AMBIENTE AL HOSPITAL

Prof. Dr. Bruno Gonzalez Zorn
Dpto de Sanidad Animal y Centro de Vigilancia Sanitaria. Universidad Complutense de Madrid.
bgzorn@vet.ucm.es

La resistencia a antimicrobianos representa en la actualidad una de los mayores retos en la lucha contra las

patologías bacterianas, tanto en Salud Pública como en Sanidad Animal. Para evitar su avance, es trascendental detectar de forma precoz la emergencia de nuevas bacterias y nuevos mecanismos de resistencia a antimicrobianos.
En línea con estas prioridades, cada día se describen más mecanismos de resistencia, que parecen emerger de la nada en hospitales y en la comunidad. La diseminación de estos mecanismos, así como de otros genes de resistencia asociados genéticamente a ellos, suponen un grave retroceso en la lucha contra los patógenos bacterianos. Estamos aprendiendo, poco a poco, que la lucha contra el avance de la resistencia a antimicrobianos no puede empezar en hospitales o animales domésticos, sino que debe englobar todas las esferas ecológicas posibles, incluyendo los alimentos y el medio ambiente.
Esta aproximación nos está permitiendo, por primera vez, conocer el origen de los mecanismos de resistencia, el papel de los alimentos y animales en la dispersión de estos mecanismos. Estos datos son de enorme importancia para detener el avance de estos la resistencia a antimicrobianos, que amenazan con la utilidad de estas moléculas en la lucha contra las infecciones bacterianas.
Los antibióticos representan una de las herramientas más eficaces para la lucha contra las enfermedades producidas por bacterias. Gracias a ellos, enfermedades que antes constituían una amenaza para la vida, como las neumonías bacterianas, tuberculosis, gangrena, cólera o fiebres puerperales, se han controlado en todo el mundo. Además, el tratamiento antibiótico post-quirúrgico para evitar las infecciones tras una intervención, ha sido clave para el desarrollo de la cirugía en todos sus ámbitos. No cabe duda de que el descubrimiento de los antibióticos (*sensu stricto* deberíamos hablar de antimicrobianos, que engloban moléculas sintéticas y naturales) ha sido uno de los avances biomédicos más importantes de la humanidad. Desde la comercialización a gran escala de la penicilina G en 1945, el hombre ha desarrollado un gran número de antibióticos, que han sido esenciales para que la humanidad pueda llegar al s. XXI tal y como la conocemos actualmente.
Desde un punto de vista global, la utilización de los antibióticos ha supuesto una intervención en nuestro ecosistema. La producción industrial de los antibióticos ha permitido su diseminación en el medio ambiente, en el hombre y en los animales. En este sentido, los organismos que más se han visto afectados han sido precisamente las bacterias. Las bacterias no son partículas inertes. Son los seres vivos que cuentan con más representantes, tanto en cantidad como en diversidad, en nuestro planeta. El secreto del éxito de las bacterias se basa en una tasa de multiplicación muy elevada (algunas se dividen en menos de una hora) y en su plasticidad genética, que les confiere una extraordinaria capacidad de adaptación a ecosistemas variantes. Solamente en el intestino de un ser humano, conviven bacterias de más de mil especies distintas, y fuera del hombre ocupan todos los nichos ecológicos que conocemos.
Las bacterias que hoy día dominan el mundo de las enfermedades no son aquéllas que morían con penicilina G en los años 50, sino que son otras derivadas de ellas, que poseen la información genética para resistir a los antibióticos, que necesitan ser combatidas con antibióticos de última generación. Y aquí es donde estamos generando un grave problema. Mientras que en el siglo pasado, el hombre desarrolló prácticamente todos los antibióticos, llevamos tres décadas sin descubrir ninguna familia de antibióticos nueva, y con la altísima velocidad de multiplicación bacteriana, este tiempo representa millones de años de adaptación para las bacterias. De hecho, hoy día no existe ningún género bacteriano del que no se hayan aislado individuos que resistan a todas las familias de antibióticos disponibles en la práctica clínica. Esto es muy preocupante. El abuso de la utilización de los antibióticos es uno de los hechos principales que nos ha llevado a la situación actual. En este sentido, la campaña por un uso racional de los antibióticos del Ministerio de Sanidad y Consumo, por segundo año consecutivo, es un acierto. Cuantas menos moléculas de antibiótico se utilicen, menos bacterias se verán enfrentadas a ellas, y más despacio desarrollarán mecanismos de resistencia. El control estricto sin excepciones de la prescripción de antibióticos por parte de médicos, veterinarios y odontólogos es clave en esta batalla.
Sin embargo, esto no es suficiente. La receta obligatoria sin excepciones lleva años aplicándose en Suecia, Finlandia, Dinamarca, Alemania, EE.UU. o el Reino Unido, y las resistencias a los antibióticos siguen siendo el mayor problema de Salud Pública en estos países, donde la resistencia bacteriana a antibióticos es un fenómeno en expansión. El uso y abuso de estas moléculas, así como la desidia de la industria farmacéutica en estos últimos decenios a desarrollar nuevas familias de antimicrobianos, unido a la dificultades administrativas y legales para poner en el mercado nuevos fármacos, ha hecho que la salud del hombre, y en consecuencia, la nuestro entorno, dependa desde hace veinte años de las mismas familias de antimicrobianos.
La aparición de resistencias a antimicrobianos en los alimentos tiene una especial relevancia, que se proyecta en tres esferas principales:
1.) Sanidad Animal: El número de patologías en Sanidad Animal en las que están implicados agentes bacterianos es muy extenso. De hecho, estas patologías son, junto con aquéllas producidas por virus y parásitos, las consideradas como la primera causa de muerte en animales de producción. En este sentido, el uso, ya sea terapéutico o preventivo de los antibióticos, reduce la aparición de estas patologías, y permite el control de un gran número de infecciones. La aparición de resistencias disminuye la efectividad de los antibióticos, y origina la aparición de brotes que, anteriormente, podían ser controlados con antibioterapia. Asimismo, la aparición de resistencias en nuestros animales genera una gran alarma, tanto social como por parte de las autoridades sanitarias, que puede llevar incluso a la prohibición del uso de ciertos antimicrobianos en Sanidad Animal. Esto ya ha ocurrido en nuestro país con los promotores de crecimiento, y recientemente en los EE.UU. de América con la prohibición del uso de fluoroquinolonas en animales de producción.

2.) Salud Pública: A través del control en alimentos, debemos salvaguardar la salud humana evitando la diseminación de bacterias resistentes al sector público. En este sentido, nuestra función se basa en disminuir, y si es posible evitar, la diseminación de resistencias a antimicrobianos desde las bacterias presentes en los animales al hombre. Cuando se produce la diseminación, disminuye el arsenal terapéutico disponible en medicina humana para hacer frente a las patologías que implican agentes bacterianos. Además, estas patologías han aumentado de forma muy considerable en estos últimos años, especialmente debido al gran número de individuos inmunocomprometidos, así como a la incremento de las infecciones nosocomiales.
3.) Producción Animal: El desarrollo en Producción Animal de un país depende, principalmente, del coste que suponga al empresario, o en su caso a las instituciones públicas. En este sentido, los costes derivados de la utilización de antimicrobianos, unido a los tiempos de espera necesarios para la comercialización de los productos derivados de las explotaciones, se traducen en un coste adicional para el ganadero, hace que sea una parte importante dentro de la sostenibilidad de las explotaciones. Las resistencias obligan a la utilización de antibióticos más nobles, de mayor coste, y de períodos de espera generalmente más prolongados, que condicionan gravemente la rentabilidad de nuestras explotaciones.
Aquí presentaremos la evidencia actual, de que los mecanismos de resistencia emergentes en el hombre actualmente no se generan en los hospitales, sino que provienen de la naturaleza, donde tienen papeles muy diversos. La selección natural así como el flujo de plataformas genéticas que vehiculan estos mecanismos, es el que determina la aparición de los mismos. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación, a fuoroquinolonas y a aminoglucoósidos son claros ejemplos, que expondremos aquí. Nuestro grupo ha identificado la emergencia de un aislado de *Escherichia coli* resistente a todos los aminoglucósidos y disponibles en la práctica clínica (kanamicina, gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, estreptomicina, espectinomicina...). La dispersión de esta cepa, o de sus mecanismos de resistencia, ya sea en el ámbito animal, como en su transferencia al hombre a tarvés de los alimentos, podría inutilizar completamente la efectividad de los aminoglucósidos en el mundo.
Los aminoglucósidos son antibióticos de amplia utilización contra infecciones causadas principalmente por microorganismos Gram-negativos. Sin embargo, al igual que ha ocurrido con otras familias antibióticas, desde su aparición en el mercado se ha descrito la aparición de resistencias.
Actualmente, se han descrito tres mecanismos por los cuales las bacterias pueden ser resistentes a aminoglucósidos en patógenos animales:
1.) Disminución de la acumulación interna del antibiótico por una reducida permeabilidad de la membrana externa, de la membrana interna, o transporte activo al exterior (eflujo).
2.) Modificación de la diana por alteración de la proteínas que conforman el ARNr 16S.
3.) Alteración enzimática del antibiótico, siendo éste el mecanismo más frecuente.
Las bacterias que producen aminoglucósidos, como *Streptomyces kanamyceticus*, han desarrollado una estrategia alternativa de resistencia para evitar su propio "suicidio" al producir el antibiótico. Este mecanismo de autoprotección es la metilación del ARNr 16S.
El mecanismo de acción de los aminoglucósidos, se basa en la inducción de errores en la transcripción. Esto se debe a que su diana se encuentra en la región del ribosoma, en la cual se reafirma la veracidad de la traducción. Concretamente, se unen a un motivo del ARNr16S, dando lugar a un funcionamiento ribosómico erróneo, y a la muerte de la bacteria. La sustitución o metilación de esta región, que es responsable de la unión del aminoglucósido al ARNr16S de la bacteria, lleva a la disminución de la afinidad del antibiótico por el ARNr16S y, por tanto, a la resistencia de la bacteria a estos antibióticos.
Como hemos mencionado, recientemente hemos identificado que *Escherichia coli,* un aislado de ganado porcino de España, utiliza la metilación del ARNr16S para resistir a los aminoglucósidos. Desde entonces se ha descrito este mecanismo en un gran número de países en el mundo, este año incluso en aislados alimentarios por nuestro grupo, y el análisis detallado de su mecanismo de acción, así como de su forma de transmisión, nos está permitiendo desentramar cuál es el flujo genético entre la naturaleza y nuestros hospitales, y nos permite establecer que necesitamos una aproximación multidisciplinar para intentar comprender y frenar el avance de la resistencia a antimicrobianos en el hombre.

C18 NUEVAS TÉCNICAS DE ELIMINACIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS

*Dra. Nerea, Beguiristain, Cristina, Fuentes, Rosa, Pintó y Albert, Bosch**
Virus Entéricos, Dep. Microbiología e Instituto de Nutrición y Seguridad Alimentaria, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028, Barcelona.
nbeguiristain@ub.edu

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años se están llevando a cabo investigaciones y desarrollo de nuevas tecnologías para mejorar la calidad y seguridad alimentaria mediante la reducción o eliminación de microorganismos alterantes y/o patógenos asociados a cada tipo de alimento. A pesar de que la fabricación tradicional de estos alimentos es muy segura, estos alimentos suelen manipularse para su comercialización y venta y cualquier operación de troceado, lonchado, dosificación o envasado incrementa los riesgos de una contaminación.

La seguridad vírica de los alimentos requiere controlar la presencia de los principales patógenos víricos de transmisión alimentaria. En función de ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la sensibilidad de virus modelo frente a dos tratamientos tecnológicos, uno de ellos emergente en el mundo alimentario como son los pulsos de luz y otro ya establecido pero apenas utilizado, como es la radiación ionizante mediante electrones acelerados; ambos podrían ser una alternativa óptima para lograr reducir el riesgo de enfermedades trasmitidas por alimentos, garantizar su seguridad, minimizar los cambios sensoriales y nutritivos y conseguir que tengan una vida útil adecuada para el uso que se espera de ellos [1].

La tecnología de la irradiación por electrones acelerados se utiliza principalmente para la esterilización de diversos productos de uso médico, así como desinfección de agua y alimentos. No obstante, hasta ahora apenas se han descrito resultados respecto a su eficacia frente a virus. Concretamente la radiación gamma aplicada sobre calicivirus felinos y caninos, modelos *in vitro* de los calicivirus humanos, reduce 3-$\log_{10}$ el título vírico con dosis de entre 100 y 500 Gy. La radiación gamma, a pesar de ser efectiva en bacterias, parece no reducir totalmente la infectividad en el caso de los virus [2].

El procesado mediante luz pulsada, basada en pulsos de luz de amplio-espectro de alta intensidad y corta duración, reduce la carga microbiana de los alimentos sin aumentar significativamente la temperatura de los mismos y sin alterar sus características nutricionales y organolépticas. Diversos trabajos han descrito inactivaciones superiores a los 4-$\log_{10}$ en una amplia variedad de virus tras someterlos a dosis de entre 0.5-1 KJ/cm^2 [3-5].

Basándonos en lo anteriormente descrito, se ha determinado el efecto de inactivación de estas tecnologías emergentes sobre virus entéricos en muestras de jamón cocido. Para ello se han escogido los virus más relevantes de transmisión alimentaria: los Norovirus genogrupo I y II (NoV G-I, NoV G-II) agentes más frecuentes de brotes de gastroenteritis de origen alimentario y su modelo propagable *in vitro* Norovirus murino tipo I (MNV-1), y el virus de la hepatitis A (HAV) causante de la enfermedad de mayor gravedad dentro de las más frecuentes de transmisión por alimentos.

Los objetivos a seguir han sido:

a) Determinar el mejor método de recuperación de virus en la matriz alimentaria (jamón cocido).

a) Determinar un método de cuantificación mediante qRT-PCR de virus no cultivables como estimación fiel de virus infecciosos.

c) Evaluar la inactivación viral producida por dosis crecientes de hasta 16 KGy de radiación ionizante aplicadas sobre muestras de jamón cocido.

d) Estudiar el posible efecto de las altas dosis de radiación sobre la cuantificación mediante qRT-PCR, utilizando virus cultivables que tienen como referencia la cuantificación por infectividad.

e) Conocer el efecto de la aplicación de pulsos luminosos sobre muestras de jamón cocido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la detección de estos virus se han utilizado métodos moleculares de qRT-PCR aunque éstos no reflejan de forma directa la infectividad de los virus detectados[6]. Para ello, se ha intentado refinar estas técnicas moleculares y complementar estos estudios con el uso de los virus modelo cuya infectividad nos sirve como referencia. Debido a la imposibilidad de propagar Norovirus genogrupo I y II, así como cepas salvajes del virus de la Hepatitis A en cultivo celular, se han utilizado virus modelo, como son el norovirus murino tipo I y una cepa adaptada del virus de la hepatitis A, permitiendo, de esta manera, evaluar mediante pruebas de infectividad su supervivencia frente a los tratamientos ensayados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mejores resultados de recuperación del virus de la matriz alimentaria se obtuvieron con una agitación intensa y utilizando PBS + SDS como eluyente dando resultados superiores al 5% de recuperación, lo cual es un porcentaje muy correcto para este tipo de matriz.

Tras aplicar dosis crecientes de 0 a 16 KGy sobre muestras de jamón cocido se puede comprobar que conforme aumentamos la dosis de irradiación aumenta la caída del título infeccioso del virus; sin embargo aplicando la dosis máxima legalmente permitida de 10 KGy, sólo se consigue inactivar entre 2.04-2.15 $\log_{10}$ en el caso del HAV y entre 2.44-2.60 $\log_{10}$ para el MNV-1. Dosis elevadas de hasta 16 KGy de irradiación aumentan la inactivación de los virus HAV y MNV, siendo este último donde se alcanzan hasta 4 $\log_{10}$ de inactivación (3.28-3.44 y 3.89-4.17, respectivamente).

A su vez, se ha observado que los resultados de la cuantificación por qRT-PCR en HAV y MNV no representan la inactivación real de la infectividad. Por dicho motivo, se ha introducido un paso previo a la extracción de ácidos nucleicos que consiste en un tratamiento con RNAasa para eliminar los genomas no encapsidados. El tratamiento con RNasas mejora las pendientes de inactivación (en el caso de la HAV de manera notable) obteniéndose mejores aproximaciones a los virus infecciosos reales. Sin embargo, la dispersión de los puntos tras el tratamiento con RNasas es significativamente mayor, lo que aumenta la variabilidad de los resultados. En función de dichos resultados, se ha querido comprobar si las altas dosis de radicación ensayadas permiten la destrucción de los genomas no encapsidados dando lugar a estimaciones más precisas respecto a la infectividad; los valores obtenidos muestran que no producen efecto alguno.

Respecto a los pulsos de luz, se ha llevado a cabo un ensayo preliminar con dosis de 0.34, 0.55, 0.80, 1.60, 0.95 y 1.90J/cm^2. La luz pulsada no produce inactivación alguna sobre la infectividad del MNV-1. En el caso del HAV,

puede verse un ligero descenso de aproximadamente 1 log $_{10}$. Debido a que dicha técnica es innovadora y su eficacia depende de diversos factores críticos tales como el tipo de de matriz alimentaria (morfología, color, composición y propiedades de absorción transmisión y reflexión de la luz), tipo de empaque del alimento y características de la luz (longitud de onda, intensidad, duración, pulsos de luz, distancia de la lámpara a la muestra y número de destellos de luz pulsada), se esta llevando a cabo un mayor número de pruebas experimentales para profundizar con mayor detalle en el efecto de dicha técnica en los virus inoculados sobre la matriz alimentaria.

CONCLUSIONES

A) El mejor método de elución de virus de jamón cocido incluye un eluyente con detergente (PBS + SDS a 10mM) y una agitación vigorosa.

B) Es necesario añadir RNAasas previamente a la cuantificación genómica, para no cuantificar genomas de virus no infecciosos. Sin embargo, en el caso de NoV-II, no se aprecian diferencias muy significativas con la cuantificación sin tratamiento previo de RNAasas.

C) Los resultados obtenidos tras someter a dos modelos de virus entéricos a la acción de la radiación ionizante mediante electrones acelerados en muestras de jamón cocido ponen de manifiesto la alta resistencia de dichos virus, por lo que dicha tratamiento no resultaría aplicable para la industria alimentaria, ya que se necesitan dosis superiores a las autorizadas por la U.E.

D) Dosis elevadas de radiación ionizante no producen efecto alguno en la destrucción de los genomas no encapsidados, ya que no se aprecian diferencias muy significativas respecto a la cuantificación sin tratamiento previo de RNasas para inactivar HAV y MNV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

N. Elmnasser et al., *Can.J.Microbiol.* 53, 813-821 (2007).
A. M. Roda Husman et al., *Appl.Environ.Microbiol.* 70, 5089-5093 (2004).
D. Huffman, T. Slifko, K. Salisbury, Rose JB, *Water Res.* 34, 2491-2498 (2000).
Y. Lamont et al., *Lett.Appl.Microbiol.* 45, 564-567 (2007).
P. Roberts and A. Hope, *J.Virol.Methods* 110, 61-65 (2003).
S. Nuanualsuwan and D. O. Cliver, *J.Virol.Methods* 104, 217-225 (2002).

C19 MODELIZACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN JAMÓN CURADO

Dra. Sara Bover-Cid[1], Nicoletta Belletti[2], Margarita Garriga[1] y Teresa Aymerich[1]
[1]IRTA. Programa de Seguridad Alimentaria. Finca Camps i Armet, s/n, 17121 Monells.
sara.bovercid@irta.cat
[2]CENTA. Finca Camps i Armet, s/n, 17121 Monells.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los productos listos para el consumo son productos muy apreciados por el consumidor. Sin embargo, la manipulación post-producción (i.e. loncheado y envasado) necesaria para la elaboración de este tipo de productos incrementa el riesgo de contaminación microbiana. *Listeria monocytogenes* es uno de los microorganismos patógenos más relevantes en relación a los productos listos para el consumo. Se trata de microorganismo muy ubicuo capaz de colonizar y prevalecer en superficies de trabajo y maquinaria, y que puede crecer o sobrevivir en muchos alimentos y condiciones, incluso en presencia de una elevada concentración de sal y en refrigeración. Aunque la infección por este patógeno se considera poco frecuente, la tasa de letalidad es muy elevada (del orden del 20-30%) y tiene consecuencias graves especialmente cuando afecta a los grupos vulnerables: ancianos, neonatos, embarazadas e individuos con el sistema inmunitario deprimido (Warriner y Namvar, 2009).

El jamón curado se considera un producto microbiológicamente estable que, por sus características físico-químicas no favorece el crecimiento de *L. monocytogenes*. Sin embargo, *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir en este tipo de producto en caso de una potencial contaminación cruzada durante la manipulación post-proceso. La exigencia de determinados países, como Estados Unidos, en los que se aplica una política de "tolerancia cero" frente a la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, puede representar un problema de cara a la exportación. Así, la eliminación o la reducción de los niveles de *L. monocytogenes* en los alimentos constituye un importante reto para la industria alimentaria, particularmente en relación a la elaboración y manipulación de los productos listos para el consumo.

En este campo, la implementación de nuevas tecnologías puede contribuir a superar este obstáculo de forma efectiva. Las altas presiones (AP) isostáticas constituyen una tecnología de procesado de los alimentos que permite la inactivación de microorganismos vegetativos (bacterias, levaduras y mohos). Como proceso listericida, es particularmente interesante para los productos listos para el consumo y así lo reconocen diversos organismos internacionales, incluido el Codex Alimentarius (CAC, 2007), la administración americana (HHS, 2008) y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (Ordóñez et al., 2004).

Se trata de una prometedora tecnología de conservación como alternativa a la pasteurización térmica. Dado que los alimentos pueden ser tratados en frío o temperatura ambiente, el procesado por AP permite conservar las características sensoriales y nutricionales originales del producto. Además, los cambios de presión son prácticamente instantáneos y uniformes (transmisión isostática), por lo que el efecto del tratamiento no depende del tamaño, volumen y forma del alimento. Sin embargo, la eficacia de las AP en la inactivación microbiana

depende de la composición del alimento. Mientras que pH ácidos potencian el efecto de la AP, valores de actividad de agua bajos ejercen un efecto baroprotector (Patterson, 2005). Además, la resistencia de los microorganismos frente a las AP generalmente es mayor en alimentos que en los sistemas modelo de laboratorio (soluciones tampón y medios de cultivo), por lo que es necesario ensayar aplicaciones concretas en el alimento de interés.
En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que sustentan el interés de las AP y actualmente ya existen diversos alimentos que se comercializan tratados por AP. Sin embargo, para ampliar el uso de esta tecnología y fomentar su competitividad en el campo de la industria alimentaria es necesario proseguir con la investigación. En este sentido el enfoque de la modelización ha sido poco explorado. En concreto, no existen modelos matemáticos que permitan cuantificar y predecir el efecto de los parámetros tecnológicos del procesado por AP (presión, tiempo y temperatura) en relación a la inactivación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos curados listos para el consumo y es en este aspecto donde se enmarca el objetivo del presente trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El jamón curado (a_w = 0,88 y pH=5,84), obtenido directamente del productor, se deshuesó y loncheó asépticamente. Cada loncha se inoculó a una concentración final del orden de 10^7 ufc/g con *L. monocytogenes* CTC1034, cepa aislada de jamón curado. Las muestras inoculadas se envasaron al vacío y se trataron por alta presión según las condiciones definidas por un Diseño Central Compuesto de tres factores: presión (MPa), tiempo (min) y temperatura del fluido (ºC) de presurización. Las muestras para cada tratamiento se prepararon y analizaron al menos por duplicado. Los recuentos de *L. monocytogenes* se determinaron mediante siembra en el medio selectivo cromogénico para *Listeria* (Chromogenic Listeria Agar, CLA, Oxoid). La presencia/ausencia del patógeno se confirmó después del enriquecimiento del homogeneizado en TSBYE (a 37ºC durante 48 h) mediante PCR (Rodríguez-Lázaro et al., 2004).
Se aplicó el Análisis de la Varianza (ANOVA) y los correspondientes contrastes para comparar los resultados de los diferentes ensayos de inactivación. La metodología de superfície de respuesta fue el enfoque empírico seguido para estudiar la relación entre los parámetros del proceso de presurización y la inactivación de *L. monocytogenes*, en términos de reducciones logarítmicas (log (N/N_0)). Dado que la magnitud de las unidades del factor presión (en MPa) eran mayores que las de tiempo y temperatura, la modelización se realizó previa transformación logarítmica de los valores. Se aplicó la regresión lineal multivalente por pasos con el fin de obtener la ecuación polinomial con sólo los parámetros estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inactivación del patógeno tras tratamientos a presiones de 450 MPa o inferiores no fue significativa ($p>0,05$), siendo menor a 1 unidad logarítmica (Log) independientemente de la temperatura y el tiempo de procesado. A presiones superiores (a partir de 600 MPa) el grado de inactivación fue variable según la intensidad y el tiempo del tratamiento.
La resistencia a la presión de *L. monocytogenes* CTC1034 en jamón curado fue mayor que la resistencia descrita en ensayos realizados en medios de laboratorio u otros alimentos, incluidos productos cárnicos listos para el consumo. Como ejemplo, en el presente trabajo, presiones de 600 MPa (9 min) causaron una reducción promedio del orden de 2,9 Logs, mientras que la misma intensidad de presión (durante 3-10 min) provocó más de 7 Logs de reducción en los recuentos de *L. monocytogenes* inoculada en soluciones tampón (Ritz et al., 2000), leche (Chen, 2007) o zumo de frutas (Erkmen y Dogan, 2004). En jamón cocido loncheado, la inactivación conseguida tras un tratamiento de 600 MPa (10 min) superó las 5 Logs de reducción (Koseki et al., 2007). Probablemente, la baja actividad del jamón curado (0,88) en comparación con los productos mencionados ejerció un notable efecto baroprotector (Hereu et al., 2009; Patterson, 2005). Estos resultados indican que los modelos predictivos actualmente disponibles sobre la inactivación de *L. monocytogenes* inducida por AP en otros productos (Gao et al., 2006; Koseki et al., 2007) no son adecuados para predecir el comportamiento del patógeno en jamón curado tratado por AP.
Los datos experimentales resultantes de los ensayos de inactivación por AP permitieron obtener, mediante el ajuste por regresión lineal múltiple, una ecuación polinomial que describe de forma cuantitativa de los efectos de los factores estudiados:

$$\mathbf{Log\ (N/N_0)} = -380{,}32 + 292{,}59\mathbf{[LogP]} - 56{,}13\mathbf{[LogP]^2} + 1{,}41\mathbf{[t]} + 0{,}01\mathbf{[t]^2} - 0{,}64\mathbf{[LogP]\cdot[t]}$$

Siendo **Log (N/N$_0$)** *la inactivación expresada como la diferencia entre el recuento de células viables (ufc/g) después del tratamiento (N) y el inóculo inicial (N_0);*
LogP *la intensidad de presión (MPa) en unidades logarítmicas;*
t *el tiempo de tratamiento (min).*

La bondad del ajuste se confirmó por el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}=0,988), la significación global del modelo ($p<0,0001$) y la ausencia de significación de la prueba *Lack of fit* ($p=0,268$).
De acuerdo con los resultados, la presión y el tiempo de tratamiento fueron los factores determinantes del grado de inactivación de *L. monocytogenes* en jamón curado presurizado. La sensibilidad de *L. monocytogenes* a los cambios de presión fue más destacable que la sensibilidad asociada al incremento del tiempo de procesado. Por tanto, para alcanzar un determinado objetivo de inactivación será preferible incrementar la intensidad de presión y reducir en lo posible el tiempo de tratamiento.

La interacción entre la presión y el tiempo fue estadísticamente significativa, indicando que el efecto de la presión es mayor a tiempos más prolongados. El modelo también incluye los términos cuadráticos de la presión y el tiempo. Para la presión, el término cuadrático se asociaría con un nivel umbral de presión (entorno los 450MPa) por debajo el cual la inactivación bacteriana no sería relevante. En el caso del factor tiempo, el término cuadrático concuerda con la aparición de "colas" de células resistentes. Desde un punto de vista práctico este fenómeno implica que, a partir de un cierto tiempo, la extensión de la presurización no mejora la eficiencia del tratamiento pero supone un incremento del coste económico. Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados, tratamientos más allá de los 10 min no serían adecuados para una implementación comercial de la pasteurización fría por AP del jamón curado. En el intervalo de temperaturas ensayadas (7,6ºC – 24,4ºC), este factor no mostró un efecto significativo en la inactivación por AP de *L. monocytogenes* en jamón curado y, por lo tanto, no se incluyó en el modelo.

Antes de utilizar un modelo matemático con fines predictivos se evaluó el comportamiento del modelo desarrollado mediante una validación externa. Se calcularon los índices de exactitud y precisión a partir de resultados de experimentos de inactivación no utilizados para la construcción del modelo. Además, se consideraron datos publicados en artículos científicos en relación a la inactivación de *L. monocytogenes* inducida por AP en jamón curado (Hereu et al., 2009; Morales et al., 2006; Tanzi et al., 2004). El factor exactitud y sesgo para el modelo desarrollado fue 1,36 y 1,06 respectivamente. Tanto la exactitud como el sesgo obtenido se encuentran dentro de los valores aceptables (Dalgaard, 2000; Ross et al., 2000), lo que sustenta la adecuación del modelo para usos predictivos. El valor de sesgo superior a 1 significa que el modelo proporciona estimaciones ligeramente conservadoras, infravalorando en un 6% el efecto letal de la AP.

Como aplicación práctica del modelo predictivo, a modo de ejemplo, la ecuación matemática puede ser utilizado para definir los criterios de proceso más adecuados que permitan el cumplimiento de los Objetivos de Seguridad Alimentaria (*Food Safety Objectives*, FSO) internacionalmente establecidos para *L. monocytogenes* (Tabla 1).

Tabla 1. Predicción de los criterios de proceso compatibles con los criterios de funcionamiento requeridos para *L. monocytogenes* en función del ámbito de aplicación.

Criterios de proceso[a] *(Presión/tiempo)*	*Criterio de funcionamiento (reducciones logarítmicas)*	*Ámbito de aplicación (producto y Objetivo de Seguridad Alimentaria,FSO)*		Referencia
807 Mpa 5 min	- 6[b]	Producto: FSO:	producto RTE refrigerado 0,04 células/g (e.g. USA)	HHS (2008)
703 MPa 5 min	- 4	Producto: FSO:	producto cárnico RTE 100 células/g (e.g. Europa)	Ordóñez et al. (2004)
613 MPa 5 min	- 2,39	Producto: FSO:	jamón curado 0,04 células/g (e.g. USA)	Hoz et al. (2008)

[a]Presión estimada por el modelo predictivo necesaria para conseguir, en 5 min de tratamiento, la inactivación requerida para cada criterio de funcionamiento considerado.

[b]Equivalente a un proceso de pasteurización (NACMCF, 2006).

CONCLUSIONES

El enfoque de la modelización matemática permitió identificar la presión y el tiempo como los factores tecnológicos más relevantes de la inactivación por AP de *L. monocytogenes* en jamón curado. El modelo empírico desarrollado ha sido validado por lo que puede ser utilizado con fines predictivos, dentro del dominio experimental considerado. Así, las predicciones que proporciona el modelo permiten definir los criterios de proceso que garanticen la consecución de los criterios de funcionamiento internacionalmente establecidos para cumplir con los Objetivos de Seguridad Alimentaria en relación a *L. monocytogenes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAC. 2007. Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. CAC/GL 61 - 2007.*Codex Alimentarius*, 1-30.

Chen, H. 2007. Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk *Food Microbiology* 24: 197-204.

Dalgaard, P. 2000. Fresh and lightly preserved seafood. En: C. M. D. Man & A. A. Jones (Eds.), *Shelf-life evaluation of foods* (pp. 110-139). London, UK: Aspen Publishers, Inc.

Erkmen, O. y Dogan, C. 2004. Effects of ultra high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* and natural flora in broth, milk and fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology* 39: 91-97.

Gao, Y. L., Ju, X. R. y Jiang, H. H. 2006. Statistical analysis of inactivation of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure and heat in milk buffer. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 670-678.

Hereu, A., Bover-Cid, S., Rubio, R., Garriga, M. y Aymerich, T. 2009. Nisin-active packaging and high hydrostatic pressure to improve the safety of sliced dry cured ham. En: *2009 EFFoST Conference. New Challenges in Food Preservation: Processing - Safety - Sustainability Budapest, Hugary.*

HHS. 2008. Guidance for industry: control of *Listeria monocytogenes* in refrigerated or frozen ready-to-eat foods.*U. S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center of Food Safety and Applied Nutrition*,

Hoz, L., Cambero, M. I., Cabeza, M. C., Herrero, A. M. y Ordóñez, J. A. 2008. Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by e-beam radiation. *Journal of Food Protection* 71: 2001-2006.

Koseki, S., Mizuno, Y. y Yamamoto, K. 2007. Predictive modelling of the recovery of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* 119: 300-307.

Morales, P., Calzada, J. y Nuñez, M. 2006. Effect of high-pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in sliced vacuum-packaged iberian and serrano cured hams. *Journal of Food Protection* 69: 2539–2543.

NACMCF. 2006. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection* 69: 1190.

Ordóñez, J., Zurera, G., Bosch, A., Otero, A. y Guamis, B. 2004. Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos (Ref. AESA-2003-007). *Agencia Española de Seguridad Alimentaria*

Patterson, M. F. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1400-1409.

Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M. y Federighi, M. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food MIcrobiology* 17: 375-382.

Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, M. T., Hugas, M. y Pla, M. 2004. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1-3.

Ross, T., Dalgaard, P. y Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of food Microbiology* 62: 231- 245.

Tanzi, E., Saccani, G., Barbuti, S., Grisenti, M. S., Lori, D., Bolzoni, S. y Parolari, G. 2004. High-pressure treatment of raw ham. Sanitation and impact to quality. *Industria Conserve* 79: 37-50.

Warriner, K. y Namvar, A. 2009. What is the hysteria with Listeria? *Trends in Food Science & Technology* 20: 245-254.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por los proyectos de investigación RTA2007-00032 y CSD2007-00016.

C20 LA PROTEÓMICA APLICADA AL ANÁLISIS DE TOXINAS ESTAFILOCÓCICAS ALIMENTARIAS: HOJA DE RUTA HACIA EL FUTURO

Dr. José Miguel Soriano del Castillo

Observatorio de Nutrición y Seguridad Alimentaria para el Mundo en Desarrollo. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot. Valencia.

jose.soriano@uv.es

Staphylococcus aureus es un microorganismo Gram +, catalasa positivo y citocromo-oxidasa negativo, ubicuota y aerobio o anaerobio facultativo, caracterizándose por su división en más de un plano para formar agrupaciones irregulares (cocos). Es un microorganismo habitual en la piel, fosas nasales y mucosas del ser humano, su presencia en los alimentos refleja unas practicas de higiene defectuosas por parte del manipulador y si además los *S. aureus* aislados son cepas enterotoxigénicas, suponen un riesgo adicional para la salud. A veces no se aísla *S. aureus* en un alimento o bien su número es pequeño y, sin embargo, existe una cantidad detectable de enterotoxina estafilocócica. En este caso los gérmenes que originaron la toxina han ido descendiendo en número, e incluso se han destruido (por ejemplo por efecto del calor), mientras que la toxina, por su mayor resistencia al calor, permanece en alimento dando curso a la enfermedad. Las enterotoxinas estafilocócicas son proteínas de cadena simple no ramificada compuestas por cantidades relativamente grandes de lisina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico. Los pesos moleculares oscilan entre 28 y 35 kDa, son solubles en agua y presentan una alta termostabilidad. La producción de enterotoxinas por cepas de *S. aureus* se ve afectada por la calidad de los nutrientes y el pH del substrato, la temperatura, la atmósfera, el cloruro sódico, otros compuestos químicos y los microorganismos competidores. Actualmente se diferencian por su actividad serológica (Hennekinne et al., 2009) al menos 23 enterotoxinas. Las que aparecen con mayor frecuencia y que han sido mas estudiadas hasta ahora son 7 y se designan con las letras A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J. Las enterotoxinas mayoritarias son la A, B, C y D, siendo la primera la más frecuentemente aislada en los brotes de intoxicaciones alimentarias (Soriano et al., 2002a). La originalmente descrita enterotoxina F se identificó posteriormente como la toxina productora del síndrome de shock tóxico (TSST-1) en mujeres. Las distintas enterotoxinas que se conocen han sido identificadas por reacciones con anticuerpos específicos. Sin embargo, debido a su producción en cantidades mínimas y a su difícil purificación, todavía existen enterotoxinas sin identificar que pudieran representar un 5 % de los brotes de intoxicación estafilocócica (Bergdoll et al., 1996). Cuando se ingiere un alimento con enterotoxina estafilocócica y después de un periodo de incubación de 1-8 horas (2-4 de media) se produce una síndrome gastrointestinal, que se caracteriza por la aparición de náuseas, cefalea, dolores abdominales y sobre todo vómitos violentos, incoercibles y repetidos, además de diarrea atribuida a la disminución de la absorción del agua desde el lumen intestinal y a un aumento simultáneo de la secreción de ésta y de sales minerales desde las glándulas intestinales (Jablonsky y Bohac, 1997). Generalmente no hay fiebre, si bien puede cursar con una ligera hipertermia (hasta 38°C). En determinados casos se ha descubierto el desarrollo de alguna complicación en función de la dosis de toxina ingerida y la sensibilidad individual como son deshidratación, calambres musculares, postración, hipertensión, shock y colapso por caída brusca de la presión arterial. La muerte se produce en pacientes propensos a la deshidratación como niños y ancianos.

El análisis de toxinas estafilocócicas es uno de los campos más emergentes de los próximos años, siendo actualmente el interés enfocado a la determinación de enterotoxina estafilocócica independientemente de la especie de estafilococo detectado, debido a que hay casos en las cuales se ha detectado enterotoxinas en cepas coagulasa negativas tales como *S. epidermis*. La cantidad de enterotoxinas que puede estar presente en un alimento puede ser mínima (50 ng de alimento), sin embargo en los alimentos que provocan brotes de intoxicación alimentaria, la presencia de éstas oscila entre 1 y 5 mg/g de alimento (Tranter et al., 1990). En general, los ensayos de toxinas no pueden realizarse directamente y se hace necesario llevar a cabo procesos de extracción y/o concentración antes del ensayo. La presencia de estafilococos enterotoxigénicos y sus toxinas han sido detectados en los alimentos a través distintas pruebas, como son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA) (Rasooly y Do, 2009) radioinmunoensayo (Holecková *et al.*, 2002), inmunoafinidad basada en fluorescencia de tiempo resuelto (*Immunoaffinity-based time-resolved fluorescence*) (Peruski *et al.*, 2002),

electroquimioluminiscencia inmunomagnética (*Immunomagnetic-electrochemiluminescent*) (Kijek *et al*., 2000) y pruebas de aglutinación pasiva reversa, como es el SET-RPPLA (*Staphylococcal enterotoxin-reversed passive latex agglutination*) (Soriano *et al*., 2002b). Estas técnicas han permitido avanzar en el análisis de estos compuestos en alimentos pero presentan una serie de inconvenientes tales como su sensibilidad, la aparición de falsos positivos, tiempo de análisis (más de un día), limitado en cuanto a las enterotoxinas a analizar (normalmente las enterotoxinas A, B, C y D) y son técnicas caras.

Varios autores han trabajado con la cromatografía líquida como herramienta para vencer estos inconvenientes. Nedelkov *et al.* (2000) detectó la enterotoxina B (SEB) en leche usando una combinación de extracción con anticuerpos y de cromatografía líquida (CL) acoplada a un detector de ionización mediante desorción por láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization; MALDI*). Paralelamente, Kawano *et al.* (2000) demostró que una variedad de proteínas producidas por *S. aureus*, incluyendo enterotoxinas, podrían ser caracterizadas por CL acoplada a espectrometría de masas. Callahan *et al.* (2006) desarrolló un método mediante espectrometría de masas para identificar la SEB en zumo de manzana. Nuestro grupo (Sospedra *et al*., 2010), y gracias a un proyecto de Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana (072/2009), desarrolló un método de extracción rápido y sencillo de SEA en muestras de leche y posterior utilización de la ionización mediante desorción por láser asistida por matriz, acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight; MALDI-TOF*). Sin embargo fue Hennekinne *et al.* (2009) quien aplicó por primera vez, en intoxicaciones estafilocócicas alimentarias, la denominada espectrometría de masas cuantitativa absoluta (*absolute quantitative mass spectrometry; AQMS*) y la comparó con varias técnicas incluyendo ELISA, PCR y métodos microbiológicos convencionales. Este estudio ha permitido confirmar la etiología de la intoxicación estafilocócica debido la sintomatología asociada típica, el alto número de estafilococos coagulasa positivo recuperado desde los alimentos implicados y la cantidad de toxina detectada en alimentos mediante ELISA y espectrometría de masas cuantitativa. De esto se demuestra que la dosis ingerida puede ser evaluada mediante el peso medio del alimento implicado en la intoxicación y la pequeña cantidad de enterotoxina detectada, si a este valor de ingesta total la relaciono con el peso corporal, me permite obtener datos epidemiológicos en las cuales se podría determinar la concentración de enterotoxina por kg de peso corporal y la sintomatología. El futuro de este campo podría ir enfocado al análisis mediante AQMS previa optimización del método en diferentes alimentos y diferentes enterotoxinas, lo que permitiría desarrollar una herramienta práctica y rápida para el análisis de las intoxicaciones alimentarias y su uso en la epidemiología de las enfermedades de transmisión alimentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 389:1017–1031

Bergdoll MS. 1996. Detection of the staphylococcal toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 391: 465–479.

Callahan JH, Shefcheck KJ, Williams TL, Musser SM. 2006. Detection, confirmation, and quantification of staphylococcal enterotoxin B in food matrixes using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78: 1789–1800.

Hennekinne JA, Brun V, De Buyser ML, Dupuis A, Ostyn A, Dragacci S. 2009. Innovative application of mass spectrometry for the characterization of staphylococcal enterotoxins involved in food poisoning outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 882-884.

Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Kalinacova V, Gondol J, Grolmus J. 2002. Occurrence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in food. *Ann. Agric. Environ. Med.* 9: 179–182.

Jablonsky L, Bohac G. 1997. *Staphylococcus aureus*. Food Microbiology. Editorial Press. Washington, EEUU. 353-376.

Kawano Y, Ito Y, Yamaka Y, Yamashino T, Horii T, Hasegawa T, Ohta M. 2000. Rapid isolation and identification of staphylococcal exoproteins by reverse phase capillary high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Lett.* 189*:* 103-108.

Kijek TM, Rossi CA, Moss D, Parker RW, Henchal EA. 2000. Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of staphyloccocal enterotoxin B. *J Immunol Methods.* 236: 9-17.

Nedelkov D, Rasooly A, Nelson RW. 2000. Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 1–13.

Peruski AH, Johnson LH, Peruski LF. 2002. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time resolved fluorescence (TRF) assays. *J. Immunol. Meth.* 263: 35-41.

Rasooly R, Do PM. 2009. In vitro cell-based assay for activity analysis of staphylococcal enterotoxin A in food. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56: 172-178.

Soriano JM, Font G, Moltó JC, Mañes J. 2002a. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends Food Sci. Tech.* 13: 60-67.

Soriano JM, Font G, Rico H, Moltó JC, Mañes, J. 2002b. Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods. *J. Food Protect.* 65: 857-860.

Sospedra I, Soler C, Soriano JM, Mañes J. 2010. Análisis de la enterotoxina A de Staphylococcus aureus en leche por ionización mediante desorción por láser asistida por matriz, acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). *Proteómica* 5: 112-114.

Tranter HS. 1990. Food borne illness. *Lancet* 336: 1044–1046.

COMUNICACIONES
ORALES Y POSTERS

ALIMENTOS FUNCIONALES

COMUNICACIONES ORALES

O158 ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE áCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) POR AISLADOS MICROBIANOS OBTENIDOS DE QUESOS DE LECHE CRUDA

Aitana Ares-Yebra[1], *José Ignacio Garabal*[*1], *Juan Antonio Centeno*[2] *y Federico Pomar*[3]
[1]*Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia, Apdo. 10, 15080 A Coruña, jose.ignacio.garabal.sanchez@xunta.es*
[2]*Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo. Campus de Ourense, 32004 Ourense*
[3] *Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña. Campus de A Coruña 15008 A Coruña*

RESUMEN
El ácido linoleico conjugado (CLA) es un ácido graso presente en la leche y productos lácteos, al que se le atribuye acciones beneficiosas sobre la salud (acción anticarcinogénica, acción antiaterogénica, inmunomodulación y regulación de la grasa corporal). Como consecuencia de los modernos hábitos alimentarios de la sociedad y de los sistemas intensivos de producción animal, se estima que la población humana consume en su dieta menores dosis de CLA que hace 20 años. La modificación de la concentración de CLA en la leche o derivados puede ser llevada a cabo mediante la incorporación de microorganismos capaces de producirlo durante la fase de crecimiento activo, o durante la fase estacionaria. La inclusión de microorganismos durante la elaboración de productos lácteos fermentados o la administración como probióticos para su producción "in situ" en el huésped resulta de gran interés en el campo de la investigación aplicada. El objetivo del presente trabajo fue la puesta a punto de dos métodos, uno método espectrofotométrico UV y otro de cromatografía de gases (GC-FID, que permitan determinar la capacidad de producción de CLA en 33 cepas bacterianas de referencia y en 515 microorganismos (bacterias lácticas, micrococáceas y levaduras) obtenidos de quesos de leche cruda de vaca.
Los microorganismos fueron inoculados en caldos de cultivo MRS-cisteína o MYGP suplementados con 25 µg/mL de ácido linoleico (LA), incubándose durante 48 h a 30ºC. Mediante espectrofotometría UV se cuantificó el CLA total, seleccionando aquellas bacterias productoras de CLA. Los porcentajes de conversión de LA a CLA variaron entre las cepas desde 0 hasta 23 % . Aquellos microorganismos con mayores conversiones se incubaron con concentraciones mayores de sustrato (0-1500 µg/mL) para determinar la tolerancia al AL y producción de isómeros de CLA. La extracción de la fracción lipídica se realizó con isopropanol/hexano, derivatizando

posteriormente con una solución 4% HCl/metanol. Los estudios muestran que el método espectrofotométrico UV es un método rápido y económico para la búsqueda de aislados productores de CLA, si bien debido a que los microorganismos investigados poseen capacidades diferentes de producción de CLA, así como también distintas especificidades de los isómeros formados, se requiere el empleo de la cromatografía de gases para la identificación de los isómeros del CLA.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El término ácido linoleico conjugado (CLA) agrupa a una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (C18:2), con dobles enlaces conjugados en su molécula. Los más importantes desde el punto de vista biológico son el *c9,t11* y el *t10,c12*. El CLA actúa como anticarcinogénico y modulador del sistema inmune, posee acción hipocolesterolémica y contribuye a la disminución de la grasa corporal. La leche y productos lácteos fermentados son la principal fuente de CLA para el consumidor. Dependiendo del país investigado, el consumo medio diario de CLA (c9, t11 CLA) oscila entre 15 y 1000 mg, cantidades muy por debajo de los 3 g de ingesta de CLA que se presupone beneficiosa para la salud. La modificación de la concentración de CLA en la leche o derivados puede ser llevada a cabo mediante la incorporación de microorganismos capaces de producirlo durante la fase de crecimiento activo o durante la fase estacionaria. Este último mecanismo reviste gran importancia en la producción de alimentos fermentados, ya que sugiere que la producción de CLA podría ocurrir no sólo al inicio de la fermentación sino también durante el periodo de conservación del alimento. El desarrollo de alimentos funcionales ricos en CLA ha generado gran interés, dando origen a un área de investigación que abarca los diferentes mecanismos para incrementar la concentración de este ácido graso en los alimentos de consumo masivo. De esta manera, la incorporación de bacterias y/o levaduras productoras de CLA como cultivos iniciadores o adjuntos pretende ofrecer al consumidor alimentos con propiedades benéficas para la salud.

El objetivo del presente estudio es la puesta a punto de dos métodos, uno espectrofotométrico UV rápido y otro de cromatografía de gases (GC-FID), que permitan determinar la capacidad de producción de CLA en microoorganismos (bacterias lácticas, micrococáceas y levaduras) obtenidos de quesos de leche cruda de vaca con vistas a su posible utilización en alimentos funcionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de los microorganismos, aislamiento y conservación:

Un total de 33 cepas de referencia pertenecientes a distintos géneros bacterianos (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Valencia) fueron incluidas como controles positivos y negativos de producción de CLA en medios bacteriológicos líquidos (Jiang y col., 1998; Alonso y col., 2003; Ogawa y col., 2005; Barret y col., 2007). Adicionalmente, se investigaron 515 aislados microbianos (lactococos, lactobacilos, leuconostocs, pediococos, micrococos y levaduras) obtenidos de quesos de leche cruda de vaca.

Medios bacteriológicos y condiciones de cultivo:

Los microorganismos previamente conservados a -30ºC en un medio a base de leche desnatada y glicerol (30%), se subcultivaron hasta pureza mediante subcultivo en los agares (Pronadisa, Madrid) MRS (bacterias lácticas), TSA (micrococáceas), y MYGP (levaduras) a 30ºC durante 48 h.

Para la evaluación de la producción de CLA, los microorganismos fueron inoculados en caldos MRS-cisteína (bacterias lácticas) y MYGP (micrococáceas y levaduras) suplementados con 25 μg/mL de ácido linoleico (LA) y Tween-80 al 0,1%, incubándose a 30ºC durante 48 horas. Adicionalmente, una selección de cepas productoras de CLA se ensayaron en presencia de diferentes concentraciones de LA (0; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0 y 1,5 mg/mL) para determinar la tolerancia al AL y verificar la producción de isómeros *c9,t11* (CLA1) y *t10,c12* (CLA2).

Obtención y preparación de los fluidos extracelulares para el análisis de ácidos grasos:

Los fluidos extracelulares (1 mL) obtenidos por centrifugación (13000 rpm /5 minutos) fueron mezclados con 2 mL de isopropanol (Scharlau, Barcelona) con la ayuda de un agitador excéntrico (30 segundos de agitación), manteniéndose posteriormente la mezcla en reposo durante 3 minutos a temperatura ambiente. Los ácidos grasos fueron extraídos después de añadir 1,5 mL de hexano (Scharlau) a la mezcla.

Determinación del contenido en CLA:

La presencia de CLA en el sobrenadante fue evidenciada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 233 nm. (Barret y col., 2007), y mediante cromatografía de gases con detector FID (GC-FID) (Alonso y col. 2003). Se construyeron gráficas de calibración-patrón para las determinaciones analíticas, empleando los isómeros *c9, t11* y *t10, c12* individuales (Maytreya, EEUU) o bien una mezcla de los mismos (Sigma, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método espectrofotométrico muestra una buena correlación lineal (R^2=0.9996) en el intervalo de concentración de CLA desde 0 μg/mL hasta 25 μg/mL A concentraciones de CLA superiores a 50 μg/mL se observó una saturación en la señal de lectura a 233 nm. Por ese motivo, las concentraciones de CLA en sobrenadantes de cultivos con absorbancias a 233 nm iguales o inferiores a 2,45 unidades podrían ser estimadas en función de la ecuación de la gráfica de calibración-patrón

La validez del método pudo ser confirmada al ensayarse ocho cepas de referencia descritas en la bibliografía como productoras (CECT 4669, CECT 748, CECT 749 y CECT 539) y no productoras (CECT 903, CECT 4007, CECT 4305 y CECT 697) de CLA a partir de LA El análisis por GC-FID permitió verificar que los incrementos de

absorbancia a 233 nm observados con el método espectrofotométrico UV eran originados por los incrementos de CLA en el medio de cultivo El método cromatográfico permitió además la identificación de las isómeros CLA1 y CLA2.
En los microorganismos investigados, los porcentajes de conversión de LA a CLA variaron desde 0 hasta 23 % (Owaga y col. 2005) determinaron la producción de CLA por parte de más de 250 cepas bacterianas pertenecientes a 14 géneros diferentes, incluyendo los géneros *Propionibacterium*, *Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus* y *Bifidobacterium*. Paralelamente a los resultados obtenidos en el presente estudio, las cepas productoras se caracterizaron por sintetizar mayoritariamente el isómero c9, t11 (CLA1), al que se le atribuye la principal actividad biológica de interés sanitario (Martins y col., 2007). Para 10 de las cepas (4 levaduras, 3 lactococos, 1 Lactobacilus paracasei, 1 estafilococo) ensayadas en el presente trabajo se observaron niveles máximos de isomerización superiores al 15%, los cuales pueden considerarse comparables a los encontrados por otros autores (Ogawa y col., 2005) teniendo presente que la composición de los medios bacteriológicos puede ser un factor condicionante de esta propiedad.

CONCLUSIONES
Los resultados del presente estudio sugieren la idoneidad del método espectrofotométrico UV para la selección de microorganismos con capacidad para convertir el LA en CLA.
Los datos obtenidos hasta el momento actual, sugieren la potencialidad de los aislados con vistas a su empleo en el desarrollo de productos fermentados funcionales con mayores contenidos en CLA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Alonso L y col. (2003). Journal of Dairy Science 86; 1941-1946
Barret.E y col. (2007). Applied and Environmental Microbiology, Apr.2007, p.2333-2337
Jiang J y col. (1998). Journal of Applied Microbiology 85, 95-102
Martins S y col. (2007) British Journal of Nutrition 98,1206-1213
Ogawa J y col. (2005). Journal of Bioscence and Bioengineering 100(4), 355-364.

AGRADECIMIENTOS
Este estudio ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (proyecto RTA 2008-00117).

O163 METABOLISMO DE PROANTOCIANIDINAS DE UVA POR BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS

Raquel Tabasco, Irene Bustos, Fernando Sánchez-Patán, María Monagas, Begoña Bartolomé, M. Victoria Moreno-Arribas, Carmen Peláez y Teresa Requena*
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid.
**rtr@if.csic.es*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS
Actualmente, existe una gran diversidad de ingredientes o complementos dietéticos comercializados que están basados en productos procedentes de la uva, ricos en proantocianidinas (monómeros, oligómeros y polímeros de flavan-3-oles; Monagas et al., 2005). Son muchos los estudios que señalan un posible efecto beneficioso de los polifenoles del vino frente a las enfermedades cardiovasculares, como agentes protectores (Davalos y Lasunción, 2009). Sin embargo, un aspecto menos estudiado y que es necesario abordar, es el metabolismo de estos compuestos fenólicos por la microbiota del tracto gastrointestinal, así como el efecto de los metabolitos de polifenoles en la modulación de dicha microbiota.
El metabolismo microbiano de los polifenoles de la uva y del vino se ve ampliamente influenciado por su estructura química. Se ha descrito que los flavan-3-oles monómericos son capaces de inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas como *Clostridium perfringes*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides* spp., mientras que algunas bacterias probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son menos sensibles (Lee et al., 2006). En definitiva, se desconocen las especies bacterianas concretas capaces de metabolizar la mayoría de los polifenoles presentes en la uva y el vino, así como los productos intermedios y las enzimas implicadas.
El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar los potenciales efectos de las proantocianidinas de la uva en el crecimiento de bacterias lácticas y bifidobacterias, así como evaluar el metabolismo de estos polifenoles por dichas bacterias.

MATERIAL Y MÉTODOS
Se ensayaron tres tipos de materiales fenólicos: un extracto fenólico comercial procedente de pepita de uva (Vitaflavan®) compuesto por 75% de proantocianidinas y 22% de monómeros de flavan-3-oles , y dos fracciones purificadas del mismo, una rica en monómeros de flavan-3-oles y otra rica en proantocianidinas B1 y B2 (oligómeros de flavan-3-oles). Las tres muestras se ensayaron a diferentes concentraciones finales: 1 mg/ml, 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml.
Cada una de las concentraciones de los tres compuestos fenólicos se añadió a un medio de cultivo de composición química definida (Zhang et al., 2009) donde se observó que crecían todas las especies de bacterias lácticas y

bifidobacterias en estudio. Cada cepa se inoculó al 1% y se monitorizaron los cambios de densidad óptica durante la incubación a 37 ºC tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, mediante el empleo de microensayos en placa.
Para evaluar la capacidad de metabolizar los compuestos fenólicos, se seleccionaron aquellas cepas que alcanzaron el máximo de crecimiento en presencia de los polifenoles con respecto al medio control. Se tomaron muestras al comienzo de la incubación, durante la fase exponencial y en la fase estacionaria de crecimiento de los cultivos. Se analizó el contenido en metabolitos fenólicos de los sobrenadantes procedentes de los cultivos mediante UPLC-ESI-TQ MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, el crecimiento de las cepas ensayadas se vio afectado por el tipo y concentración del extracto fenólico. De este modo, el extracto más favorable para el crecimiento de las cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias fue la fracción monomérica de flavan-3-oles, (+)-catequina y (-)-epicatequina, seguida de la fracción rica en proantocianidinas y a las concentraciones más bajas (0,25 mg/ml). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aura et al. (2008), donde se observa que el grado de degradación de las proantocianidinas por la microbiota humana es más reducido que el de los flavanoles monoméricos.
El crecimiento en presencia del extracto fenólico de uva comercial Vitaflavan® sólo se observó en algunas cepas de *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. casei,* y en concentraciones del extracto fenólico inferiores a 1 mg/ml. *L. plantarum* IFPL935 fue la cepa que mejor creció en presencia de los diferentes extractos fenólicos ensayados y se seleccionó para el estudio de formación de metabolitos fenólicos.
El análisis de los compuestos fenólicos en el medio de cultivo confirmó la actividad metabólica de *L. plantarum* IFPL935 sobre los extractos. Se observó un aumento significativo de ácido gálico así como la presencia de pirogalol, que se corresponde con un descenso significativo de los galatos de (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina y de procianidinas. De igual forma, se detectó la presencia de catecol, procedente posiblemente de la degradación de ácido protocatéquico. También se detectaron cantidades trazas de otros metabolitos intermedios del catabolismo de mónomeros de flavan-3-oles y procianidinas, aunque se hacen necesarios nuevos ensayos para la confirmación de estas etapas intermedias de degradación.
Adicionalmente, hay que destacar variaciones del efecto inhibitorio de los polifenoles en presencia o ausencia de oxígeno, ya que los resultados obtenidos mostraron un menor potencial de inhibición de los extractos fenólicos en las cepas ensayadas cuando se incubaron en anaerobiosis. Este hecho es de relevancia dado el ambiente anaeróbico en el que se encuentra la microbiota intestinal.

CONCLUSIONES

Dentro de las bacterias lácticas, *L. plantarum* es la especie que se caracteriza por presentar las principales ventajas metabólicas para la utilización de diferentes monómeros de flavan-3-oles y proantocianidinas. La presencia de metabolitos fenólicos en los medios de cultivo confirma su actividad metabólica sobre estos compuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aura, A-M. 2008. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds. *Phytochem. Rev.* 7:407-429.
Davalos, A., Lasunción, M.A. 2009. Health-promoting effects of wine phenolics. En "Wine chemistry and biochemistry" (M.V. Moreno-Arribas, M.C.Polo, Eds.), Springer, New York, p. 571-591.
Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.S., Lee, Y.K. 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 157:876-884.
Monagas, M., Hernández-Ledesma, B., Garrido, I., Martín-Álvarez, P.J., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. 2005. Quality assessment of commercial dietary antioxidante products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutr. Cancer*. 53:244-254.
Zhang, G., Mills, D.A., y Block, D.E. 2009. Development of chemically defined media supporting high-cell-density growth of lactococci, enterococci, and streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1080-1087.

POSTERS

P92 STUDIES ON THE EFFECT OF THE ORAL ADMINISTRATION OF FUNGAL LIGANDS IN A MURINE MODEL OF EXPERIMENTALLY INDUCED COLITIS

Celia Murciano, Alberto Yáñez, M. Luisa Gil, and Daniel Gozalbo
Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain. Daniel.gozalbo@uv.es

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The molecular interaction between ligands of commensal microbiota and host receptors at the surface of the epithelial cells of the gastrointestinal (GI) tract plays a critical role in its homeostasis and protection [1]. Toll-like receptors (TLRs) constitute a family of pattern-recognition receptors (PRRs) that function as sensors of infection being critical for the initiation of inflammatory and innate immune defense responses and also for the modulation of adaptive immune responses [2]. TLRs are involved in controlling the intestinal epithelial homeostasis and in protection from injury [1]. In addition, it is well stablished that (i) yeast cells of the opportunistic fungal pathogen species *Candida albicans* contain microbial-associated molecular patterns that are recognized by TLRs [3,4], (ii) cell wall composition and organization are similar both in *C. albicans* and *Sacharomyces cerevisiae* yeasts cells [5], and (iii) zymosan, a *S. cerevisiae* cell wall-derived particle has been widely used to study interactions with host immune cells through PRRs. Therefore, yeast cells or soluble yeast-derived ligands for TLRs may also be involved in modulation

of the inflammatory response of the GI tract, and as a consequence may have a potential therapeutic effect during inflammatory bowel disease - a chronic relapsing disorder associated with uncontrolled inflammation within the GI tract involving dysregulated host-microbiota interaction [6]. In this context, controlled clinical trials have shown that *S. boulardii* cells were effective in the prevention and/or treatment of inflammatory bowel diseases [7]. The aim of this work was to determine the usefulness of oral administration of yeast ligands (viable yeast cells, and yeast cell wall components such as mannan) to protect and modulate the inflammatory response of the intestinal tract in a murine model of experimentally induced colitis.

MATERIALS AND METHODS

To induce acute experimental colitis, C57BL/6 mice were given 3% dextran sulphate sodium salt (DSS) in drinking water for seven days, similarly to the methodology already described [1]. For survival studies, mice were followed daily for 21 days post-treatment and weighed to determine percentage of weight change. Some assays were performed using sublethal DSS treatment (3% DSS until a percentage of loss weight between 7% and 9%). Protection assays were performed by daily oral administration of viable yeasts (150 x 10^6 cells in 0.05 ml PBS) or yeast mannan (5 mg in 0.05 ml PBS, Sigma). Two yeast strains were used: one *S. boulardii* isolated from a commercial probiotic product, and a natural wine yeast (*S. cerevisiae* CECT 10431). These yeast strains were selected as *S. boulardii* is recognized to have biotherapeutic effects on intestinal mucosa, and the wine yeast strain does not express putative virulence traits [7,8]. Segments (0.5 cm length) of proximal and distal colon from selected mice, after extensive washing with PBS supplemented with penicillin and streptomycin, were incubated for 24 h at 37ºC in 0.5 ml cell culture medium (RPMI supplemented with penicillin and streptomycin), either in the presence or absence of heat-inactivated *S. cerevisiae* yeasts (50 x 10^6), *S. boulardii* yeasts (50 x 10^6) or mannan (1.5 mg); cytokine levels (TNF-α, IL-6 and IL-10) in the supernatants were measured by ELISA by using commercial kits.

RESULTS AND DISCUSSION

Several combinations of oral administration of viable yeast cells or mannan, starting either after or during the DSS treatment to induce the experimental acute or sublethal colitis, were assayed. In all cases, no statistically significant differences were found between yeasts/mannan administered mice and controls, both for mortality and loss of weight. Assays performed using two doses per day of yeasts or mannan did not alter the results.

In vitro production of the proinflammatory cytokine IL-6 by segments of colon from mice with acute experimentally induced colitis was very high [1000-2500 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$] and *in vitro* addition of inactivated *S. cerevisae* yeasts did not result in any significant effect on cytokine production (IL-6). Lower levels of IL-10 [up to 100 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$] and TNF-α [up to 8 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$], as compared to IL-6, were obtained in colon segments, particularly in the presence of inactivated yeasts. Cytokine levels were higher in distal segments compared with proximal segments, indicating that distal segments show increased injury during experimental colitis, relative to proximal segments. In addition, colitis appears to be associated with increased secretion of IL-6, about 5-fold in proximal colon segments and 20-fold in distal colon; an increase in IL-10 secretion (5-fold) was observed only for distal segments, whereas TNF-α levels remained low, although increased 5-fold in distal segments. The mice used in these experiments showed a loss of weight ranging from 15-20%, indicating the development of a severe colitis. *In vitro* assays were also performed with colon segments from mice with sublethal colitis to avoid extensive tissue damage. Results confirmed (i) that production of IL-6 was higher in mice treated with DSS [600-800 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$] compared to untreated mice [100-250 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$], with an increase of 3- and 5-fold in proximal and distal colon, respectively, whereas IL-10 and TNF-α levels remained lower [16-35 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$ for IL-10, and 2-18 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$ for TNF-α] and (ii) that addition of mannan or inactivated *S. boulardii* yeasts did not have any significant effect on cytokine production *in vitro.*

To correlate the *in vitro* and *in vivo* effects of mannan, *in vitro* assays were performed with segments of colon from mice with acute colitis and treated with mannan or PBS (control mice) during the DSS treatment. When compared to PBS administered mice, the fragments of colon from mannan treated mice showed a higher production of cytokines, particularly IL-6 in proximal segments [3-fold increase: from 1000 to 3000 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$]; TNF-α and IL-10 levels also showed a 2- to 3-fold increase in proximal and distal colon segments, although these levels were lower than those of IL-6 [2-12 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$ for TNF-α, and 50-150 pg ml^{-1} (mg tissue)$^{-1}$ for IL-10]. These results suggest that *in vivo*, mannan treatment does not decrease the secretion of cytokines by GI-tract cells, but rather secretion of cytokines is actually enhanced - particularly IL-6, probably depending on the degree of tissue injury. However, due to the high variability of cytokine levels obtained between samples from individual mice, the statistical significance of these differences should be further assessed.

These results do not support the hypothesis that yeast cells or ligands contribute to the *in vivo* protection of intestinal tract during inflammatory diseases. Since the potential protective effect of mannan (and other fungal ligands) may be masked by the presence of commensal bacteria and other factors acting during the *in vivo* process that may result in mannan degradation, further assays using (i) mice depleted of commensal bacteria as a consequence of long-term treatment with antibacterial antibiotics, and/or (ii) enteric coating of mannan to prevent release before it reaches the intestine should be performed prior to rule out the potential protective effect of yeast ligands during experimentally induced colitis.

CONCLUSIONS

Direct oral administration of either viable yeast cells or soluble yeast cell wall-derived mannan does not show any

protective *in vivo* effect during disease in a model of experimentally induced colitis in immunocompetent mice not treated with antibacterial antibiotics to deplete commensal GI bacteria.

REFERENCES
[1] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg E and Medzhitov R. (2004). Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118: 229-241.
[2] Takeda K and Akira S (2005). Toll-like receptors in innate immunity. International Immunology 17:1-14.
[3] Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, and Gow NA (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nature Reviews in Microbiology 6:67-78.
[4] Gil ML and Gozalbo D (2009). Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. Frontiers in Bioscience 14: 570-582.
[5] Gozalbo D, Roig P, Villamón E and Gil ML (2004). *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. Current Drug Targets-Infectious Disorders 4: 117-135.
[6] Geier MS, Butler RN and Howarth GS (2007). Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. International Journal of Food Microbiology 115:1-11.
[7] Butts J.P. and De Keyser N. (2006). Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Digestive Diseases Sciences* 51: 1485-1492.
[8] Yáñez A, Murciano C, Llopis S, Fernández-Espinar T, Gil Ml and Gozalbo D. (2009). *In vivo* and *in vitro* studies on virulence and host responses to *Saccharomyces cerevisiae* clinical and non-clinical isolates. *The Open Mycology Journal* 3: 37-47.

ACKNOWLEDGMENTS
Supported by project PI08/0556, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

P105 SUPERVIVENCIA DE BAL CON POTENCIAL PROBIÓTICO TRAS SU ADICIÓN A ZUMO DE NARANJA Y MEZCLAS ZUMO-LECHE COMO ALIMENTOS FUNCIONALES

Jordi Cerveró[1], Patricia Elizaquível[1], Montserrat Nácher-Vázquez[2], Maria Teresa Dueñas[3], Idoia Ibarburu[3], Gloria Sánchez[2] y Rosa Aznar[1,2]
[1]Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València. Av. Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot. Valencia.
[2]Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimento (IATA, CSIC). Av. Agustín Escardino, 7. 46980 Paterna. Valencia.
[3]Departamento de Química Aplicada. Facultad de Química. Universidad del País Vasco. Apdo. 20080 San Sebastian

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la última década se observa una creciente demanda de alimentos funcionales, siendo los probióticos con mucho, los más populares y ampliamente comercializados. Tradicionalmente los probióticos se incorporan en productos lácteos fermentados, aunque también empiezan a utilizarse en otro tipo de productos como la leche sin fermentar, cereales para el desayuno y zumos de frutas. Las bebidas a base de fruta tienen el potencial de ser utilizadas como vehículo de probióticos si se toman precauciones en relación con las características organolépticas y el pH. Este último puede tener un gran impacto en la viabilidad de los probióticos, que puede reducirse durante el almacenamiento en muchas leches fermentadas con valores de pH entre 4.0 y 5.0. Con el fin de ampliar la biodiversidad de cepas probióticas se están investigando BAL productoras de exopolisacáridos (EPSs) de otros orígenes como sidra ahilada y productos cárnicos. Recientemente se han descrito las propiedades probióticas de *Pediococcus parvulus* 2,6, aislada de sidra ahilada y productora de (1->3, 1->2)-β-D-glucano (Fernández de Palencia et al., 2009; Immerstrand et al., 2010). El objetivo de este trabajo ha sido evaluar alimentos de pH ácido, como zumos de fruta y mezclas zumo-leche, como vehículo para nuevas cepas BAL, con potencial probiótico, aisladas de productos cárnicos y sidra ahilada.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado con 5 cepas aisladas de productos cárnicos, productoras de EPS, previamente seleccionadas como potenciales probióticos: 3 *Lb. plantarum,* 1 *Lb. sakei* y 1 *Leuconostoc mesenteroides* y 3 cepas aisladas de sidra, productoras de (1->3, 1->2)-β-D-glucano: *Lb. suebicus* CUPV221, *P. parvulus* CUPV22 y *P. parvulus* 2.6. Todas ellas se cultivaron en MRS, a 30 ºC 48 h.

La viabilidad de las distintas cepas BAL se ensayó en zumo de naranja y dos bebidas de zumo- leche: una mezcla de zumo comercial (Pascual Pacífico) y una mezcla casera. El zumo Pascual Pacífico contiene 42,5% de una mezcla de zumo de frutas (manzana, kiwi, naranja y zumo de limón concentrado), el 10% de leche desnatada, agua, azúcar, dextrosa, pectina, aroma, vitaminas C, E y A, clorofila y cúrcuma. La mezcla casera contenía los siguientes ingredientes: 50% de zumo de naranja natural variedad "Clemenules", 20% de leche desnatada UHT, pectina, sacarosa, y agua. Las distintas bebidas fueron inoculadas a una concentración final aproximada de 10^8 ufc/ml y almacenadas a 4 ºC en oscuridad. En la mezcla de zumo comercial, semanalmente se tomaron alícuotas para la medida del pH y el recuento de viables (agar MRS, 30 ºC, 48 h). En zumo de naranja y mezcla de zumo casera, se realizaron las medidas al inicio y al final del período de estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra la evolución de la viabilidad de las cepas ensayadas en la bebida zumo-leche comercial y las variaciones de pH a lo largo de 28 días de almacenamiento. Todas las cepas se mantuvieron viables y con recuentos de alrededor de 10^8 ufc/ml, en los tres tipos de bebidas ensayadas, zumo de naranja y dos mezclas de zumo leche, tras 28 días de almacenamiento. La única excepción fue *Lb. suebicus* CUPV221 (Fig.1) cuya viabilidad cayó 3 ordenes logarítmicos inmediatamente después de ser inoculada en la bebida zumo-leche comercial. El pH

de las tres bebidas no se modificó manteniéndose alrededor de 3,8 en zumo-leche comercial y zumo de naranja, y de 4,4 en la mezcla zumo-leche casera.

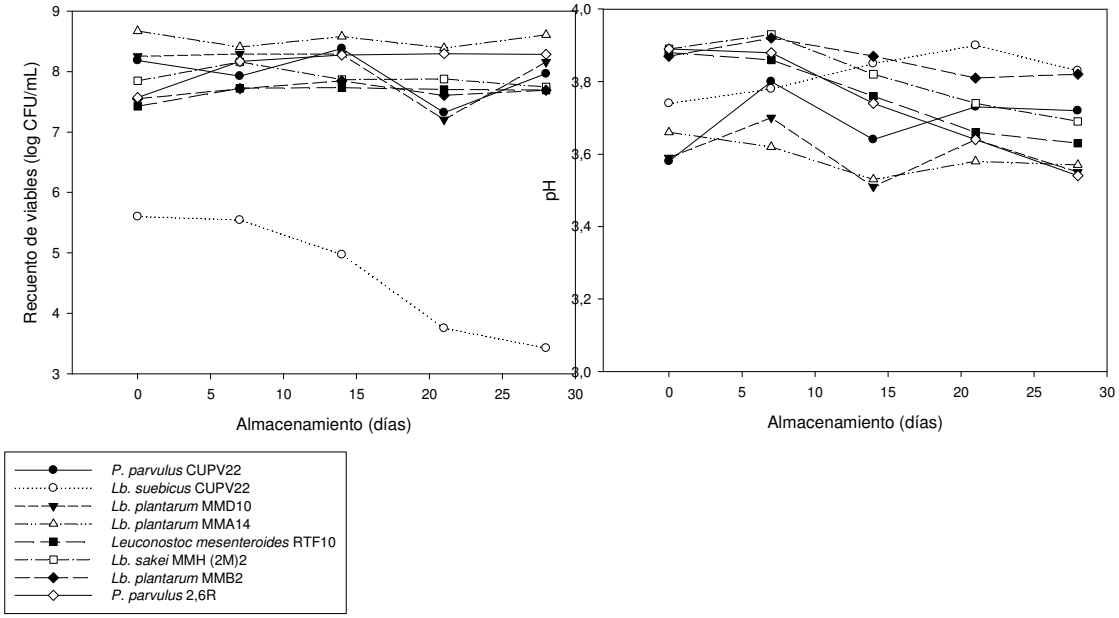


Figura 1. Recuento de viables de las distintas BAL y variaciones de pH en una mezcla zumo-leche comercial

Especies y cepas ensayadas

Lactobacillus plantarum MMA14, MMB2, MMD10
Lactobacillus sakei MMH(2M)2
Leuconostoc mesenteroides RTF10
Pediococcus parvulus 2.6, CUPV22

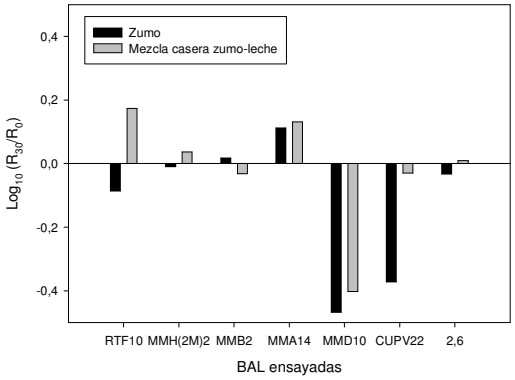


Figura 2. Supervivencia de las distintas BAL en estudio, tras su incorporación en zumo de naranja y en la mezcla zumo-leche casera, estimada por recuento en placa. R_0: recuento de viables a día 0; R_{30}: recuento de viables después de 28 días de almacenamiento, a 4 ºC en oscuridad.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que tanto el zumo de naranja como las mezclas zumo-leche ensayadas son alimentos adecuados como vehículo para las cepas con potencial probiótico en estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fernández de Palencia, P., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Duenas, M. T., Irastorza, A., Corbi, A. L., López, P. (2009). Probiotic properties of 2-substituted (1,3)-b-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. Appl. Environ. Microbiol. *75,* 4887-4891.

Immerstrand, T., Paul, C. J., Rosenquist, A., Deraz, S., Mårtensson, O. B., Ljungh, Å., Blücher, A., Öste, R., Holst, O., Nordberg Karlsson, E. (2010). Characterization of the properties of *Pediococcus parvulus* for probiotic or protective culture use. J. Food Prot. *73*, 960-966.

P141 EFECTOS DE LA FIBRA ANTIOXIDANTE DE UVA SOBRE BACTERIAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Sara Casado[1], Mª José Pozuelo[1], Francisco Llinares[1], Rafael Rotger[3] e Isabel Goñi[2]
[1] Departamento de Biología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urb. Montepríncipe
28668 – Boadilla del Monte, Madrid.
sara.casadoviolat@ceu.es
[2] Departamento de Nutrición y Bromatología I y [3] Departamento de Microbiología II e IRYCIS, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. 28040, Madrid,

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La *fibra antioxidante de uva* (FAU), elaborada a partir de subproductos de vinificación, es un concentrado de fibra con una significativa cantidad de compuestos polifenólicos antioxidantes asociados, (polifenoles extraíbles y polifenoles no extraíbles por su fuerte unión a la matriz de fibra). Se han descrito efectos beneficiosos de los polifenoles, principalmente en enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Su actividad biológica depende de su biodisponiblidad: La mayor parte de los compuestos fenólicos contenidos en FAU llegan al colon, donde son fermentados por las bacterias intestinales conjuntamente con los polisacáridos de la fibra (1). La investigación sobre el efecto de los polifenoles en la microbiota intestinal se ha centrado principalmente en la inhibición de bacterias patógenas, siendo menos conocida su interacción con probióticos (2, 3). Se ha descrito que *Lactobacillus y Bifidobacterium* son menos inhibidos por polifenoles del te que otras bacterias (4), y datos previos de nuestro laboratorio indican que algunos compuestos fenólicos de uva potencian el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* (5).

Este proyecto se propone evaluar la influencia de los compuestos polifenólicos asociados a los polisacáridos de la fibra antioxidante de uva en el crecimiento de bacterias intestinales probióticas, lactobacilus y bifidobacterias.

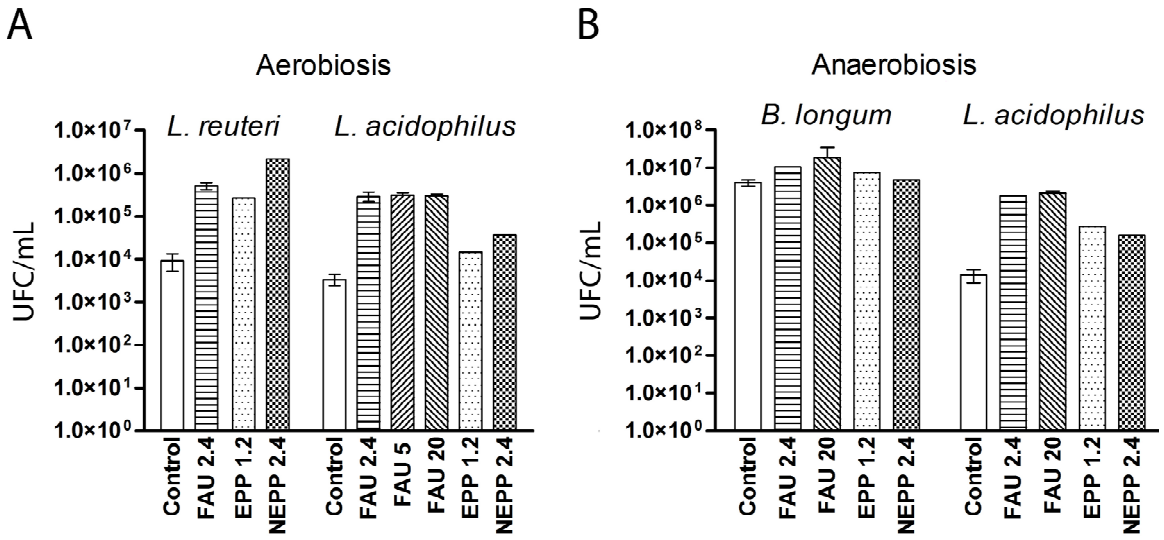
MATERIAL Y MÉTODOS

La FAU se obtuvo de subproductos de vinificación (uva tinta variedad Cencibel, cosecha 2005, La Mancha) según patente ES2259258A1. Se utilizaron además dos fracciones de FAU, una conteniendo polifenoles extraídos secuencialmente con metanol/agua en medio ácido y con acetona/agua (EPP), y un residuo de polifenoles no extraíbles (NEPP) formado principalmente por proantocianidinas (1).

Se utilizaron las cepas *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272, cultivadas en medio Rogosa Agar (Pronadisa), suplementado con L-cysteine (0,05 % p/v) en el caso de *B. longum*. Los inóculos se prepararon a DO_{550}=1, diluyéndolos a continuación 1:200 en medio MRS (Pronadisa). Se inocularon 50 µL en tubos Falcon con 5 mL de medio MRS (suplementado con L-cysteine para *B. longum*) y tras añadir FAU (concentración final: 2,4, 5, ó 20 mg/mL), EPP (concentración final: 1,2 mg/mL), NEPP (concentración final: 2,4 mg/mL), o nada (tubo control), se incubaron 24±2 h a 37 ºC in un agitador orbital (100 rpm) in condiciones aerobias o anaerobias. El crecimiento se midió por recuento en Agar Rogosa por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los ensayos realizados en aerobiosis (A) se observó una estimulación por FAU del crecimiento de *L. reuteri* y *L. acidophilus* de casi dos logaritmos. El efecto de las fracciones EPP y NEPP sobre *L. reuteri* fue similar al de FAU, sin diferencias significativas, mientras que resultó muy inferior en el caso de *L. acidophilus*. Sobre esta bacteria se ensayaron distintas concentraciones de FAU, sin detectarse diferencias.



La estimulación del crecimiento de *B. longum* no fue significativa (B). Para descartar un efecto de la anaerobiosis se ensayó *L. acidophilus* en las mismas condiciones, obteniendo con esta bacteria los mismos resultados que en aerobiosis.

Se han publicado resultados compatibles *in vivo* con polifenoles suministrados a ratas con dietas altas en grasas, detectando con mayor frecuencia *Lactobacillus* en el grupo tratado, y sin que el incremento de *Bifidobacterium* fuese significativo (6). Estos datos confirman nuestros resultados previos con *L. acidophilus* (5).

CONCLUSIONES

La FAU potencia el crecimiento de *Lactobacillus,* sin que se aprecien diferencias significativas en la potenciación con polifenoles extraíbles o fracciones no extraíbles. Ninguno de los productos ensayados potenció significativamente el crecimiento de *Bifidobacterium,* no observándose en ningún caso inhibición.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goñi, I., Martín, N., Saura-Calixto, F., 2006. *In vitro* digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. *Food Chemistry*, 90, 281-286.
2. Almajano, M., Carbó, R., López-Jiménez, J., Gordon, M., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem*, 108, 55-63.
3. Rodriguez Vaquero, M.J., Alberto, M., Manca de Nadra, M., 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18, 93-101.
4. Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.S., Lee, Y.K., 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol.*, 157, 876-884.
5. Hervert-Hernández, D., Pintado, C., Rotger, R., Goñi, I., 2009. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *Int. J. Food Microbiol.*, In Press, Accepted Manuscript,
6. Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A.P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A., 2005. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutat. Res.*, 591, 237-246.

CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

COMUNICACIONES ORALES

O70 INACTIVACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* MEDIANTE BACTERIÓFAGOS EN QUESO SEMICURADO

Ana Rodriguez, Edita Bueno, Beatriz Martínez y Pilar García
Dpto. de Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Crta. de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, España.
anarguez@ipla.csic.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan y provocan la lisis de bacterias, siendo inocuos para las células eucariotas. La utilización de fagos para combatir infecciones bacterianas (terapia fágica) se remonta al primer tercio del siglo XX, pero el desarrollo de los antibióticos en la década de los cuarenta, restringió su uso a algunos países del Este de Europa y a la antigua URSS. Actualmente existe un renovado interés científico sobre las posibles aplicaciones de los fagos, entre las que cabe destacar su uso como *bioconservantes* para combatir las contaminaciones bacterianas en alimentos (García *et al.,* 2008). Una de las ventajas que los fagos tienen sobre otros conservantes es su especificidad, pues actúan frente a un determinado microorganismo sin afectar a la viabilidad de otras bacterias de interés (p.e., la microbiota láctica en alimentos fermentados). Cabe señalar además, que no se han detectado efectos adversos sobre la microbiota comensal cuando se han administrado fagos por vía oral en humanos (Bruttin and Brussow, 2005). En este contexto, hemos evaluado la capacidad de un cóctel de bacteriófagos (phiSauS-IPLA88 + phiSauS-IPLA35), que infectan a *Staphylococcus aureus*, para combatir la contaminación causada por este microorganismo durante la elaboración de queso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacterias y Bacteriófagos. La cepa *S. aureus* Sa9 (*sec*$^+$), aislada de leche de vaca con síntomas de mamitis, ha sido utilizada para contaminar la leche utilizada en la elaboración de queso y como cepa huésped para propagar los fagos. La cepa se creció habitualmente en caldo 2xTY (Sambrook *et al.,* 1989), (37ºC, 18 h). El medio Baird-Parker Agar suplementado con yema de huevo-telurito (BP-YT) se utilizó para el recuento diferencial de la misma. En la elaboración de queso se utilizó como cultivo iniciador la mezcla de cepas constituida por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 542, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* IPLA 838 y *Leuconostoc citreum* IPLA 979, crecida en leche UHT a 30ºC/18 h. Los bacteriófagos phiSauS-IPLA88 y phiSauS-IPLA35 son variantes líticas de fagos aislados de leche cruda (García *et al*., 2009). Las suspensiones de fagos se purificaron mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Sambrook *et al.,* 1989). La titulación de fagos se llevó a cabo mediante ensayo en placa (García *et al*., 2007).

Elaboración de queso. En la Planta Piloto del IPLA-CSIC se elaboraron 3 lotes independientes de queso con leche entera y pasterizada de vaca. La leche se distribuyó en dos cubas de 12 L (control y test) y se suplementó con 0.02% $CaCl_2$. A cada cuba se añadió un 1% (v/v) del iniciador y 8×10^5 UFC/mL de *S. aureus* Sa9. A la cuba test se le añadió además 5×10^6 UFP/mL de la mezcla de fagos (phi-IPLA35 + phi-IPLA88, (1:1)) como agente bioconservante. Tras la adición de cuajo animal (0,3 g/L, actividad: 1:10.000), el proceso de coagulación (32ºC) se completó en 45 min. La cuajada escurrida se distribuyó en moldes cilíndricos. Tras el prensado y salado, los quesos se maduraron durante 30 días 11ºC y 80% HR.

Análisis microbiológicos. El recuento de bacterias lácticas y *S. aureus* en leche, cuajada y en queso, se llevó a cabo en Agar MRS y BP-YT, respectivamente, mientras que la enumeración de bacteriófagos (título de fagos) se llevó a cabo mediante el ensayo en placa.

Análisis químicos. En muestras de leche, cuajada y queso se determinaron pH, extracto seco, grasa y proteína, según los métodos de la Federación Internacional de Lechería (IDF-FIL).
Análisis estadístico. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa SPSS-PC+4.0 (SPSC Inc., Chicago, EEUU). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía sobre los parámetros físico-químicos y microbiológicos, utilizando el tipo de queso como factor con dos categorías diferentes: control sin fagos y test con fagos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de bacteriófagos como bioconservantes no afectó a las características físico-químicas del queso, dado que no se observaron diferencias significativas entre los quesos control y test a lo largo del período de maduración.
Por otro lado, la microbiota láctica mostró una evolución similar en ambos tipo de queso, mostrando un incremento inicial de 2 unidades logarítmicas durante el proceso de coagulación, debido fundamentalmente a la concentración de bacterias asociada a la expulsión del suero. Una posterior multiplicación de este grupo microbiano fue observada durante los primeros días de maduración en ambos tipos de queso, manteniéndose posteriormente estable hasta el final del período de maduración, con niveles de $3{,}3 \times 10^9$ UFC/mL.
La población de *S. aureus* Sa9 se vio significativamente afectada por la presencia de bacteriófagos ($P<0{,}05$), los cuales ejercieron un acusado efecto bactericida, de tal modo que el nivel de estafilococos en leche ($3{,}16 \times 10^5$ UFC/mL) se redujo hasta $2{,}29 \times 10^3$ UFC/mL en cuajada, y continuó disminuyendo progresivamente, aunque de forma menos acusada hasta el final de la maduración, donde se detectaron $1{,}69 \times 10^1$ UFC/mL. El título de fagos (UFP/mL) mostró un ligero incremento (0,61 log) durante el proceso de coagulación, manteniéndose prácticamente constante a lo largo de la maduración. Por el contrario, en ausencia de fagos, *S. aureus* Sa9 se multiplicó durante las primeras 24 h, alcanzando $9{,}54 \times 10^7$ UFC/mL en cuajada, y $1{,}48 \times 10^8$ UFC/mL en queso de 1 día. Posteriormente, la población de estafilococos mostró una leve pero continuada disminución, hasta alcanzar niveles de $5{,}37 \times 10^6$ UFC/mL, lo que supone una diferencia de 5.5 log respecto a la población de *S. aureus* cuando se utilizan fagos como agentes bioconservantes.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos reflejan la efectividad de los bacteriófagos para reducir la contaminación estafilocócica en quesos.
La persistencia de cierto nivel de contaminación al final del periodo de maduración indica que es necesario optimizar la relación fago/bacteria para conseguir la completa eliminación de bacteria contaminante, dado que el éxito de la infección fágica y posterior muerte de la bacteria depende de esa relación (Cairns *et al.*, 2009) y de las condiciones ambientales (Guenther *et al.*, 2009).
La capacidad inhibitoria de la mezcla de fagos frente a *S. aureus* es particularmente relevante para mantener la población de estafilococos que potencialmente puedan contaminar la leche destinada a la producción de queso, por debajo de 10^5-10^6 UFC/mL, concentraciones que producirían cantidades de enterotoxina peligrosas (0,9 μg) para la salud del consumidor si la cepa contaminante es enterotoxigénica (European Comisión, 2003).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bruttin, A., H. Brussow. (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. A*ntimicrob Agents Chemother* 49: 2874–2878.
Cairns, B. J., A. R. Timms, V. A. A. Jansen, I. F. Connerton, R. J. H. Payne. (2009). Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PloS Pathog.* 5: 1-10.
EC Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses (adopted on 26-27 March 2003):1-73.
García, P., C. Madera, B. Martínez, A. Rodríguez (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J*. 17: 1232–1239.
García, P., B. Martínez, J. Obeso, A. Rodríguez. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. Let. Appl. Microbiol. 47:479-485.
García, P., C. Madera, B. Martínez, A. Rodríguez, J. E. Suárez. (2009). Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *J. Dairy Sci.* 92:3019–3026.
Guenther, S., D. Huwyler, S. Richard, M. J. Loessner. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environm. Microbiol.* 75: 93–100.
Sambrook, J., T. Maniatis, E. F. Fritsch. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

O113 APLICACIÓN DEL CONCEPTO DE LAS BARRERAS ("HURDLE CONCEPT") COMO ESTRATEGIA PARA AUMENTAR LA VIDA ÚTIL DE FILETES DE PECHUGA DE POLLO

Jose M. Rodríguez-Calleja[1], *Malco Cruz-Romero*[2], *Mauric, O'Sullivan*[2], *María-Luisa García-López*[1] y *Joseph P. Kerry*[2]
[1]*Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, 24071, León.*
jm.rcalleja@unileon.es
[2]*School of Food and Nutritional Sciences, University College Cork, Cork, Ireland.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El concepto de las barreras o "hurdle concept" implica todos los factores que pueden utilizarse en la conservación de los alimentos. La aplicación inteligente de estas barreras ha sido empleada en algunos estudios para potenciar la

conservación de productos cárnicos (Ntzimani et al., 2010).
La tecnología de envasado en atmósfera modificada (EAM) se ha desarrollado enormemente en las últimas décadas y ha contribuido a la mejora de la comercialización y la calidad de la carne y los productos cárnicos. Los efectos beneficiosos del EAM pueden potenciarse mediante la combinación eficaz con otras tecnologías. La aplicación de ácidos orgánicos sobre algunos productos alimenticios puede retrasar su alteración debido a la producción de efectos bacteriostáticos y bactericidas. Por otro lado, tratamientos con altas presiones hidrostáticas (HHP) de entre 300 y 600 MPa también pueden inactivar o reducir los microorganismos alterantes presentes en la carne (Knorr, 1995). El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la combinación de diferentes barreras (altas presiones hidrostáticas, ácidos orgánicos y envasado en atmósfera modificada) para incrementar la vida útil de filetes de pechuga de pollo almacenados a 4°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Filetes de pechuga de pollo fueron adquiridos de una industria procesadora de carne de pollo en Clonakilty (Cork, Irlanda). Una vez en el laboratorio, los filetes fueron divididos en 4 grupos: i) muestras control, sin tratar y EAM ("C"); ii) muestras tratadas con solución de Articoat DPL y EAM ("A+EAM"); iii) muestras sometidas a tratamientos con altas presiones y EAM ("HP+EAM"); iv) muestras tratadas con solución de Articoat DPL, altas presiones y EAM ("A+HP+EAM").
Para las muestras tratadas con Articoat™, un producto comercial (Chemital S.A., Terrassa, España) de uso alimentario compuesto por una mezcla de ácido láctico, ácido acético y diacetato sódico; los filetes de pechuga de pollo fueron sumergidos durante 10 segundos en una solución preparada siguiendo las instrucciones del fabricante (Articoat™:agua; 1:4). Posteriormente las pechugas de pollo se escurrieron durante 5 minutos para eliminar el exceso de la solución.
Filetes de pechuga de pollo envasados al vacío (dos veces) en bolsas combivac (Alcom, Campogalliano, Italia) fueron tratados a 300 MPa durante 5 minutos a 20 °C en un vaso de procesado por altas presiones (Iso-Lab 900 Power High Pressure Food Processor; Stansted Fluid Power Ltd., Stansted, R.U.), usando como medio de transferencia una mezcla de etanol:aceite de castor (90:10).
Todas las muestras fueron envasadas en atmósfera modificada en una envasadora tipo VS 100 BS (Gustav Muller and Co., Alemania), sobre bandejas de poliestireno/EVOH/polietileno (8-12 $cm^3/m^2/24h$ a 25 ºC), selladas con película plástica de baja permeabilidad al O_2 (3 $cm^3/m^2/24h$ a 25 ºC) suministradas por Cryovac (Lausanne, Suiza). La mezcla gaseosa usada fue 30:70 (CO2 / N2).
Durante el almacenamiento, a intervalos regulares, se realizaron análisis microbiológicos y fisico-quimicos. Las determinaciones microbiológicas realizadas fueron: microorganismos totales a 7ºC en placas Compact Dry-TC (Nissui Pharmaceutical, Co. Ltd., Japón), *Pseudomonas* en CFC agar (Oxoid, Basingstoke, R.U.), *Brochothrix thermosphacta* sobre placas de STAA (Oxoid), bacterias ácido lácticas (BAL) en placas de MRS agar (Oxoid) y coliformes y *Escherichia coli* en placas Compact Dry-EC (Nissui Pharmaceutical). Los análisis fisico-químicos realizados fueron: características de color (valores CIE *L*, *a* and *b*) usando un colorímetro Minolta CR-300 (Minolta Camera Co. Ltd., Japón); pH; la estabilidad oxidativa a partir de la valoración de TBARS, las pérdidas por cocción después de un tratamiento térmico a 75 ºC durante 5 minutos, y el análisis de textura mediante la medida instrumental de la fuerza de cizalla Warner-Bratzler (Stable Micro Systems, R.U.). La evaluación sensorial fue realizada en muestras cocidas a una temperatura interna de 75°C, en una escala estructurada de 10 cm, por un panel de 15 expertos consumidores. Los atributos evaluados fueron: color, terneza, jugosidad, sabor oxidado, sabor desagradable, y aceptabilidad general.
Los parámetros estadísticos básicos, así como un análisis de varianza para conocer el efecto del día de almacenamiento y el tratamiento aplicado sobre los parámetros determinados, fueron calculados y analizados mediante el software Statistica v. 6.1 (StatSoft, Chicago, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las combinaciones de tratamientos más eficaces para aumentar la vida útil de los filetes de pechuga de pollo, preservando su calidad sensorial y microbiológica, fueron en el siguiente orden: "A+HP+EAM" (28 días) > "HP+EAM" (14 días) > "A+EAM" (14 días) > C (7 días).
Las muestras de pechuga tratadas con la combinación de las barreras "A+HP+EAM" fueron almacenadas hasta 28 días sin signos aparentes de alteración, especialmente en las características organolépticas de color, jugosidad y aceptabilidad general, lo cual representa un incremento superior al 180% respecto a la durabilidad de las muestras control. Este aumento de la vida útil fue superior al presentado para carne de pollo en otros trabajos que combinaban ácidos orgánicos y EAM, hasta 17 días (Zeitoun y Debevere, 1992) o 21 días (Jimenez et al. 1997), aceite esencial de orégano y EAM, hasta 12-14 días (Chouliara et al., 2007), o HHP con tratamientos térmicos suaves, hasta 28 días (Hugas et al., 2002). El nivel de microorganismos psicrotrofos no alcanzó el límite de detección de la técnica utilizada (0,7 log ufc/g) manteniéndose constante hasta el día 21 de almacenamiento, a partir del cual se produjo un aumento progresivo hasta 6,3±0,7 log ufc/g en el día 28. En estas muestras las BAL fueron la población microbiana predominante. Tambien cabe resaltar que durante el almacenamiento, los niveles de coliformes totales, *E. coli*, *Pseudomonas* y *B. thermosphacta* no alcanzaron los límites de detección. Los parámetros indicadores estudiados no presentaron cambios significativos ($P>0.05$) respecto a los hallados inicialmente, excepto el color en los filetes en crudo. En las muestras tratadas con las combinaciones "HP+EAM" y

"A+EAM", los panelistas detectaron signos evidentes de alteración a los 21 días de almacenamiento. Las BAL también fueron el grupo microbiano mayoritario. Sin embargo, la combinación "HP+EAM" permitió un control más eficaz de las poblaciones de *Pseudomonas, B. thermosphacta*, coliformes y *E. coli*.

CONCLUSIONES

En base a los resultados del panel sensorial y la reducción de las poblaciones microbianas estudiadas, la combinación de tratamientos con ácidos orgánicos, HHP y EAM produjo un efecto sinérgico, aumentando la vida útil de filetes de pechuga de pollo en un 180% comparada con la de las muestras control. El incremento fue sólo del 40% en los tratamientos "HP+EAM" y "A+EAM".

En este estudio se pone de manifiesto que la aplicación de procesos combinados de barreras (ácidos orgánicos, altas presiones y envasado en atmósfera modificada) controla el desarrollo de la microbiota alterante de filetes de pechuga de pollo durante 28 días de almacenamiento a refrigeración, sin que sean apreciados cambios sensoriales significativos durante su consumo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chouliara, E., A. Karatapanis, I. N. Savvaidis, and M. G. Kontominas. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. Food Microbiol. 24:607-617.
2. Hugas, M., M. Garriga, and J. M. Monfort. 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. Meat Sci. 62:359-371.
3. Jimenez, S. M., M. S. Salsi, M. C. Tiburzi, R. C. Rafaghelli, M. A. Tessi, and V. R. Coutaz. 1997. Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4 ºC : influence of packaging methods J. Appl. Microbiol. 83:613-618.
4. Knorr, D. 1995. Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology, p. 159-175. In G. W. Gould (ed.), New Methods of Food Preservation. Blackie Academic & Professional, London.
5. Ntzimani, A. G., V. I. Giatrakou, and I. N. Savvaidis. 2010. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 11:187-196.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto LE004A08 (Junta de Castilla y León). Además, J.M. Rodríguez-Calleja fue beneficiario del programa "José Castillejo" (MEC).

O119 APLICACIÓN DE ELECTRONES ACELERADOS PARA MINIMIZAR EL HINCHAMIENTO TARDÍO DE LOS QUESOS Y REPERCUSIONES EN LA MICROBIOTA COMÚN

Raquel Velasco, Mª Concepción Cabeza, Mª Isabel Cambero, Lorenzo de la Hoz, Irene García Márquez y Juan Antonio Ordóñez. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

rvelasco@vet.ucm.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los problemas planteados por los anaerobios esporulados en la industria láctea no tienen la misma magnitud que en la industria conservera. Sin embargo, no deben desatenderse porque pueden causar pérdidas económicas importantes. El hinchamiento tardío de los quesos es una alteración causada por el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* y especies afines. Se debe a la fermentación butírica del lactato por aquellos clostridios, dando lugar a acético y butírico, CO_2 y H_2 (Steffen y col., 1987). Además del hinchamiento, pueden aparecer olores y sabores anómalos que rechaza el consumidor. Los productos que frecuentemente están implicados son los quesos de media y larga maduración fabricados con cuajada principalmente enzimática y los quesos fundidos. Estos quesos se caracterizan por una textura muy elástica e impermeable. Así, el gas queda atrapado en la pasta del queso y, al no poder salir al exterior, desplaza la masa formando oquedades ("ojos"). Cuanto mayor sea la acumulación de gas, mayor será presión y los ojos, manifestándose exteriormente por el hinchamiento de la pieza y en ocasiones la aparición de grietas. En quesos en maduración (13 – 15 ºC) se manifiesta dependiendo del número de esporas presentes en la leche; se ha informado de valores entre 5.0 x 10^{-2} y 1.7 x 10^{0} esporas/ml, con una media de 0.36 esporas/ml (Ingham y col., 1998), algo superior a la opinión de Klijn y col., (1995), quienes ofrecen el valor de 1 espora por 10 ml. En quesos fundidos el fenómeno es poco común si el producto se almacena bajo refrigeración, debido a la mesofilia de los clostridios, pero su frecuencia aumenta cuando se produce un abuso de temperatura en condiciones ambientales favorables para el crecimiento de las esporas, o sea, a_w>0.93 y pH relativamente elevado (Donelly y Busta, 1981). Estos microorganismos pueden crecer incluso en presencia de bacterias lácticas (LAB), como en los quesos Gouda, Cheddar y Emmental. El objetivo del presente trabajo es reducir la carga de los clostridios responsables del hinchamiento tardío del queso hasta niveles estadísticamente despreciables aplicando un tratamiento con electrones acelerados (radiación beta).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se emplearon lonchas de quesos Emmental y Cheddar adquiridas en el mercado. El pH y a_w fueron, respectivamente, de 5.93 y 0.971 para el Emmental y 5.59 y 0.953 para el Cheddar. Las muestras destinadas a evaluar el efecto de la radiación en la microbiota se re-envasaron a vacío en bolsas hasta lograr una presión de 20 kPa. Para la determinación de la cinética de destrucción de las esporas, las muestras se contaminaron sumergiendo las lonchas en una suspensión de esporas de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 en 50 ml de suero fisiológico estéril. Las muestras se sometieron a diferentes dosis de radiaciones beta en la planta de electrones acelerados de Ionisos Ibérica S.A., que opera a 10 MeV. Se utilizaron dosis entre 0.5 y 8 kGy para la cinética de

destrucción y entre 1 y 3 kGy para estudiar la evolución de la microbiota superviviente característica de cada variedad de queso. Previamente, se observó que los electrones acelerados a dosis mayores a 3 kGy afectan negativamente a las propiedades sensoriales del queso. Por ello, para estudios de viabilidad de la microbiota de los quesos no se superó esta dosis. Las radiaciones absorbidas se verificaron mediante dosímetros de celulosa irradiados conjuntamente con las muestras. Tras el tratamiento, las muestras se almacenaron a tres temperaturas (4, 10 y 14ºC). Se hicieron recuentos de mesófilos totales en PCA (Oxoid) a distintos tiempos. Las curvas de crecimiento se ajustaron al modelo de Baranyi y col., (1994). Para el recuento de las esporas, las muestras se trataron en un baño de agua a 80ºC durante 20 minutos para eliminar las formas vegetativas y activar las esporas. Se usó como medio de cultivo Reinforced Clostridial Agar (Oxoid) y las placas se incubaron en anaerobiosis a 37ºC durante 48 horas. A partir de las gráficas de supervivencia, se calculó el valor D.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como era de esperar, la respuesta de las esporas frente a las radiaciones beta se ajustó a una ecuación de primer orden, hallándose valores D de 1.70 kGy y 2.44 kGy en los quesos Cheddar y Emmental, respectivamente. Se observó que los recuentos de las muestras no irradiadas era inferior (aparición de "hombros") a los de las tratadas a 0.5 kGy. Este fenómeno, muy común en experimentos de tratamientos térmicos (Stumbo, 1973), se debe a una activación de las esporas durante el calentamiento, de forma que el número de esporas activadas supera al de las destruidas. En este caso, podría ocurrir lo mismo, por lo que la ecuación de regresión se halló sin tener en cuenta el recuento original. En la introducción se ha recogido la opinión de algunos autores acerca de la carga normal de esporas de *C. tyrobutyricum* en leche cruda. Asumiendo, por una parte, una contaminación de 0,36 esporas/ml y, por otra, que 10 litros de leche (3600 esporas) da lugar a un rendimiento de un queso fresco de un kilogramo, se retendrían en la cuajada 360 esporas dado que el 90% de la totalidad se va con el suero. De acuerdo con Fryer y Halligan (1976), la contaminación de 1 espora/g de queso podría causar hinchamiento tardío. En consecuencia, 36 quesos de cada 100 fabricados podrían presentar esta alteración. Sin embargo, como la aplicación de 3 kGy reduce el contenido de esporas en aproximadamente 2 y 1.2 unidades logarítmicas para el Cheddar y el Emmental respectivamente, siguiendo el ejemplo anterior, sólo un 0.36 % del primero y un 2.3% del segundo serían susceptibles de alteración. Se puede concluir que este tratamiento proporcionaría un gran beneficio económico y comercial a la industria láctea sin que el consumidor pueda detectar cambios sensoriales.

La microbiota mayoritaria de un queso en maduración de tres meses se compone de bacterias lácticas, como en el queso Cheddar y de otras bacterias características de la variedad además de las lácticas, como las propionibacterias en el queso Emmental. En cualquier caso, el recuento total es del orden de 10^7 – 10^8 ufc/g. Esta población es no esporulada y, por tanto, más radiolábil que las esporas de *C. tyrobutyricum*. Por ello, su número también se vería reducido al aplicar la radiación beta. Con un tratamiento de 3 kGy, el recuento se redujo en 4.6 y 5.7 unidades logarítmicas en el Emmental y Cheddar, respectivamente, pero después las células supervivientes se recuperan y vuelven a multiplicarse dado que el medio es idóneo para ello. En el queso Emmental, esta recuperación no se observó en las muestras bajo refrigeración ya que los recuentos se mantuvieron estables durante todo el almacenamiento. Sin embargo, en los quesos mantenidos a temperatura de maduración (14 ºC), las bacterias supervivientes se multiplicaron hasta alcanzar valores cercanos a los habituales en tiempos que fueron más largos a medida que la dosis era mayor. A 14 ºC, el recuento total de las muestras control (no irradiadas) mostró un comportamiento habitual, es decir, sin cambios durante todo el experimento pero en las muestras irradiadas se observó que la fase de latencia y el tiempo de duplicación siguieron una tendencia que dependía de la dosis utilizada; a medida que éstas aumentaban, se incrementaban ambos parámetros. En el queso Cheddar, la microbiota irradiada se recuperó en todos los casos, incluso a temperatura de refrigeración. Por lo demás, la evolución de los parámetros respecto al tiempo de almacenamiento/maduración se ajustó a un modelo similar al de la microbiota del queso Emmental. Las diferencias observadas a temperatura de refrigeración pueden deberse a la distinta naturaleza de las LAB de una y otra variedad de queso. Las LAB que participan en la maduración del queso Emmental son dos especies (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* o *L. helveticus)* termófilas que no pueden crecer a temperaturas de refrigeración, mientras que las LAB del Cheddar son principalmente lactococos mesófilos. Las propionibacterias supervivientes tampoco pueden crecer a temperaturas de refrigeración.

CONCLUSIONES

El tratamiento de quesos con dosis de hasta de 3 kGy minimiza considerablemente la presentación de hinchamiento tardío sin que se vean afectadas las propiedades sensoriales del queso. La microbiota propia del queso se recupera hasta alcanzar valores cercanos a los habituales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1994). Int. J. Food Microbiol., 23, 277-294.
Donnelly, L.S. and Busta, F.F. (1981). J. Dairy Sci., 64, 161-166.
Fryer, T., Halligan, A. (1976). New Zeal. J. Dairy Sci, 11, 132.
Ingham, S.C., Hassler, J.R., Tsai, Y-W. and Ingham, B.H. (1998). Int. J. Food Microbiol., 43, 173–183.
Klijn, N., Nieuwenhof, F.F.J., Hoolwerf, J.D., Van Der Waals, C.B. and Weerkamp, A.H. (1995). Appl. Environ. Microbiol., 61, 2919–2924.
Steffen, C., Flueckiger, E., Bosset, J.O. and Ruegg, M. (1987). Swiss – type varieties. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology-Major Cheese Groups, ed. P. F. Fox, Vol. 2, pp 93-120. Elsevier Applied Science, London.
Stumbo, C. R. (1973). Thermobacteriology in Food Processing. Academic Press, London.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado los proyectos AGL2007-65235-CO2-02/ALI y CSD 2007-00016

O130 ESTUDIO DE LA FLORA MICROBIANA DEL POLEN APÍCOLA

Inmaculada, Fernández[1], Mª Luisa Ortiz[1], Ana Mª Pedregosa[1], María Aller[1], Amelia González[2] y Ana Quintana[2]
[1]Departamento de Microbiología Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá.UAH. Campus Universitario, 28871. Alcalá de Henares, Madrid. inmaculada.fernandez@uah.es
[2] Centro Agrario de Marchamalo. JCCM. Marchamalo, Guadalajara.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El polen apícola es un producto alimenticio rico en nutrientes, recolectado por las abejas a partir del polen de plantas poliníferas. Con el fin de obtener un producto microbiológicamente seguro para ser comercializado, el polen húmedo recién recolectado ha de ser sometido a un tratamiento térmico de secado, para reducir la carga microbiana inicial y evitar el crecimiento microbiano durante su conservación. Para mantener todo el valor nutritivo del polen, es importante aplicar temperaturas y tiempos de secado adecuados, que permitan el control de la carga microbiana sin alterar las propiedades nutritivas de este alimento.

En este trabajo se ha estudiado la calidad microbiológica del polen recolectado en los apiarios de Malaguilla y del Centro Agrario de Marchamalo (CAR) en Guadalajara en la primavera del 2009. Parte del polen recién recolectado fue almacenado congelado, parte fue almacenado en un refrigerador y parte fue deshidratado aplicando $T^{a}s$ de 40 y 50ºC durante 5 horas. En estas muestras de polen, se determinó la presencia de indicadores de contaminación fecal (coliformes, clostridios y enterococos), de *Pseudomonas*, de estafilococos y la carga global bacteriana y fúngica. Los datos se relacionaron con el contenido de humedad y la a_w del polen. El análisis microbiológico se repitió un año después de la recolección con el fin de estudiar el estado de conservación del polen congelado, fresco y seco desde un punto de vista microbiológico. Además, se aislaron e identificaron algunas de las bacterias y hongos presentes en el polen conservado durante al menos 9 meses.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis microbiológico, se preparó una suspensión de 10g de polen en 100 ml de agua de triptona (dilución 10^{-1}) y a partir de la suspensión inicial se prepararon diluciones seriadas. Volúmenes conocidos de cada dilución se utilizaron para inocular diferentes medios de cultivo sólidos, bien en profundidad o por extensión en superficie.

Los medios utilizados fueron: SPS para determinar Clostridios Sulfito Reductores; PCA para determinar aerobios mesófilos; R2 para valorar microorganismos oligotrofos; McConkey para determinar enterobacterias fermentadoras de lactosa; Levine para el recuento de coliformes totales y fecales; Manitol salado para el recuento de estafilococos; Sabouraud con cloranfenicol para detectar hongos y levaduras; Agar Cetrimida para el recuento de *Pseudomonas* y MYPGP en anaerobiosis para determinar la presencia de *Paenibacillus larvae.*

Tras la incubación a la T^{a} adecuada, se contaron las colonias crecidas en el agar para obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de polen. La a_w y el grado de humedad del polen fueron valorados en el Centro Agrario de Marchamalo.

Las bacterias, hongos filamentosos y levaduras que crecieron en diversos medios, fueron aislados mediante resiembras en placa utilizando el mismo medio de cultivo. La identificación de los hongos se hizo mediante la observación de hifas y conidos al microscopio de contraste de fases teñidos con el colorante vital azul de lactofenol. Las bacterias fueron identificadas en base a caracteresticas fenotípicas y mediante las galerías de pruebas bioquímicas API 20E y API 50 CH, con la ayuda del software de identificación https://apiweb.biomerieux.com/.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el polen existe una flora microbiana formada por microorganismos aerobios mesófilos, oligotrofos y hongos (Figura 1). En ninguna de las muestras de polen analizadas se detectó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal, ni de *Pseudomonas,* ni *Paenibacillus larvae*, agente causante de la loque americana en larvas de *Apis mellifera.* El tratamiento de secado redujo en gran medida la carga de bacterias aerobias mesófilas y de hongos, siendo esta reducción de, aproximadamente, un 60% a 40ºC en ambos casos, pero de un 90% a 50ºC para bacterias y un 40% para hongos. La reducción de la carga microbiana es proporcional a una disminución de la a_w en el polen después del tratamiento de secado.

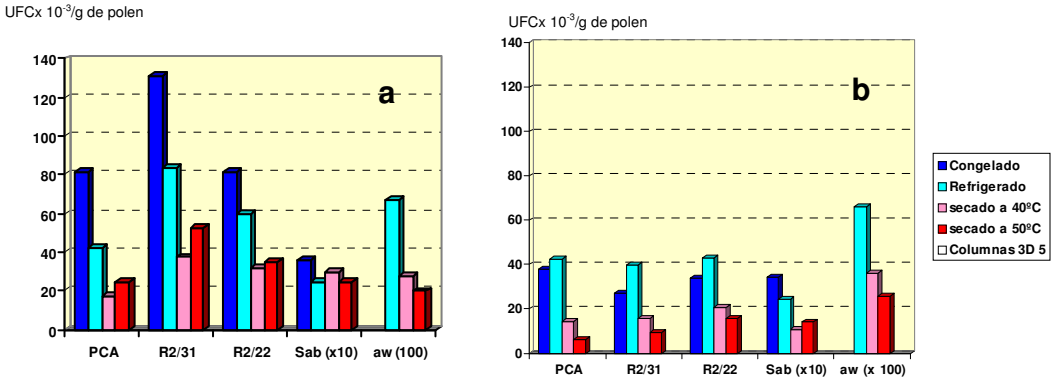


Figura 1. Recuento de la flora microbiana en los colmenares de (a) Malaguilla y de (b) el CAR en el 2009.

En la mayoría de las muestras, la carga microbiana valorada un año después fue considerablemente inferior a la determinada en el momento de la recolección, incluso en las muestras de polen sin deshidratar que se almacenaron congeladas y refrigeradas (Figura 2). Esto podría indicar que en el control microbiano de este alimento participa, no solo la condición de falta de agua, sino también algún componente del polen con actividad antimicrobiana.

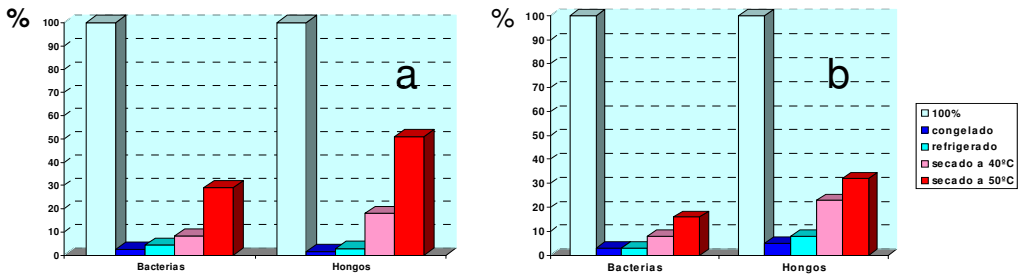


Figura 2. Porcentaje de la carga microbiana inicial en el polen almacenado de (a) Malaguilla y (b) el CAR.

En el polen del CAR y Malaguilla almacenado al menos durante 9 meses se aislaron las siguientes bacterias *Pantoea* spp; *Bacillus pumilus; B. subtilis/amyloliquefaciens; B. megaterium; B. licheniformis; B. lentus; B. cereus; Geobacillus thermoglucosidasius; Paenibacillus amylolyticus; P. polymyxa, Staphylococcus sciuri y Streptomyces* ssp. Se aislaron también diversas levaduras y hongos filamentos que se están identificando en la actualidad. La única bacteria Gram negativa aislada del polen fue *Pantoea* spp. Aparentemente, tras algunos meses de conservación la mayor parte de la flora microbiana del polen consiste en bacterias Gram pocitivas formadoras de esporas como *Bacillus* y *Paenibacillus, Streptomyces* y de hongos filamentosos.

CONCLUSIONES

El tratamiento térmico (40 y 50ºC /5 horas) aplicado al polen para deshidratarlo reduce la carga de bacterias y hongos. En el polen almacenado durante un año, se reduce de forma natural la carga microbiana tanto en el polen fresco almacenado congelado o refrigerado, como en el deshidratado almacenado a Tª ambiente. Tras el almacenamiento, la flora microbiana residual consiste mayoritariamente de bacterias Gram + formadoras de esporas y hongos filamentosos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Yook, H.S.; Lim, S.; Byun, M. Journal of food protection 61, 217-220. 1988. REAL DECRETO 2685/1976 de 16 de octubre

M.R. Pascual Anderson y V. Calderón y Pascual (2000) Microbiología Alimentaria 2ªEd. Ed. Díaz de Santos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se integra en un proyecto financiado por INIA (RTA2007-0072-C03-02).

POSTERS

P69 DETERMINACION DE LA CINETICA DE TERMODESTRUCCIÓN DE *B.CEREUS* Y *E.COLI* EN UN INTERCAMBIADOR DE CALOR Y VALIDACIÓN FRENTE A UN EQUIPO DE REFERENCIA

Juan-Pablo Huertas[1], Maria-Dolores Esteban[1], Maria Dolores Bastida, Maria Sánchez, Arturo Esnoz[1] y Alfredo Palop[1]*

[1]Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de ingeniería de alimentos y del equipamiento agrícola, Escuela Técnica superior de ingeniería agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 52. 30203 Cartagena, España. alfredo.palop@upct.es.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los intercambiadores de calor han adquirido una creciente importancia en las industrias de procesado de alimentos, debido a la creciente importancia del ahorro de energía, a la disminución de costes y tiempos de procesado y a la mejora en la calidad organoléptica y nutritiva de los alimentos en ellos procesados [1]. Por tanto se hace necesario conocer la cinética de termodestrucción de los microorganismos en estos equipos y para ello se diseñó un intercambiador a escala piloto para su estudio. Los objetivos de este estudio fueron conocer el efecto de las velocidades de calentamiento y tiempos de tratamiento sobre microorganismo patógenos y validar los resultados frente a un equipo de referencia. Estos datos son muy importantes para poder estimar el efecto del tratamiento en el producto, conocer el proceso de inactivación térmica que sufren los microorganismos y poder asegurar la fiabilidad de los resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Microorganismos: Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* CECT *4031* y *Bacillus Cereus* INRA-AVZ 421.

Estimación de la resistencia al calor en el termorresistometro Mastia: Los tratamientos aplicados a los diferentes microorganismos en este equipo se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Conesa *et.al* 2009.

Estimacion de la resistencia al calor en el intercambiador de calor: El intercambiador de calor (HRS Spiratube Murcia, España) es tubular con 4 tramos de calentamiento (tubos concéntricos y corrugados) y 1 tramo de mantenimiento. Entre cada uno de estos tubos hay codos en los que se sitúan las sondas de temperatura y los puntos de muestreo. El flujo en el tubo interior, por el que circulan lo microorganismos, es de tipo turbulento, gracias a la corrugación. El fluido calefactor para temperaturas por debajo de 100ºC es un aceite diatérmico Oleotherm 333 (AGIP, Gavá, España) y para temperaturas superiores se utilizo vapor. El producto es bombeado por una bomba peristáltica, cuyo caudal es variable en función del tipo de producto o experimento que se desee realizar. Las sondas están conectadas a un datalogger en el que se registra y se monitorea la evolución de la temperatura de cada sonda a lo largo del tiempo. Para los tratamientos térmicos se utilizó como medio de transporte caldo infusión cerebro corazón (B.H.I) (Scharlau, Barcelona, España), y se tomaron en cada punto luego del tiempo de residencia del producto dentro del equipo a los diferentes caudales ensayados.
Recuento de supervivientes: Todas las muestras de los diferentes tratamientos realizados, se tomaron de forma aséptica. Se sembraron las diluciones apropiadas en agar caldo infusión cerebro corazón (B.H.I.A; Scharlau, Barcelona, España). Las placas se incubaron a 37ºC por 24 horas y posteriormente se realizó el recuento.
Análisis de los resultados: Para determinar la termorresistencia del microorganismo bajo condiciones isotérmicas se calculó el tiempo de reducción decimal (valor D_T), para cada temperatura evaluada, a partir del valor de la pendiente de la regresión lineal de las correspondientes gráficas de supervivencia.
A partir de la representación de los valores D *vs.* su temperatura de tratamiento (grafica de termodestrucción) se determinó el valor z.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:
Se realizaron tratamientos isotérmicos en el termorresistometro Mastia para determinar el valor D de *E. coli* a distintas temperaturas con los que poder comparar los resultados que se obtuvieron en el intercambiador.
Se realizaron tratamientos isotérmicos a 57,5 ºC con el equipo en configuración isotérmica, para determinar el valor D de *E. coli* en el equipo. Se determinó la temperatura más baja y la más alta registradas durante el proceso, y se calcularon los valores D teóricos a partir de la ecuación de la línea de regresión de la gráfica de termodestrucción [2]. La temperatura media de tratamiento fue de 57,8ºC y el valor D teórico para esta temperatura fue de 1.13 minutos, y el valor D experimental fue de 1.02 minutos, no encontrándose diferencias significativas. Al comparar las reducciones logarítmicas frente a la temperatura de tratamiento, obtenidas en el termorresistometro Mastia a 57.5ºC con un tiempo de tratamiento de 30 segundos y en el intercambiador de calor a una temperatura media de tratamiento de 57.8ºC con un tiempo medio de residencia de 33.8 s, se puede determinar que los resultados obtenidos en ambos equipos concuerdan, teniendo en cuenta la incertidumbre y la variabilidad de los recuentos microbiológicos.
Para *B.cereus* se realizaron experimentos no isotérmicos con temperaturas finales de 110ºC y 115ºC, observándose que los recuentos de supervivientes obtenidos en el termorresistómetro y en el intercambiador son muy similares en ambos experimentos, con diferencias inferiores a 1 ciclo logarítmico en el peor de los casos. Se observó asimismo que los recuentos iban por debajo de la línea teórica de supervivencia, calculada a partir de la integración de la letalidad del tratamiento con los datos de termorresistencia obtenidos en condiciones isotérmicas. Estos resultados indicarían un efecto de la velocidad de calentamiento en la termorresistencia, siendo los microorganismos menos resistentes al calor cuando son sometidos a tratamientos térmicos a velocidades de calentamiento más elevadas [3,4].
Estos resultados nos permiten concluir que el equipo puede ser utilizado para la determinación de termorresistencia en flujo y que los resultados son fiables y validos ya que estos son similares a los que se obtienen en un equipo de referencia como lo es el termorresistometro Mastia.

CONCLUSIONES
Los recuentos de supervivientes de *B. cereus* obtenidos en el intercambiador y en el termorresistómetro cuando es sometido a perfiles de calentamiento similares son muy parecidos (con diferencias en torno a 1 ciclo log en el peor de los casos), lo cual demuestra la validez del intercambiador para estudiar la resistencia microbiana al calor en flujo continuo.
La velocidad de calentamiento influye en la resistencia al calor de los microorganismos, siendo éstos menos termorresistentes a velocidades de calentamiento más altas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

[1] Gösta, B. 1996. Manual de Industrias Lácteas, Tetra Pak Processing Sytems AB. Ediciones A. Madrid Vicente. Madrid. Páginas 75-89.
[2] Peleg, M. 2006. Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosistmens: Models for Predicting Growth and Inactivation. CRC press, Florida. Paginas 1-90.
[3] Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. 2009. Non-isothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia, Journal of Applied Microbiology 107. pp. 506–513.
[4] Hassani, M., Mañas, P., Raso, J., Condón, S., Pagán, R. 2005. Predicting Heat Inactivation of Listeria monocytogenes under Nonisothermal Treatments. Journal of Food Protection, Volume 68, Number 4. pp. 736-743.
[5] Zuijlen van A., Periago, Paula M., Amezquita, A., Palop, Alfredo, Brul, S., Fernandez, P.S. 2009. Characterization of Bacillus sporothermodurans IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilization. Food Research International, In Press.

P72 INACTIVACIÓN DE *LISTERIA INNOCUA* POR PULSOS DE LUZ EN AGUACATE FRESCO CORTADO

Ana Ramos-Villarroel[1], Nicoleta Aron[2], Olga Martín-Belloso[3] y Robert Soliva-Fortuny[3]
[1]Departamento de Biología y Sanidad Animal, Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, Av. Universidad Campus los Guaritos, 6201, Maturín, Venezuela.
[2]Departamento de Microbiología Aplicada, Facultad de Ciencias e Ingeniería de los Alimentos, Universidad Dunarea de Jos, 111 Domneasca, 800201, Galati, Rumanía.
[3]Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de LLeida. Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, España.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El aguacate es una fruta rica en vitaminas y minerales con un alto nivel de ácidos grasos insaturados, los cuales son muy saludables en la prevención del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y hepáticas (Kaiser y Wolstenholme, 1994). Las tecnologías del procesado de frutos frescos cortados además de aportar nutrientes, pueden comprometer la apariencia y seguridad del producto como consecuencia de las condiciones de manipulación y almacenamiento inapropiados. Los microorganismos patógenos como *Listeria* pueden contaminar el producto, incrementando el riesgo de enfermedades de transmisión alimentaria. Los pulsos de luz son tratamientos no térmicos de conservación de alimentos que utilizan pulsos intensos y de corta duración de amplio espectro desde el ultravioleta hasta la región del infrarrojo cercano (Elmnasser et al. 2007). Hoy en día existen muy pocos estudios disponibles sobre la eficacia de esta técnica para inhibir el crecimiento microbiano y extender la vida útil de los productos frescos cortados. Algunos estudios se han centrado en la calidad microbiológica sobre todo en hortalizas frescas cortadas (Gómez-López et al., 2005; Kaack y Lyager, 2007), pero no hay información disponible acerca de la eficacia de este método en la descontaminación de frutas frescas cortadas (Rojas-Graü y Martín-Belloso, 2008). El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de los pulsos intensos de luz sobre la inactivación de *L. innocua* en aguacate fresco cortado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron aguacates (*Persea americana* Mill) de la variedad Hass, según lo recomendado por el D.O.C.E. Nº 1167 (2005). La cepa de *Listeria innocua* (Laboratoire de represion des Fraudes (LRF); Montpellier, France) fue proporcionada por la Universidad de Lleida. El cultivo puro se mantuvo en Agar Triptona de Soja (TSA) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 5ºC. El cultivo creció en 100 mL de caldo triptona de soja (TSB) con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (YE) a 35ºC por 15 h a 180 rpm (células en fase estacionaria de crecimiento). La concentración de *L. innocua* en la solución madre fue de 10^9 UFC/mL y fue ajustada a 10^8 UFC/mL. Con la ayuda de un cilindro de metal, graduado y estéril, se obtuvieron trozos de aguacate con un diámetro de 1,5 y 2,5 cm de altura en condiciones asépticas. Se colocaron 10 g de aguacate en bandejas transparentes de polipropileno (PP) de 500 cm^3 y se inocularon 100 µL de la suspensión de *L. innocua* en la superficie de los aguacates. Se sellaron las bandejas con una cubierta de plástico de 64 µm de espesor con permeabilidad al O_2 y CO_2 y 0% RH, utilizando una termoselladora sin modificación inicial de la atmósfera. Una vez sellados se trataron con 0, 15 y 30 pulsos durante 15 días a 5ºC, en un equipo SteriBeam System modelo XeMaticA-2L. La duración de cada pulso fue de 0,3 ms con una fluencia de 0,8 J/cm^2 por pulso. La evolución de *L. innocua* se determinó durante el almacenamiento. Dos conteos fueron obtenidos por cada tiempo (0, 3, 6, 9, 12 y 15 d) de dos réplicas por bandeja en agar PALCAM con 1 mL de suplemento selectivo para agar PALCAM, realizando diluciones seriadas a partir de los 10 g de muestra inoculada. Las placas se incubaron a 35ºC durante 48 h. Los resultados se expresaron como Log_{10} UFC/g de aguacates. Adicionalmente se midió el pH del producto. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Statgraphics Plus versión 5.1. (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, EE.UU.). ANOVA y prueba de Duncan se usaron para las diferencias y comparar las medias de los tratamientos con un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación de pulsos de luz afectó significativamente ($p < 0,05$) los recuentos iniciales de *L. innocua* inoculada en aguacate fresco cortado no solo después del tratamiento sino durante el almacenamiento. Se observó una significativa reducción logarítmica después de tratar el producto. Así, las reducciones logarítmicas de *L. innocua* fueron de 3,64 y 3,99 para el aguacate fresco cortado (t = 0 días), tratado con 15 y 30 pulsos respectivamente. El tratamiento con 30 pulsos resultó en una mayor inactivación de *L. innocua.* Tomando en cuenta el alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados presentes en esta fruta, los valores obtenidos se diferencian de lo señalado en el trabajo de Gómez-López et al. (2005), quienes observaron que grasas, proteínas, carbohidratos y almidón son determinantes en la descontaminación por este método y que la eficiencia en la inactivación se reduce incrementando los niveles de aceite y proteínas. Sin embargo, las diferencias en el nivel de destrucción microbiana obtenidas en este estudio posiblemente estén influenciadas no solo por la composición total de la matriz alimentaria sino también por el número de pulsos e intensidad de los mismos (15 y 30 pulsos a 0,8 J/cm^2), tipo de microorganismo y de los requerimientos nutricionales de éste para su supervivencia. Los pulsos de luz causaron una significativa disminución en la población de *L. innocua* superviviente en el producto. Sin embargo, el descenso del pH (6,5 a 4,3) a través del almacenamiento también influyó en las reducciones finales del estudio entre 4 y 5 Log para 15 y 30 pulsos respectivamente. Los niveles de inactivación microbiana obtenidos en este trabajo se

pueden comparar con los obtenidos en las pocas investigaciones que existen en frutos enteros tratados por pulsos de luz. Por ejemplo Bialka y Demirci (2008) señalaron reducciones máximas de 3,9 y 3,4 log_{10}UFC/g a una energía de 72 y 59 J/cm^2 para *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* respectivamente, sobre frambuesas inoculadas.

CONCLUSIONES

El uso de los pulsos de luz redujo significativamente los recuentos iniciales de la población de *L. innocua* en aguacate fresco cortado entre 3 y 4 Log UFC/g. Sin embargo, se observó pardeamiento en las muestras a partir del segundo día de almacenamiento. Por lo tanto la aplicación de 15 o 30 pulsos a fluencias de 0,8 J cm^2 en combinación con antioxidantes es recomendable para extender la vida útil microbiológica del aguacate fresco cortado

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bialka K. L. y Demirci A. (2008). Efficacy of Pulsed UV-light for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on raspberries and strawberries. J. Food Sci. 73 (5): M201-M207.

DOCE. 2005. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Nº 387. Reglamento (CE) Nº 387/2005 de la Comisión. Normas de comercialización aplicables a los aguacates.

Elmnasser N., Guillou S., Leroi F., Orange N., Bakhrouf A. y Federighi M. 2007. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. J. Microbiol. 53:813-821.

Gómez-López V., Devlieghere F., Bonduelle V. y Debevere J. 2005. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. Int. J. Food Microbiol.103:79-89.

Kaack K. y Lyager B. 2007. Treament of slices from carrot (*Daucus carota*) using high intensity white pulsed. Eur. Food Research and Technol. 224 (5): 561-566.

Kaiser C. y Wolstenholme B. N. 1994. C. Aspects of delayed harvest of 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.) fruit in a cool subtropical climate. II. Fruit size, yield, phenology and whole-tree starch cycling. *J. Hort. Sci.* 69**:** 447–457.

Rojas-Graü M.A. y Martín-Belloso O. 2008. Current advances in quality maintenance of fresh-cut fruits. Stewart Postharvest Review. 2:6.

AGRADECIMIENTOS

El Ministerio de Ciencia y Tecnología de España apoyó este trabajo a través del proyecto AGL 2006-04775. También se agradece a la Coordinación de Recursos Humanos de la Universidad de Oriente-Venezuela, por conceder la beca para estudios doctorales de Ana Yndira Ramos Villarroel. Nicoleta Aron agradece el apoyo del proyecto DRH SOP-SIMBAD 6853, 1.5/S/15-01.10.2008. La prof. Olga Martín-Belloso agradece la concesión de Premio ICREA Academia.

P85 OCTOPUS VULGARIS IN MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING

Graciela Ramilo, Laura Pastoriza, Marta Bernárdez, Mª Teresa Blanco, Alberto Gallego and Ana B. Carrera

Tecnología de Productos Pesqueros. Instituto de Investigaciones Marinas (IIM). Agencia Estatal CSIC. C/ Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España.

graciela@iim.csic.es

INTRODUCTION

The small-scale fishery of *Octopus vulgaris* operating off the Galician coast is very important from a socio-economic perspective, because it is the largest in terms of volume of catches in Galician Rías (1). The second best selling species was common octopus in Bueu fish market (Pontevedra, Galicia) in 2008, was up to almost 300.000 Kg (2). After death, cephalopods, enter a state of high protein degradation, promoting bacterial growth leading to rapid decomposition (3, 4). The aim of this work was to determinate the shelf life of *Octopus vulgaris* packaged under modified atmosphere, using fresh and frozen-thawed common octopus. We are trying to determinate how the use of two packaging materials with different barrier properties would be reflected in the time preservation of the seafood.

MATERIAL AND METHODS

2.1 Samples preparation

Octopus with an average body weight of 2 Kg were collected in Bueu coast in November 2009 (Ría de Pontevedra, Galicia). They were stored at refrigeration temperature (3.5 ºC) until the next day and then, they were separated into two batches. Batch 1, was packaged under modified atmosphere (MAP) and batch 2, was frozen at -20 ºC for two months, approximately. After thawing, it was used the same procedure as batch 1. Packaging materials we used were: CLEAR TITE 51/52 (Bemis, Europe) and PE/PA/PE (Casfil, Portugal) pouches, having an oxygen permeability of 19 and 122 cc/m^2/24 h, respectively. Gas mixture was 83% CO_2, 5.7% O_2 and 11.4% N_2. Samples were stored at 3.5 ºC for 6 days. Every day, microbiological, chemical and sensory analyses were performed, using two samples of every batch and packaging material.

2.2 Microbiological analyses

Skin and the muscle of the tentacles were considered as separated samples. Total number of psychrotrophic organisms were determined on Nutrient Agar. Total spoilage organisms and specific spoilage indicators, H_2S-producers, were counted on Iron Agar Lyngby. All plates were incubated at 17 ºC for 3-5 days.

2.3 Chemical analyses

Total volatile basic nitrogen (mg TVB-N/100 g), trimethylamine nitrogen (mg TMA-N/100 g) and pH, were determined. Skin and the muscle of the tentacles were analyzed separated.

2.4 Sensory analyses

Appearance, odour and colour of raw octopus were sensory parameters evaluated after the opening of the packaging. The sensory attributes observed in cooked octopus were odour, colour, taste and texture.

RESULTS AND DISCUSSION

Pshychrotrophic counts in muscle, on Nutrient Agar (Fig. 1), expressed as log CFU/g, represented an initial higher proportion in fresh than in frozen-thawed octopus but it spoiled quicker and reached one more logarithmic unit at 5 storage day. MAP samples achieved a lower microbial development in frozen-thawed than in fresh octopus, for each packaging material used (TITE and PE/PA/PE). H_2S-producing bacteria (specific spoilage indicators of seafood products), were negatively affected in octopus muscle by freezing and modified atmosphere packaging.

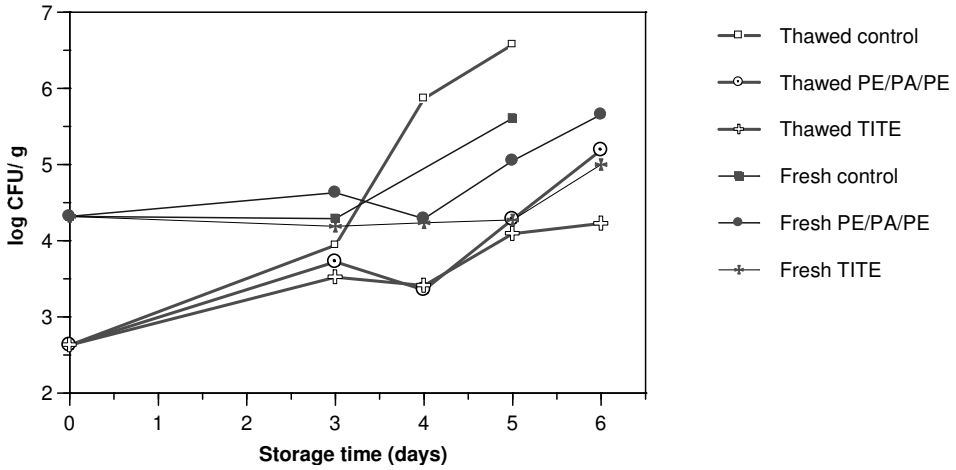


Figura 1. Psychrotrophic plate counts in muscle during the storage.

Total counts in both media were higher than H_2S-producers during 6 storage days. These results were also obtained in iced whole common octopus (6). A relation could be established between TMA-N production and the growth of H_2S-producing bacteria. From the fourth to fifth day, a big increase in this typical spoilage metabolite (>12 mg TMA-N/100 g) was observed in frozen-thawed control which could be related with more than 1,5 log units in the growth of H_2S-producers. These bacteria increased 1 log unit from day 5 on, although trimethylamine values increased from 1 to 3 mg TMA-N in fresh control. This relation was not so evident in the MAP samples, because TMA-N production was very low. Spoilage bacteria growing in common octopus during the storage period were not identified, but we observed that they were CO_2-resistant, because at the end of the storage the level of this gas was 70% in packaged products.

CONCLUSIONS

The common number $>10^6$–10^7 CFU/g of fish and seafood spoilage (5) was not reached in octopus after 6 days in MAP. However, sensory quality decreased from day 4 on, although the shelf life increased 24-48 hours over the time of controls. This could be explained by the high proteolytic activity in *Octopus vulgaris* (3, 4). No differences were observed between the two packaged materials used.

REFERENCES

[1] Otero, J., Rocha, F., González, A.F., García, J., and Guerra, A. Modelling artisanal coastal fisheries of Galicia (NW Spain) based on data obtained from fishers: the case of *Octopus vulgaris*, 2005. Sci.Mar., 69, 577-585.
[2] Plataforma Tecnolóxica da Pesca (www.pescadegalicia.com). Galician Xunta, 2010.
[3] Hurtado, J.L., Borderías, J., Montero, P. Characterization of proteolytic activity in octopus *(Octopus vulgaris)* arm muscle, 1999. J. Food Biochem. 23, 469-483.
[4] Atrea, I., Papavergou, A., Amvrosiadis., I, Savvaidis., I.N. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 ºC, 2002. Food Micobiol. 26, 166-172.
[5] Gram, L., Dalgaard P. Fish spoilage bacteria: problems and solutions, 2002. Int J. Food Microbiol. 78, 79-97.
[6] Vaz-Pires, P. and Barbosa, A. Sensory, microbiological, physical and nutritional properties of iced whole common octopus (*Octopus vulgaris*), 2004. Lebensm. Wiss. Technol. 37, 105-114.

ACKNOWLEDGMENTS

Financed in the Galician Xunta 08MMA018402PR research project.

P87 EFECTIVIDAD DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* TF711 COMO CULTIVO ADJUNTO DE QUESOS PARA EL CONTROL DE *SHIGELLA SONNEI*

Victoria Zárate y Lorena González
Departamento de Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n. Universidad de La Laguna, 38206, La Laguna.
vzarate@ull.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El empleo de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas como cultivos adjuntos al cultivo iniciador en combinación con métodos tradicionales de conservación y el adecuado procesamiento higiénico constituyen a priori un sistema eficaz de control de microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la eficacia como cultivo adjunto de quesos de *Lactobacillus plantarum* TF711, productor de plantaricina TF711, en el control de *Shigella sonnei*. Esta cepa de lactobacilo fue aislada del queso artesanal de Tenerife y tiene potencial aplicación como bioconservante alimentario ya que la bacteriocina que produce es activa a nivel de laboratorio frente a las bacterias patógenas y alterantes *Bacillus cereus, Clostridium sporogenes, Staphylococcus aureus, Shigella sonnei y Klebsiella pneumoniae* (Hernández y col., 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

Fabricación de quesos. Se elaboraron dos quesos: el A (control) y el B adicionado de *Lactobacillus plantarum* TF711. Se inoculó la leche con un cultivo iniciador comercial liofilizado conteniendo *Streptococcus thermophilus* y con $5x10^5$ ufc/ml de *Shigella sonnei* CECT 4887. Además, la leche del Queso B se inoculó al 1% con un precultivo de *Lb. plantarum* TF711 en leche desnatada estéril. Los quesos se envasaron al vacío y se maduraron a 12ºC durante 45 d.

Análisis de los quesos. A los 1, 7, 15, 21, 30 y 45 días se tomó una porción de queso realizándose las siguientes determinaciones, por duplicado:

Análisis microbiológicos. Se hicieron recuentos de estreptococos lácticos (agar M-17, 30ºC, 24 h), lactobacilos (agar Rogosa, 37ºC, 24 h en anaerobiosis) y *Shigella sonnei* (agar BHI, 37ºC,19 h).

Análisis físico-químicos Se determinó el pH (Marcos y col., 1979) y el contenido en cloruro sódico utilizando el método de Mohr (Bradley y col., 1993).

Producción de bacteriocina. Se extrajo la bacteriocina del queso siguiendo básicamente el protocolo descrito por Rodríguez y col. (2005). Para el ensayo de la actividad antimicrobiana se introdujeron 50 µl del extracto de queso en pocillos en placas de MRS conteniendo la cepa indicadora (*Lb. plantarum* CECT 748) a concentración final de $5x10^5$ ufc/ml. Tras incubación (30ºC, 48h) se midió el diámetro del halo de inhibición en el césped formado.

Análisis estadístico. Se realizó análisis de varianza de una vía con los factores adición de cultivo adjunto y tiempo de maduración mediante el programa SPSS 17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la evolución de los parámetros microbiológicos y físico-químicos en los quesos A y B a los distintos tiempos de maduración. No se detectaron lactobacilos en el homogeneizado del queso A al día siguiente de la fabricación. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo se detectaron lactobacilos contaminantes en el Queso A cuyos recuentos fueron aumentando hasta alcanzar valores similares a los encontrados en el Queso B. Los recuentos de estreptococos lácticos fueron prácticamente idénticos a lo largo de la maduración en los dos quesos y disminuyeron significativamente ($P< 0,01$) con el tiempo de maduración hasta alcanzar una reducción de 0,4 unidades logarítmicas a los 45 días. Este resultado indica que el crecimiento del cultivo iniciador no se ve afectado por el lactobacilo adjunto. Los recuentos de *Shigella sonnei* fueron idénticos para los Quesos A y B al día siguiente de su fabricación. A medida que la maduración avanzó, en el Queso A los recuentos de *Shigella sonnei* subieron 0,5 unidades y luego bajaron hasta situarse en un valor similar al inicial, mientras que en el Queso B disminuyeron progresivamente hasta alcanzar a los 45 días un valor 1,5 unidades logarítmicas menor con respecto al Queso A. El contenido en cloruro sódico se mantuvo prácticamente constante con el tiempo con un valor similar en los dos quesos, mientras que pH disminuyó significativamente ($P<0,01$) con a medida que transcurrió la maduración. Finalmente, la actividad bacteriocina sólo se detectó en el Queso B a los 30 días indicando que se requiere una mínima concentración para su detección y que luego se inactiva, entre otros factores por las enzimas proteolíticas de las propias bacterias lácticas (Delves-Broughton, 1990).

Tabla 1. Evolución de los parámetros microbiológicos y físico-químicos durante la maduración de los quesos

Queso	Tiempo	Parámetros microbiológicos (log ufc/g)			Parámetros físico-químicos	
		Estreptococos lácticos	Lactobacilos	*Shigella sonnei*	NaCl (%)	pH
A	1	8,1	<1	7,5	2,0	6,7
	7	7,9	1,9	7,9	1,9	6,1
	15	8,0	2,7	7,5	2,0	5,8
	21	8,1	3,9	7,5	2,0	5,7
	30	7,9	4,9	7,7	2,0	5,6
	45	7,7	8,4	7,4	1,9	5,4
B	1	8,1	7,5	7,5	2,1	6,6
	7	8,0	8,3	7,3	1,8	5,8
	15	8,0	8,4	7,0	1,9	5,4
	21	8,1	8,5	6,8	2,0	5,3
	30	8,0	8,6	6,7	2,1	5,3
	45	7,7	8,8	5,9	2,0	5,2

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren la utilidad bioconservante de *Lb. plantarum* TF711, productor de plantaricina TF711, cuando se emplea como cultivo adjunto en la fabricación de quesos ya que es capaz de lograr un efecto protector frente a *Shigella sonnei*, sin afectar al crecimiento del cultivo iniciador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradley, R.L., y col., 1993. Standard Methods for the Examination of Dairy Products
Marcos, A. y col., 1979. J. Dairy Sci 62:392-397.
Rodríguez, E. y col. 2005. Int. Dairy Journal 15: 51-57.
Delves- Broughton, J. 1990. J. Soc. Dairy Technol. 43:73-76

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de Canarias (Proyecto Estructurante ULL APD-08/01)

P88 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE SECADO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE TOMILLO OBTENIDOS MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Carmina Ortuño[1], *Rony Rocha*[2], *Jose Bon*[1], *Juan A. Cárcel*[1], *Jose Benedito*[1]
[1]*ASPA Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia. C/ Camino Vera, s/n, 46021, Valencia.*
carorca1@upvnet.upv.es
[2] *Departamento de Ingeniería Agrícola, Universidad Federal de Vicosa, Vicosa-MG, Brasil.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La creciente demanda de alimentos frescos y naturales, el rechazo hacia conservantes químicos, así como la tendencia a evitar procesos que conduzcan a una pérdida de nutrientes y propiedades organolépticas de los alimentos, ha incrementado el interés por encontrar conservantes naturales que puedan ser incorporados a los alimentos y a los envases en los que se comercializan. Son conocidas las propiedades conservantes de plantas aromáticas como el orégano, tomillo, romero, etc., gracias a los componentes fenólicos y antioxidantes que contienen sus aceites esenciales (Zekovic et al., 2000). Para que la extracción de los aceites de estas plantas aromáticas ofrezca un rendimiento aceptable, es necesario el secado previo de las mismas. El secado es por tanto una de las etapas más importantes previa a los procesos de extracción, ya que en función de las condiciones de dicha operación, los componentes a extraer de las plantas se verán alterados en mayor o menor medida. La pérdida de compuestos fenólicos y antioxidantes en estas plantas depende principalmente de la temperatura de secado y de las características biológicas de las plantas.

El objetivo del trabajo fue analizar la influencia de la temperatura de secado de *Thymus Vulgaris* sobre la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos mediante fluidos supercríticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El tomillo (*Thymus vulgaris*) fue adquirido en un invernadero valenciano, siendo todas las plantas de un tamaño homogéneo (20 ± 2 cm). Las ramas leñosas fueron separadas de las más tiernas, empleando estas últimas para realizar la operación de secado. Previamente a las etapas de secado, se realizó la determinación de humedad del tomillo fresco, según el método AOAC 934.06 (AOAC, 1997).

Las experiencias de secado se llevaron a cabo por triplicado en un secadero convectivo empleándose 4 temperaturas: 30, 40, 50, 60 ºC con una velocidad de aire de 1 m/s, hasta que la muestra alcanzó una pérdida de peso del 72 %. Las muestras secas se envasaron a vacío y se almacenaron en refrigeración (2 ºC) hasta el proceso de extracción. El proceso de extracción fue llevado a cabo empleando una planta de extracción mediante fluidos supercríticos en las siguientes condiciones: 10 g de muestra, 20 ml de etanol como cosolvente, 350 bar, 37.5ºC y 2 horas de extracción.

La capacidad antimicrobiana de los extractos se analizó empleando una levadura vínica: *Saccharomyces cerevisiae Lalvin* T73 *(S. cerevisiae*). La misma se evaluó siguiendo la curva de crecimiento durante 24 h de cada cultivo a través de cambios en la densidad óptica a 600 nm. Para realizar la curva de crecimiento, se inoculó 1 ml de precultivo (10^5 ufc/ml) en medio fresco de YPD, además de añadir 300 µl del extracto obtenido previamente con las extracciones supercríticas. Se realizó una curva de crecimiento control en la que no se añadió ningún extracto.

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu, los valores se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE/l, g de ácido gálico/l de extracto), y se presentan como la media de los datos del análisis llevado a cabo por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo de secado del tomillo fue de 20, 17.5, 4.5 y 1.3 horas, para las temperaturas de secado de 30, 40, 50 y 60º C, respectivamente.

La Figura 1 muestra una concentración de compuestos fenólicos creciente con la temperatura de secado del tomillo, lo que indica que a pesar de que los compuestos fenólicos son los más volátiles y sensibles a condiciones extremas en los procesos de secado (Venskutonis, 1996), debido a la reducción en la duración del proceso conforme aumenta la temperatura, éstos se retienen mejor en el tomillo y no se deterioran. Así pues, temperaturas elevadas y tiempos cortos parecen ser las condiciones que minimizan el deterioro de los compuestos fenólicos en el tomillo, como ocurre en los tratamientos térmicos de alimentos para evitar el deterioro de vitaminas. Puede observarse que para 50 ºC y 60º C la concentración de compuestos fenólicos es similar, lo que indica que por encima de 50 ºC no se obtendría un aumento significativo de compuestos fenólicos en los extractos.

La Figura 2 muestra las curvas de crecimiento obtenidas para *S. cerevisiae.* Se observa un retraso del crecimiento de las células conforme aumenta la concentración de compuestos fenólicos. La curva control presenta una fase de latencia de 2.7 horas, mientras que con extracto fresco la fase de latencia se prolonga durante 7 horas. Esta fase de latencia aumenta hasta 8, 8.5, 11 y 12 horas, al añadir extracto de tomillo secado a 30, 40, 50 y 60º C, respectivamente. El porcentaje de reducción de crecimiento respecto al control, obtenido al final del ensayo con los diferentes extractos fue del 15, 33, 47, 59 y 88 % para los extractos de tomillo fresco y secado a 30, 40, 50 y 60º C, respectivamente, sin llegar a observar en ninguna de las curvas de crecimiento con extracto añadido que se alcance la fase estacionaria, como sí ocurre en la curva control.

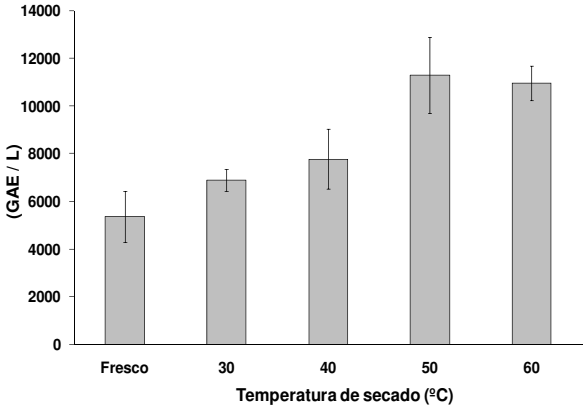


Figura 1. Concentración de compuestos fenólicos en los extractos de tomillo fresco y secado a diferentes temperaturas obtenidos mediante fluidos supercríticos (37.5ºC, 350bar).

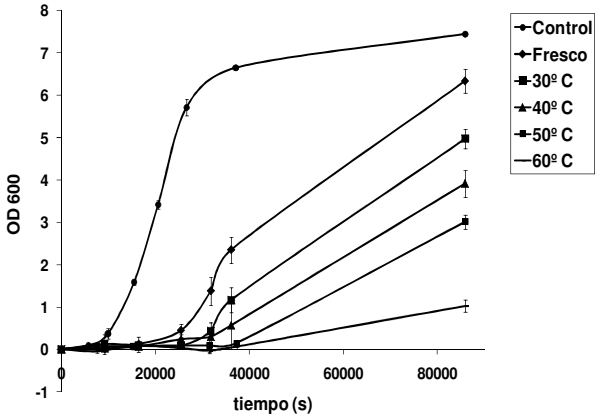


Figura 2. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* con diferentes tipos de extracto de tomillo fresco y secado a diferentes temperaturas.

CONCLUSIONES

El estudio de las condiciones de secado previo al proceso de extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas es indispensable para minimizar el deterioro de los compuestos fenólicos responsables de la capacidad antimicrobiana de estos aceites. Temperaturas elevadas y tiempos cortos permiten maximizar la capacidad antimicrobiana de los extractos. Los extractos de tomillo pueden emplearse como aditivos directos o formando parte de los envases, con la finalidad de retrasar el deterioro y aumentar el tiempo de vida útil de los alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, (1997). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, Virginia, EEUU.

Venskutonis, P. R. (1997). Effect of drying on the volatile constituents of thyme (Thymus vulgaris L.) and sage (Salvia oficinalis L). Food Chemisrry, 59 (2): 219-227.

Zekovic, Z., Lepojevic, Z., Vujic, Dj. (2000). Supercritical Extraction of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Chromatographia. 51 (3/4): 175-179.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CARNISENUSA (CSD2007-00016) incluido en el programa CONSOLIDER-INGENIO-2010.

P91 ESTUDIO DE LA VIDA ÚTIL DE MORCILLA DE BURGOS ELABORADA CON DIFERENTES TIPOS DE TRIPA SINTÉTICA

Beatriz Martínez[1], Begoña Rubio[1], Ana M. Diez[2], Jordi Rovira[2] e Isabel Jaime[2]

[1]Consejería de Agricultura y Ganadería de Castilla y León. Instituto Tecnológico Agrario. Estación Tecnológica de la Carne. C/ Filiberto Villalobos s/n. 37770 Guijuelo (Salamanca).

mardomma@itacyl.es.

[2]Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos. Plaza Misael Bañuelos s/n. 09001 Burgos.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La morcilla de Burgos es un embutido de sangre que se compone de cebolla, sangre, manteca, arroz y otros componentes minoritarios. Las tripas empleadas en su elaboración son de vaca o ternera principalmente. La aparición de encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en vacas de Brasil, país desde el que, actualmente, se importaba este tipo de tripas ha supuesto un problema para los productores que han visto reducido el abastecimiento de tripa de vaca y el encarecimiento de la misma. Para solucionar este problema, se hace necesario el uso de tripas sintéticas comestibles (de colágeno). En la actualidad, en el mercado no existen tripas de colágeno con características que se ajusten a las necesidades del proceso de elaboración de la morcilla de Burgos. Esto implica el desarrollo de una nueva tripa que además de permitir elaborar morcilla de Burgos con las mismas características que la elaborada con tripa natural, permita mantener la vida útil del producto durante al menos el mismo tiempo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la vida útil de morcillas de Burgos elaboradas con diferentes tipos de tripas, envasadas a vacío y almacenadas bajo diferentes condiciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se elaboraron morcillas de Burgos con tripa natural de vaca (lote control) y con 4 tipos de tripas sintéticas diferentes (lotes A, B, C y D) en una empresa local elaboradora de morcilla de Burgos. Tras el enfriado de las morcillas, éstas fueron envasadas a vacío y enviadas al laboratorio bajo condiciones de refrigeración. La mitad de las morcillas de cada lote fue almacenada en refrigeración y oscuridad y la otra mitad se conservó en un mural frigorífico con luz. Los tiempos de muestreo fueron 0, 7, 14 y 21 días de envasado. Cada día de muestreo se emplearon 10 morcillas, 2 por cada lote, para realizar los correspondientes análisis microbiológicos: flora aerobia mesófila (PCA- Scharlau, España-, 30 ºC /72 h), Enterobacterias (VRBGA- Scharlau, España-, 37ºC/24h), Pseudomonas (Pseudomonas Agar- Oxoid, España- suplementado con CFC- Oxoid, España-,

30ºC/48 h) y bacterias ácido lácticas (BAL) (MRS Agar- Scharlau, España-, 30 ºC /72 h). El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante un ANOVA con objeto de determinar la existencia o no de diferencias a lo largo del tiempo de envasado y entre los distintos lotes para cada condición de conservación. Para la separación de las medias se utilizó el test de Tukey HSD. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos realizados sobre las morcillas elaboradas con las diferentes tripas y almacenadas en refrigeración y oscuridad figuran en la Tabla 1 y los de las morcillas almacenadas simulando las condiciones habituales de venta en los supermercados en la Tabla 2. Hay que destacar que, las morcillas almacenadas en el mural de refrigeración sólo se analizaron hasta el día 14 ya que, en este día, todos los tipos de morcilla presentaban recuentos de flora aerobia mesófila superiores a 7 lg ufc/g, por lo que se consideraron no aptas para su consumo (ICMSF, 1983).

En general, los resultados obtenidos para los recuentos de los distintos microorganismos analizados muestran un incremento de éstos a lo largo del tiempo de almacenamiento, en todos los casos estudiados (para las morcillas elaboradas con las diferentes tripas y en las diferentes condiciones de almacenamiento). Entre los distintos tipos de morcilla almacenadas en oscuridad (Tabla 1), las morcillas elaboradas con tripa de vacuno presentaron recuentos similares ($p>0,05$) a las elaboradas con tripas de colágeno a los 21 días de almacenamiento. Las morcillas almacenadas en el mural de refrigeración (Tabla 2), si presentaron diferencias al final del periodo de almacenamiento (14 días). Sin embargo, las diferencias encontradas entre los lotes de morcilla para los diferentes microorganismos evaluados no permitieron establecer una tendencia clara. En todos los casos, las BAL fueron flora dominante tal y como han descrito algunos autores (Santos y col. 2005). Además, todos los lotes de morcillas almacenadas en oscuridad presentaron recuentos superiores a 7 lg ufc/g a los 21 días de almacenamiento y los almacenados en el mural de refrigeración a los 14 días.

Tabla 1. Resultados microbiológicos (lg ufc/g) obtenidos en las morcillas a lo largo del tiempo de almacenamiento en refrigeración y oscuridad.

		Tipos de tripas				
	Días	Control	A	B	C	D
Flora aerobia mesófila	0	$^{ab}4,42_{A}$	$^{a}4,28_{A}$	$^{a}4,27_{A}$	$^{a}4,50_{A}$	$^{a}4,39_{A}$
	7	$^{b}4,62_{A}$	$^{b}5,41_{B}$	$^{a}4,63_{A}$	$^{a}4,49_{A}$	$^{a}4,38_{A}$
	14	$^{a}4,15_{A}$	$^{c}6,20_{BC}$	$^{b}6,72_{D}$	$^{b}5,95_{B}$	$^{b}6,55_{CD}$
	21	$^{c}7,42_{AB}$	$^{d}7,23_{A}$	$^{c}7,58_{AB}$	$^{c}7,38_{AB}$	$^{c}7,75_{B}$
Bacterias ácido lácticas	0	$^{a}2,39_{A}$	$^{a}2,15_{A}$	<2	<2	$^{a}2,35_{A}$
	7	$^{a}3,05_{A}$	$^{b}3,88_{C}$	$^{a}3,77_{C}$	$^{a}3,36_{B}$	$^{b}3,63_{BC}$
	14	$^{b}5,76_{AB}$	$^{c}5,97_{BC}$	$^{b}6,31_{C}$	$^{b}5,42_{A}$	$^{c}6,44_{C}$
	21	$^{c}7,38_{A}$	$^{d}7,11_{A}$	$^{c}7,57_{A}$	$^{c}7,35_{A}$	$^{d}7,57_{A}$
Pseudomonas	0	<2	<2	<2	<2	<2
	7	$^{a}2,69_{A}$	$^{b}5,28_{C}$	$^{a}3,84_{B}$	$^{a}3,77_{B}$	$^{a}4,24_{B}$
	14	$^{a}3,28_{A}$	$^{c}5,81_{B}$	$^{b}5,99_{B}$	$^{b}5,73_{B}$	$^{b}5,87_{B}$
	21	$^{b}5,25_{AB}$	$^{a}4,78_{A}$	$^{b}5,61_{B}$	$^{b}5,47_{B}$	$^{c}5,12_{AB}$
Enterobacterias	0	<1	<1	<1	<1	<1
	7	<1	<1	<1	<1	$^{ab}2,15$
	14	$^{a}1,15_{A}$	<1	$^{a}3,48_{C}$	$^{a}3,60_{C}$	$^{bc}2,77_{B}$
	21	$^{b}3,34_{A}$	$3,45_{A}$	$^{a}3,71_{A}$	$^{a}3,86_{A}$	$^{c}3,62_{A}$

a,b,c,d. Medias con diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento (Test de Tukey: p<0,05).
A,B,C Medias con diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre lotes (Test de Tukey: p<0,05).

Tabla 2. Resultados microbiológicos (lg ufc/g) obtenidos en las morcillas a lo largo del tiempo de almacenamiento en condiciones de exposición.

		Tipos de tripas				
	Días	Control	A	B	C	D
Flora aerobia mesófila	0	$^{a}4,42_{A}$	$^{a}4,28_{A}$	$^{a}4,27_{A}$	$^{a}4,50_{A}$	$^{a}4,39_{A}$
	7	$^{b}6,15_{A}$	$^{b}6,30_{A}$	$^{b}6,09_{A}$	$^{b}6,29_{A}$	$^{b}6,06_{A}$
	14	$^{c}8,15_{B}$	$^{c}8,44_{C}$	$^{c}8,45_{C}$	$^{c}7,88_{A}$	$^{c}8,50_{C}$
Bacterias ácido lácticas	0	$^{a}2,39$	$^{a}2,15$	<2	<2	$^{a}2,35$
	7	$^{b}6,07_{A}$	$^{b}7,24_{C}$	$^{a}6,23_{AB}$	$^{b}6,60_{AB}$	$^{b}6,71_{BC}$
	14	$^{c}8,03_{A}$	$^{c}8,40_{B}$	$^{b}8,44_{B}$	$^{c}7,91_{A}$	$^{c}8,45_{B}$
Pseudomonas	0	<2	<2	<2	<2	<2
	7	$^{a}3,39_{A}$	<2	<2	$^{a}3,94_{B}$	$^{b}4,46_{B}$
	14	$^{b}4,34_{BC}$	$3,94_{B}$	$4,57_{C}$	$^{b}4,81_{C}$	$^{a}3,27_{A}$
Enterobacterias	0	<1	<1	<1	<1	<1
	7	$^{a}2,19_{A}$	$^{a}2,81_{B}$	$^{a}2,29_{AB}$	$^{a}2,55_{AB}$	$^{a}4,60_{C}$
	14	$^{b}3,34_{A}$	$^{b}4,52_{BC}$	$^{b}5,05_{C}$	$^{b}4,91_{C}$	$^{a}3,96_{AB}$

a,b,c,.. Medias con diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento (Test de Tukey: p<0,05).
A,B,C Medias con diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre lotes (Test de Tukey: p<0,05).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la elaboración de morcilla de Burgos con tripa sintética no supone un acortamiento de la vida útil comparada con la elaborada con tripa natural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1998. En Acribia, Microorganismos de los Alimentos 5. Características de los Patógenos Microbianos. Zaragoza, Spain.

Santos, E.M.; Diez, A.M.; González-Fernández, C.; Jaime, I. & Rovira, J. (2005). Microbiological and sensory changes in "Morcilla de Murgos" preserved in air, vacuum and modified atmosphere packaging. Meat Science, 71, 249-255.

P95 EFECTO DEL TIPO DE GRASA EN LA ALIMENTACIÓN DE LAS OVEJAS SOBRE LA VIDA ÚTIL DE CARNE DE LECHAZO ENVASADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA

Begoña Rubio[1]; Ceferina Vieira[1]; Beatriz Gallardo[2]; Teresa Manso.[2]

[1]Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León. ITACyL Estación Tecnológica de la Carne,c/Filiberto Villalobos s/n, 37770 Guijuelo, Salamanca.

rubherbe@itacyl.es

[2]Área de Producción Animal. E.T.S. Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid.Avd. Madrid, s/n. 34004 Palencia

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las tendencias actuales muestran que los consumidores han incrementado su interés por alimentos que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud. En este sentido, en la literatura científica se pueden encontrar un gran número de publicaciones relacionadas con la producción de alimentos, de origen animal, con mejores características nutricionales y funcionales. Concretamente, en el caso de los corderos lechales (alimentados exclusivamente mediante lactancia natural) la única forma de mejorar su composición corporal es modificando la alimentación de las ovejas. Así, algunos autores (Manso y col. 2009; Sanz Sampelayo y col. 2006) han incrementando los niveles de CLA, ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos omega-3 en la grasa de la carne de lechazos y cabritos incorporando distintas fuentes de grasa en la alimentación de sus madres. Sin embargo, la mejora en la calidad nutritiva de la carne, puede llevar asociada una disminución en su vida útil, hecho preocupante para la comercialización de esta carne si se tiene en cuenta que, como han indicado algunos autores (Camo y col., 2008), la vida útil de la carne de cordero es de 10 días en condiciones de refrigeración.

Actualmente, se está utilizando el envasado en atmósferas modificadas (MAP) para poder prolongar la vida útil de la carne. Kennedy y col. (2004) apuntaron que las condiciones más eficaces para el envasado de carne de cordero en MAP fueron una composición de gases del 80:20:0 de O_2: CO_2: N_2 y un espacio de cabeza de 2:1. Bajo estas condiciones, estos autores, consiguieron mantener el color y disminuir la carga microbiana de las muestras de carne de cordero envasado durante 12 días en condiciones de exposición y refrigeración a 4ºC. El objetivo de este estudio fue evaluar la vida útil de carne de cordero lechal con distinto perfil de ácidos grasos, envasada en MAP y almacenada en un mural refrigerado simulando las condiciones habituales de venta en los supermercados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 36 ovejas adultas de raza Churra (peso vivo medio 60,9± 1,36 kg) y sus respectivos corderos. Las ovejas se alimentaron con 2,1 kg de materia seca de una ración total mezclada que incluía una fuente de grasa al 3% (28,3% FND, 17,6% FAD, 16,9% PB, 5,30% GB). Dos días después del parto, las ovejas y sus corderos se asignaron de forma equilibrada a tres tratamientos experimentales (12 ovejas con sus corderos, por tratamiento) de acuerdo con la fuente de grasa incorporada: 1- jabón cálcico de aceite de palma (MAGNAPAC®: C16:0: 46,9%; C18:0: 40,7%; C18:1, 9,7%), 2- jabón cálcico de aceite de oliva (OLIFAT®: C16:0, 8,2%; C18:1: 53,7%; C18:2: 15,6%) y 3- jabón cálcico de aceite de palma y pescado (STRATA-G®: EPA: 19,6%; C18:1: 17,2%; DHA: 9,7%). Los corderos permanecieron con sus madres desde el nacimiento hasta el momento del sacrificio que se realizó cuando éstos alcanzaron los 11 kg de peso vivo.

Tras el sacrificio, las canales fueron refrigeradas a 4ºC y tras 24 h de oreo se separó, mediante disección, el músculo *Longissimus dorsi* de los corderos de los 3 tratamientos. Para cada tratamiento, se utilizó el músculo izquierdo de cada cordero, el cual se dividió en porciones que, de forma aleatoria, se dispusieron en bandejas, a razón de tres trozos por bandeja. Las bandejas obtenidas se envasaron con gases, mediante una termoselladora TECNOVAC mod: Linvac 400. La mezcla de gases utilizada fue 70:20:10 de O_2: CO_2: N_2 y el porcentaje de gases fue controlado a lo largo de todo el almacenamiento con un analizador de gases OXYBABY M O_2/CO_2. Todos los envases obtenidos fueron almacenados a 2ºC hasta el momento de la toma de muestra. Los tiempos de muestreo seleccionados fueron 0, 5, 8 y 13 días de envasado. Cada día de muestreo se emplearon 6 bandejas, 2 por cada tratamiento, para realizar los correspondientes análisis microbiológicos.

Análisis microbiológicos. Se tomaron 10 ± 0,1 g de muestra en ambiente estéril y se homogeneizaron con 90 ml de agua de peptona durante 2 minutos en un homogenizador de paletas o stomacher obteniéndose así, la dilución madre (dilución 1:10) que se utilizó para la preparación de las posteriores diluciones decimales, de acuerdo con la forma de proceder habitual en microbiología. Los recuentos realizados fueron: flora psicrotrofa (PCA- Scharlau, España-, 7 ºC /10 días), Enterobacterias (VRBGA- Scharlau, España-, 37 ºC /24h), Pseudomonas (Pseudomonas Agar- Oxoid, España- suplementado con CFC- Oxoid, España-, 30 ºC /48 h) y bacterias ácido lácticas (BAL) (MRS Agar- Scharlau, España-, 30 ºC /48 h).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 1, los recuentos obtenidos de flora psicrotrofa, enterobacterias, pseudomonas y BAL para las muestras de carne de lechazo de los tres tratamientos, presentaron una tendencia ascendente a lo largo del periodo de envasado estudiado. Entre tratamientos, las muestras del tratamiento 3 (procedentes de corderos cuyas madres fueron alimentadas con STRATA-G®) presentaron recuentos más altos para los microorganismos estudiados a determinados tiempos de muestreo. Además, a los 8 días, los recuentos de flora psicrotrofa y BAL para las muestras de este tratamiento alcanzaron valores superiores a 7 lg ufc/g, mientras que las muestras de los tratamientos 1 y 2 no superaron este valor hasta los 13 días de envasado. Rubio y col. (2007) estudiaron la vida útil de salchichones elaborados con carne procedente de cerdos alimentados con diferentes dietas y observaron que las diferencias en el perfil lipídico de los mismos influía en los recuentos obtenidos para determinados microorganismos. Los salchichones con un menor contenido en ácidos grasos poliinsaturados fueron los que presentaron menores recuentos de flora psicrotrofa y de BAL. Estos resultados coincidirían con los obtenidos en este estudio.

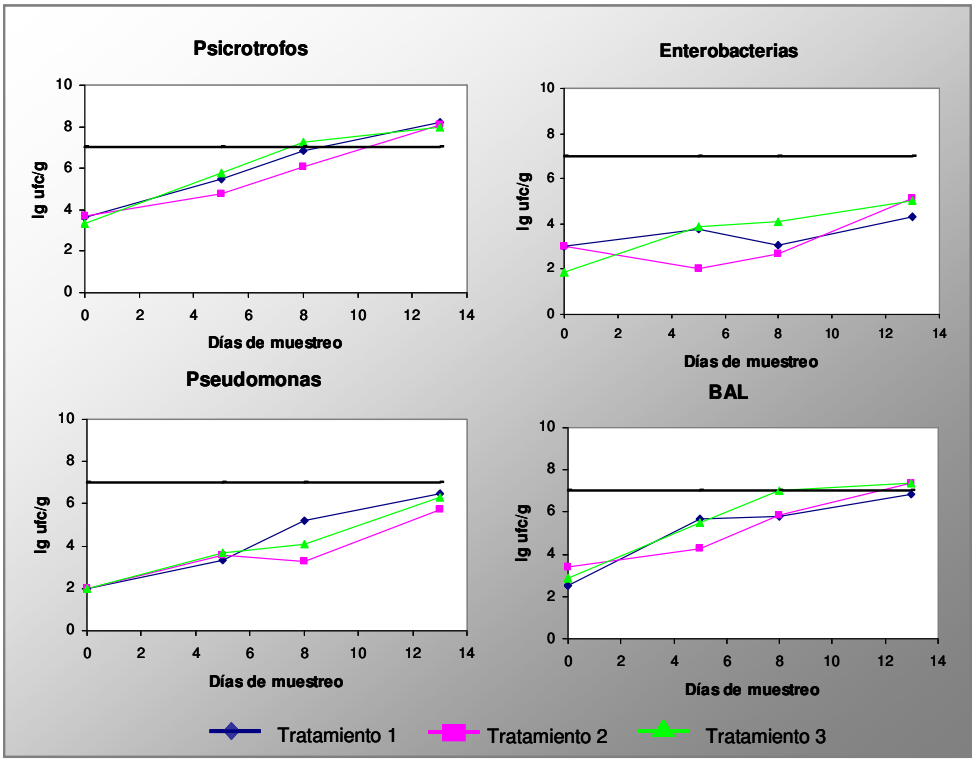


Figura 1. *Recuentos microbiológicos (lg ufc/g) obtenidos durante el almacenado de la carne de lechazo con perfil lipídico modificado (Tratamiento 1- jabón cálcico de aceite de palma, Tratamiento 2- jabón cálcico de aceite de oliva y Tratamiento 3- jabón cálcico de aceite de palma y pescado) envasada en atmósferas modificadas.*

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que, el perfil lipídico de la carne de cordero tuvo influencia en la vida útil del producto, siendo las muestras del tratamiento 3 (procedentes de cordero cuyas madres fueron alimentadas con jabón cálcico de aceite de palma y pescado) las que presentaron recuentos superiores a 7 lg ufc/g a los 8 días de envasado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Campo, J., Beltrán, J.A. & Roncalés, P. (2008). Extensión of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. Meat Science, 80, 1086-1091.

Kennedy, C., Buckley, D.J. & Kerry, J.P. (2004). Display life of sheep meats retail packaged under atmospheres of various volumes and compositions. Meat Science, 68: 649-658.

Manso, T., Bodas, R., Vieira, C., Castro, T. & Mantecón, A.R. (2009). Fatty acid composition of lambs sucking ewes fed with different vegetable oils. n: 13th Seminar of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Sheep and Goat Nutrition.

Rubio B.; Martínez, B.; García-Cachán, M.D.; Rovira, J. & Jaime, I. (2007). Study of the shelf life of a dry fermented sausage "salchichón" made from raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and stored under modified atmospheres. Meat Science, 76: 128-137.

Sanz Sampelayo, M. R., Fernández, J. R., Ramos, E., Hermoso, R., Gil Extremera, F. & Boza, J. (2006). Effect of providing a polyunsaturated fatty acid-rich protected fat to lactating goats on growth and body composition of suckling goat kids. Anim. Sci. 82, 337–344.

P101 EFECTO DEL ENVASADO EN LAS PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS DE PRODUCTOS CRUDOS CURADOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO.

María Jesús Martín[1], Ana Andrés[2], Jonathan Delgado[1], Nieves González[1] y Carmela Sanabria [1]*

[1]Instituto Tecnológico de Extremadura, Ctra.San Vicente, s/n, 06071, Badajoz

mariajesus.martín@juntaextremadura.

[2] Departamento de Zootecnica, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Estremadura. Ctra. San Vicente, s/n

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los embutidos fermentados no sustentan generalmente el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos, aunque hay dos aspectos relacionados con su procesado y conservación que pueden ser potencialmente problemáticos: el crecimiento de microorganismos productores de micotoxinas en la carne antes de la fermentación, especialmente *Staphylococcus aureus*, y la supervivencia de bacterias patógenas como *Salmonella* y *Listeria*. El envasado en atmósferas modificadas (EAM o EAP) consiste en la sustitución del aire que rodea el alimento por un gas o mezcla de gases óptima que permita la prolongación de su vida útil. Su aplicación se ha visto incrementada significativamente en los últimos años con el fin de ajustar el sector cárnico a las nuevas demandas y

tendencias de consumo. El envasado a vacío es el EAM más frecuentemente usado en el mercado (Rubio y col., 2007; Gök y col., 2008), sin embargo, también el dióxido de carbono está siendo muy utilizado en productos cárnicos curados, ya que es un eficaz inhibidor de microorganismos (Borch y col., 1996). Así, las mezclas de gases más utilizadas en la prolongación de la vida útil de los productos cárnicos fermentados curados incluyen combinaciones de CO_2 junto con N_2 como gas de relleno, que contribuye en el desplazamiento del aire, y por tanto, del oxígeno en el envase. Por todo ello, el objetivo de este trabajo es estudiar la evolución de los parámetros microbiológicos de muestras de chorizo y salchichón tipo ¨sarta¨ envasadas a vacío y en tres mezclas diferentes de gases durante un almacenamiento de 12 meses en refrigeración.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 80 (40 y 40) unidades de chorizo ¨sarta¨ y salchichón ¨sarta¨, elaborados por la empresa Montesano S.A según formulación estándar. El periodo de maduración se dio por terminado cuando la merma de ambos productos alcanzó un 35-37%.

Cada unidad de producto de los lotes de vacío se envasó en una envasadora de campana marca Tecnotrip, mod. EV-13-CB, Nº 932334 y en una envasadora de Flow-Pack Marca ULMA, Modelo PV 350 LSHIX EMB y Nº 1219098 para el resto de lotes y en distintas condiciones: i)al vacío (Lote 1) ii) 70% N_2+ 30% CO_2 (Lote 2) iii) 100 N_2 (Lote 3) iv) 70% Argón + 30% CO_2 (lote 4). El material plástico de envasado a vacío consistió en PA/PE 30/120 de 150 micras de espesor, con rango de permeabilidad al O_2 de 25-30 $cm^3/m^2/bar/24h$ a 23ºC y rango de transmisión de vapor de agua de 1,7 $g/m^2/24$ h a 23ºC y 85% de H.R. Las muestras se almacenaron en refrigeración durante 12 meses, tomándose muestras inicialmente, después de 6 meses, 9 meses y al final del periodo de almacenamiento.

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo tomando en condiciones de esterilidad 10 gramos de cada muestra que fueron homogenizados con 90 ml de agua de peptona. Se realizaron diluciones seriadas con agua de peptona estéril y se llevó a cabo el recuento total de aerobios mesófilos (según ISO 4833, julio 1991), enterobacterias (según Norma NF V 08-054, octubre 1993), E. coli (Cromocult, incubado a 44ºC/24-48h), Clostridium sulfito reductores (SPS, incuabado a 37ºC/24h) , Clostridium perfringens (según Norma EN 13401, abril 1999), Staphylococcus aureus (Baid Parker, a 37ºC durante 24-48h) y Bacterias Lácticas (MRS, anaerobiosis parcial a 37ºC/72h), así como el recuento e investigación de Salmonella (según ISO 6579, de 1993) y Listeria (según ISO 11290-1, de 1997). El límite de detección para estas técnicas fue 10 ufc/g.

Los resultados obtenidos fueron anotados en unidades formadoras de colonia por gramo de producto (UFC/g) y transformados en unidades logarítmicas (log), analizándose posteriormente mediante el paquete estadístico SPSS (SPSS 13.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 presenta la evolución del recuento de microorganismos aerobios mesófilos y bacterias lácticas en chorizo y salchichón sarta a lo largo del tiempo de almacenamiento para cada uno de los lotes en estudio. El recuento del resto de los microorganismos investigados (indicadores higiénico-sanitarios) permaneció siempre por debajo del límite de detección (datos no mostrados).

En chorizo sarta los valores de microorganismos aerobios mesófilos disminuyeron significativamente para los lotes 1, 2 y 3 de envasado ($P<0.001$, 0.05 y 0.01 respectivamente) y de forma no estadísticamente significativa para el lote 4 ($P>0.05$), durante el periodo de almacenamiento, al igual que observaron Görk y col., (2008) en estudios sobre ¨pastirma¨. En el caso de los lotes 2, 3 y 4 la reducción del recuento de aeróbios mesófilos puede atribuirse al efecto inhibidor del CO_2, especialmente frente a microorganismos Gram -, que suelen ser los responsables de la alteración de la carne y productos cárnicos. En cuanto al salchichón sarta, también se produce una disminución estadísticamente significativa ($p<0.05$) en el lote 2 y no significativa en el resto de lotes ($p<0.05$). Por el contrario, Rubio y col (2007), en estudios sobre porciones de Cecina de León envasada a vacío y en mezclas de gases encuentran valores constantes en sus recuentos de aerobios mesófilos después de 210 días de almacenamiento en refrigeración.

En cuanto a las bacterias lácticas, éstas constituyen la flora dominante de embutidos debido a su buena adaptación al ambiente de la carne y su rápido crecimiento durante la fermentación, así como a ambientes enriquecidos con CO_2 (García-Esteban y col., 2004). En el chorizo sarta, en todos los lotes se puede observar un aumento de bacterias lácticas a los 6 meses con respecto a los valores iniciales; de forma similar, Rubio y col.(2007) obtuvieron un incremento inicial de las bacterias lácticas en salchichón envasado en atmósferas modificadas almacenado en refrigeración. No obstante, a los 9 y a los 12 meses, los valores vuelven a bajar. En el salchichón, se puede observar que los gases de envasado del lote 4 no tienen un efecto significativo en el recuento de bacterias lácticas a lo largo del tiempo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que en lo que respecta al aspecto microbiológico, la vida útil del chorizo y el salchichón tipo ¨sarta¨ se mantiene al menos durante 12 meses. Respecto al tipo de envasado, este factor no ejerció un efecto significativo en el caso del salchichón, ya que las diferencias en el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a lo largo del tiempo de almacenamiento no son significativas, y en el caso del chorizo, el envasado a vacío fue el más conveniente.

Tabla 1. Evolución del recuento de microorganismos aerobios mesófilos y bacterias lácticas (media ± error estándar de la media) en muestras de chorizo ¨sarta¨ envasado en distintas mezclas de gases y almacenadas en refrigeración durante 12 meses.

ATMOSFERA	TIEMPO	MESOFILOS		BACT. LACTICAS		MESOFILOS		BACT. LACTICAS	
		CHORIZO SARTA				SALCHICHÓN SARTA			
Lote 1	0 días	7,95a	± 0,17	7,55a	± 0,22	7,9	± 0,18	7,57a	± 0,34
	6 meses	7,59a	± 0,3	7,63a	± 0,16	6,9	± 0,28	6,45b	± 0,46
	9 meses	7,48a	± 0,16	7,36a[3]	± 0,21	7,3	± 0,62	6,30b	± 0,69
	12 meses	6,89b	± 0,39	6,32b	± 0,55	6,7	± 1,19	6,11b	± 0,56
	P tiempo	***		***		ns		**	
Lote 2	0 días	7,95	± 0,17	7,55b	± 0,22	7,9	± 0,18	7,57a	± 0,34
	6 meses	8,01	± 0,6	7,63b	± 0,16	6,9	± 0,62	6,55b	± 0,41
	9 meses	7,08	± 0,7	6,48a[1]	± 0,31	8	± 0,14	6,64b	± 0,54
	12 meses	7	± 0,71	6,01a	± 0,79	7,1	± 1,48	6,27b	± 0,67
	P tiempo	*		***		*		**	
Lote 3	0 días	7,95a	± 0,17	7,55a	± 0,22	7,9	± 0,18	7,57	± 0,34
	6 meses	7,59a	± 0,3	7,62a	± 0,1	6,9	± 1,45	5,25	± 2,53
	9 meses	6,90ab	± 0,43	6,81b[1,2]	± 0,4	7,6	± 0,27	6,99	± 0,54
	12 meses	7,54b	± 0,52	6,67a	± 0,64	7,4	± 0,66	6,75	± 0,42
	P tiempo	**		**		ns		*	
Lote 4	0 días	7,95	± 0,17	7,55bc	± 0,22	7,9	± 0,18	7,57	± 0,34
	6 meses	7,91	± 0,22	7,67a	± 0,25	7,5	± 0,38	7,06	± 0,32
	9 meses	7,49	± 0,47	7,03b[2,3]	± 0,16	7,4	± 0,75	6,82	± 0,93
	12 meses	6,97	± 1,11	6,15c	± 0,51	7,1	± 0,58	6,75	± 1,01
	P tiempo	ns		***		ns		ns	

♠ Lote 1 = (al vacío); Lote 2= (70% N_2+ 30% CO_2) Lote 3=100 N_2; lote 4= 70% Argón + 30% CO2. Se representa la media ± desviación estándar del Log UFC/g.

Niveles de significación: ns=>0.05:*=p<0.05: **= p<0.01: ***= p<0.001.

a,b,c: Diferentes letras en el mismo lote indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento, test de Tukey.

1,2,3:Diferentes superíndices en el mismo tiempo de almacenamientos indican diferencias significativas entre lotes, p<0.01, test de Tukey

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

García-Esteban et al. (2004). Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. Meat Science, 67, 57-63.

Rubio et al. (2007). Effect of modified atmosphere packaging on the microbiological and sensory quality on a dry cured beef product: "Cecina de león". Meat Science, 75, 515-52.2

Rubio et al. (2007). Study of the shelf life of a dry fermented sausage "salchichon" made from raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and stored under modified atmospheres. Meat Science, 76, 128-137.

Gök et al. (2008). Effects of packaging method and storage time on the chemical, microbiological, and sensory properties of Turkish pastirma - A dry cured beef product. Meat Science, 80, 335-344.

P109 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE DISTINTAS PRESENTACIONES DEL COAGULANTE VEGETAL PROCEDENTE DE *CYNARA CARDUNCULUS*.

Fernández-Salguero, J., Galán, E., Gómez, P. y Pino, A.

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Darwin. 14071- Córdoba (España). Telef. Y Fax: 957212010.

ao1fecaj@uco.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La utilización de extractos acuosos de las flores desecadas del cardo *Cynara cardunculus* L. en la fabricación de numerosos quesos de leche de oveja tanto españoles como portugueses es una práctica habitual que viene realizándose desde la antigüedad. En algunos de estos quesos con Denominación de Origen Protegida (La Serena, Torta del Casar, Flor de Guía, Serra da Estrela, Serpa, Azeitào, Castelo Branco, Nisa y Évora) es obligatoria la utilización de dicho coagulante vegetal (Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999). Muchas de las queserías que elaboran alguno de los quesos anteriormente citados utilizan flores desecadas recogidas directamente del campo, comercializándose sin registro sanitario. Este coagulante vegetal también se ha utilizado como forma de acelerar la maduración del queso Manchego (Prados *et al.*, 2007). También se está ensayando su utilización en quesos de leche de cabra (Pino *et al.*, 2009). En este trabajo se aporta información sobre la microbiota de diferentes presentaciones del coagulante vegetal procedente del cardo *C. cardunculus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de *Cynara cardunculus* analizadas fueron las siguientes: seis muestras de flores desecadas, cuatro de ellas se recogieron directamente en el campo en distintos lugares (C1, C2, C3 y C4) y dos muestras comerciales se adquirieron envasadas en bolsas de plástico con su correspondiente registro sanitario (R1 y R2). También se analizaron dos muestras obtenidas por liofilización (L1 y L2) a partir de flores de cardo silvestre según el procedimiento patentado por Fernández-Salguero *et al.* (2003). En las muestras se determinó la humedad y los grupos microbianos siguientes: bacterias aerobias mesófilas (PCA), enterobacterias (VRBG), coliformes (VRBL),

Escherichia coli (TBX), micrococos (MSA), Lactobacilos (MRS) y mohos y levaduras (DRBC), utilizándose el método de siembra Spiralplate según la norma UNE-EN ISO 7218:2008 y lectura posterior con lector automático Flash&Go. También se determinó *Staphylococcus* coagulasa positivos según la norma ISO 6888-2:1999 (Baird Parker RPF), así como *Clostridium* según la norma ISO 7937:2004 (SPS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias significativas en la humedad de los coagulantes estudiados, obteniéndose valores que oscilaron entre 9,75 y 14 %. Como se muestra en la Figura 1, no se encontraron recuentos ni de *Clostridium* ni de *E. coli* en ninguna de las muestras estudiadas. En cuanto al resto de grupos microbianos se hallaron diferencias significativas en los recuentos de los grupos estudiados, siendo los valores más bajos los correspondientes a las muestras liofilizadas seguidas de las muestras comerciales, reduciéndose dichos recuentos más de un 50 % y en torno a un 20-30 % respectivamente, respecto de las muestras de campo. Los recuentos obtenidos de micrococos, enterobacterias y aerobios mesófilas en las muestras de campo fueron ligeramente más altos a los encontrados en un estudio preliminar (Fernández-Salguero *et al.* 1999).

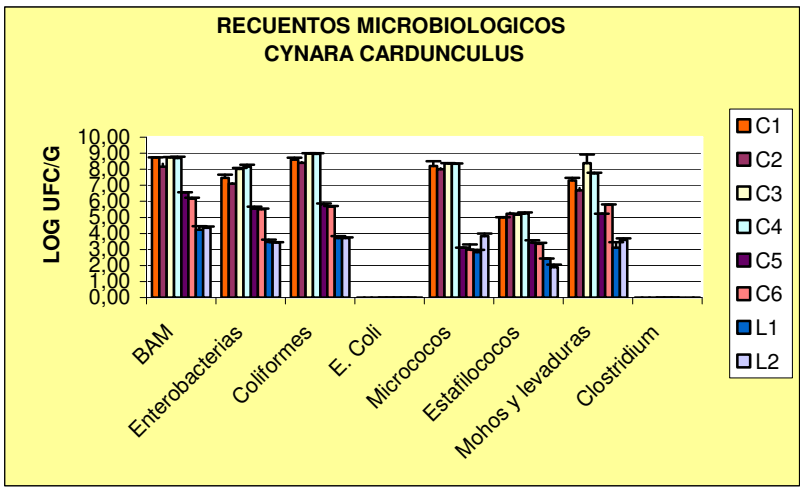


Figura 1. Grupos microbianos de diversas presentaciones del cardo *C. cardunculus.*

CONCLUSIONES

Las presentaciones del coagulante vegetal (*C. cardunculus*) obtenidas por liofilización y las comercializadas con registro sanitario presentaron recuentos, de diversos grupos microbianos, significativamente más bajos que las muestras de cardo recogidas directamente del campo, mejorándose con ello la calidad higiénica del proceso de fabricación del queso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fernández-Salguero, J. and E. Sanjuán (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk. Food Chemistry, 64(, 177-183.

Fernández-Salguero, J., E. Sánchez, R. Gómez, M. Vioque, C. Mata and L. Tejada (1999). A preliminary study of microbiological quality of cardoons Cynara L. used in the manufacture of traditional cheeses. Milchwissenchaft, 54, 688-690.

Fernández-Salguero, J., Gómez, R., Tejada, L. y Vioque, M. (2003). Un coagulante vegetal liofilizado, procedimiento para su preparación y sus aplicaciones en la fabricación de quesos. Patente de Invención P200001593. Oficina Española de Patentes y Marcas.

ISO 6888-2 (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species).

ISO 7937 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens. Colony-count technique.

Pino, A., Prados, F., Galán, E., Mcsweeney, P., and Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats´ milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. Food Research International, 42, 324-330.

Prados, F., Pino, A. and Fernández-Salguero, J. (2007). Effect of powdered vegetable coagulant from cardoon Cynara cardunculus in the accelerated ripening of Manchego cheese. International Journal of Food Science and Technology, 42, 556-561.

UNE-EN ISO 7218 (2008). Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico. (ISO 7218:2007).

P138 ESTUDIO DE VIDA ÚTIL DE BEBIDAS ELABORADAS A BASE DE NUEZ Y FRUTA

Patricia Calvo, Jonathan Delgado, Juan Ramón Sánchez, Jesús García, Matilde Mas

Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX). Ctra. San Vicente s/n, Finca Santa Engracia 06071 Badajoz. patricia.calvo@juntaextremadura.net

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Uno de los objetivos de la industria alimentaria es la búsqueda de nuevos alimentos que aporten los nutrientes necesarios y que además proporcionen un efecto beneficioso sobre la salud. Cada vez es más evidente que una buena salud se logra con una alimentación adecuada. Por ello, los hábitos de alimentación actuales están cambiando, y en este sentido existe una espectacular demanda de productos listos para consumir, de tamaños

medios o para una sola ración, sanos y de garantía. Hay que ser conscientes que el consumidor joven demanda la alternativa de fácil uso como son las bebidas, con una amplia gama de composición.
Se ha estudiado una gama de nuevas bebidas funcionales, a base de frutas y nuez, con alto valor nutricional. Es especialmente importante resaltar el contenido en fibra, compuestos fenólicos y actividad antioxidante tanto de la fruta como de las nueces, y en éstas últimas, además, el contenido en ácidos grasos omega 3 y 6, y en melatonina. Se buscan productos de calidad, que mantengan con respecto a la fruta fresca las propiedades de color y aroma, y que sean microbiológicamente estables (Bayindirllli et al., 2006).
El tratamiento por altas presiones hidrostáticas (HHP) tiene actualmente mucho interés como método de destrucción de microorganismos patógenos y alterantes de los alimento (Goodridge et al., 2006). En contraste con el tratamiento térmico convencional, el tratamiento HHP no causa alteraciones del sabor, del color, o de los componentes del alimento (o a lo sumo ligeras), pero los microorganismos y las enzimas alterantes se inactivan a temperaturas suaves, ambiente o bajas si la presión aplicada es lo suficientemente alta (Gao et al., 2005).
En estudios anteriores se vio la efectividad de diferentes tratamientos HPP. En concreto los tratamientos ensayados fueron: 400 MPa, 5 min, 10 ºC; 400 MPa, 10 min, 10 ºC; 600 MPa, 5 min, 10 ºC y 600 MPa, 10 min, 10 ºC. Comparando entre ellos y con muestras control fue con el tratamiento 600 MPa, 10 min con el que mejores resultados se obtuvo.
Los objetivos del presente trabajo son:

- Elaboración de productos con unas propiedades sensoriales y nutricionales atractivas para el consumidor
- Definir un tratamiento de higienización que produzca la mínima alteración de dichas propiedades y proporcione alimentos con una vida útil extensa

MATERIAL Y MÉTODOS

Determinación microbiológica: Mesófilos: ISO 4833 (Julio 1991); Psicrotrofos: Plate Count Agar (PCA) 5 días/16º C; Mohos y levaduras: ISO 7954 (Agosto 1988*); Escherichia coli*: Chromocult 24h/37º C; *Listeria monocytogenes*: ISO 11290 (Diciembre 1997); *Salmonella*: ISO 6579 (Diciembre 1993).
Tratamiento de altas presiones hidrostáticas: 600 MPa, 10 min 10 º C. Tratamiento térmico: 85º C 10min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las figuras 1 y 2 muestran la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos y psicotrofos en los dos tipos de bebidas estudiadas y sometidas a los diferentes tratamientos de higienización. En cuanto a los mohos y levaduras, en las bebidas control se detectaron niveles del orden de 10^4 ufc/ml. Tras la aplicación de los tratamientos, la población fúngica se redujo en ambos casos a niveles inferiores al nivel de detección, manteniéndose en estos niveles durante todo el tiempo de estudio. En ningún caso, ni en las bebidas control ni en las diferentes formulaciones sometidas a los dos tipos de tratamiento, se detectó la presencia de *E. coli*. Así mismo, tampoco se detectó la presencia de *Salmonella* ni *Listeria monocytogenes*

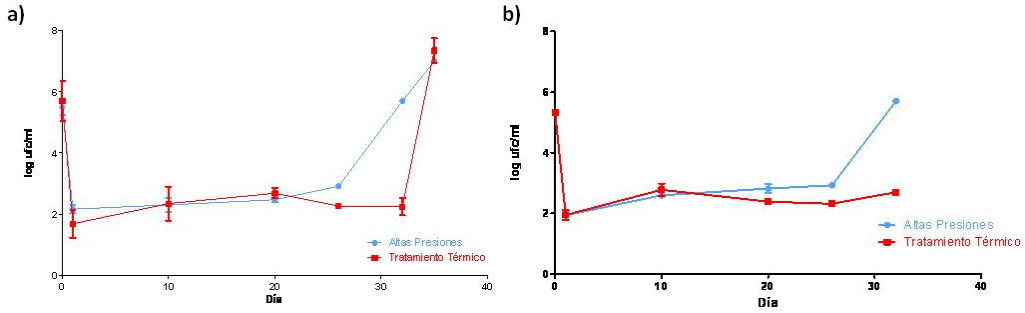


Figura 1. Evolución de aerobios mesófilos (a) y psicotrofos (b) en la bebida de nuez. Los descensos representados a día 1 son los debidos a la aplicación del tratamiento

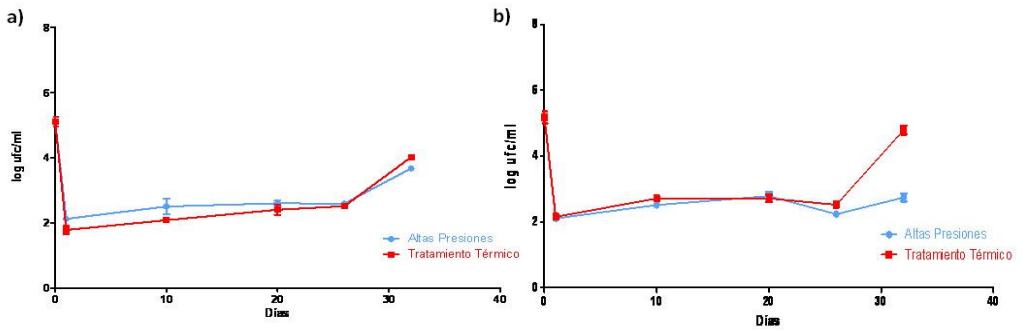


Figura 2. Evolución de aerobios mesófilos (a) y psicotrofos (b) en la bebida de nuez y fruta. Los descensos representados a día 1 son los debidos a la aplicación del tratamiento.

De las gráficas se desprende que ambos tratamientos son más efectivos en las bebidas elaboradas a base de nuez y fruta, proporcionando productos más estables, y dentro de estas bebidas, es el tratamiento por altas presiones el que mantiene los recuentos de aerobios mesófilos y psicotrofos más bajos. Esto es debido al efecto combinado de las altas presiones con los valores de pH bajos. El pH no sólo incrementa la la inactivación durante el tratamiento, sino que además inhibe el desarrollo de las células dañadas durante el mismo (Smelt, 1998).

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados se concluye que el tratamiento de altas presiones combinado con un pH ácido proporciona productos más estables a lo largo del tiempo. Así mismo, es la bebida de nuez y fruta sometida al tratamiento HHP la que presentó mejores propiedades sensoriales (resultados no mostrados).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bayindirllli, A., Alpas, H., Bozoglu F. y Hizal M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. Food Control, 17, 52-58.

Gao, Y., Wang, Y., Jiang, H. (2005). Effect of high pressure and mild heat on Staphylococcus aureus in milk using response surface methodology. Process Biochemistry 40, 1849–1854.

Goodridge, L.D., Willford, J., Kalchayanand, N. (2006). Destruction of Salmonella enteritidis inoculated onto raw almond by high hydrostatic pressure. Food Research International 39, 408–412.

Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trend in Food Science and Technology, 9, 152-158

P140 INCIDENCIA DE PODREDUMBRES Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS SUPERFICIALES DE FRUTA DE HUESO EN POSTCOSECHA

*Jonathan Delgado, Patricia Calvo, Cristina-Miguel Pintado, Belén Velardo, Mercedes Lozano y Matilde Mas**

Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX). Ctra. San Vicente s/n, Finca Santa Engracia 06071 Badajoz

jonathan.delgado@juntaextremadura.net

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La contaminación por diferentes géneros fúngicos afecta a la calidad y vida comercial de frutas, ocasionando grandes pérdidas durante el almacenamiento postcosecha, incluso cuando se conservan a temperatura de refrigeración (Tournas, 2004). Se estima que sobre el 20-25% de frutas y vegetales cosechados son alterados por patógenos durante la manipulación postcosecha, incluso en países desarrollados (Sharma y cols., 2009). Aunque la contaminaciones de las frutas pueden producirse en el cultivo, solo proliferan y causan contaminaciones considerables después de la cosecha cuando las defensas del fruto son reducidas o eliminadas (Tournas y Katsoudas, 2005). En este caso, las prácticas inadecuadas en la cosecha, el almacenamiento post-cosecha y las condiciones durante el transporte y la comercialización, pueden también contribuir al crecimiento bacteriológico y fúngico, así como a la proliferación de micotoxinas (Tournas y Katsoudas, 2005). Las instalaciones de almacenamiento y procesado de frutas constituyen nichos para estos microorganismos, debido a que estos procesos industriales proporcionan los nutrientes y las condiciones adecuadas para su crecimiento (Maukonen y col., 2003), favoreciéndose de este modo la contaminación cruzada.

Con estos antecedentes se pone de manifiesto la necesidad de identificar los hongos filamentosos causantes de podredumbres, evidenciar las contaminaciones a lo largo de todas las etapas del almacenamiento postcosecha y evaluar la microbiota superficial de frutas, con el fin de seleccionar estrategias adecuadas de procesado que permitan llevar a cabo un control microbiológico del producto garantizando una óptima condición comercial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Se recolectaron nectarinas ('Siglo', 'Red Jim') y ciruelas ('Suplumsix', 'Golden globe') durante la campaña 2009, las cuales fueron seleccionadas y almacenadas en cámaras de temperatura y humedad relativa controladas (1,13±0,87ºC y 87,8±4,2% H.R.) durante 4 y 8 semanas en nectarina y ciruela, respectivamente. Tras el almacenamiento refrigerado, la fruta se mantuvo en cámara a 20ºC durante 2 días en nectarinas y 3 días en ciruela para simular su vida útil.

Técnicas de recuento. Mesófilos: según norma ISO 4833 (Julio 1991); Psicrotrofos: Plate Count Agar (PCA) 5 días/16ºC; Mohos y levaduras: según norma ISO 7954 (Agosto 1988)

Aislamiento e identificación de hongos. Se realizaron siembras asépticas del material enfermo extraído de la zona afectada en placas de Petri sobre agar de extrato de malta, se incubó 5-7 días en estufa a 25°C. La identificación del género y posible especie se realizo a través de claves taxonómicas (Samson y cols., 2004), y el sistema informatizado MicroStation™ BIOLOG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mohos identificados en los frutos en estudio son los siguientes: *Alternaria alternata, Alternaria infectoria, Fusarium oxysporum, Aspergillus niger, Aspergillus sydowii, Rhizopus stalonifer, Cladosporium cladosporioides, Ulocladium chartarum, Acremonium strictum, Mucor hiemalis, Penicillium Chrysogenum, Penicillium expansum, Penicillium citrinum.* De todos los microorganismos identificados, destacaron por su elevada presencia *Alternaria* y *Cladosporium*, debido posiblemente a su capacidad de crecer a bajas temperaturas (Tournas, 2004).

En general, la microflora superficial se mantiene estable en las primeras semanas de almacenamiento a 1º C, tanto en nectarinas como en ciruelas (Figura I y II). Tras vida útil (20ºC) se observa un incremento del recuento total de

microorganismos, existiendo una dependencia con el tiempo de almacenamiento, debido a que un mayor tiempo de almacenamiento mermar las defensas del fruto, favoreciéndose, por tanto, el crecimiento de microorganismos oportunistas. Así mismo, se puede observar que una mayor carga superficial inicial va a repercutir en una mayor incidencia de podredumbres (Figura III).

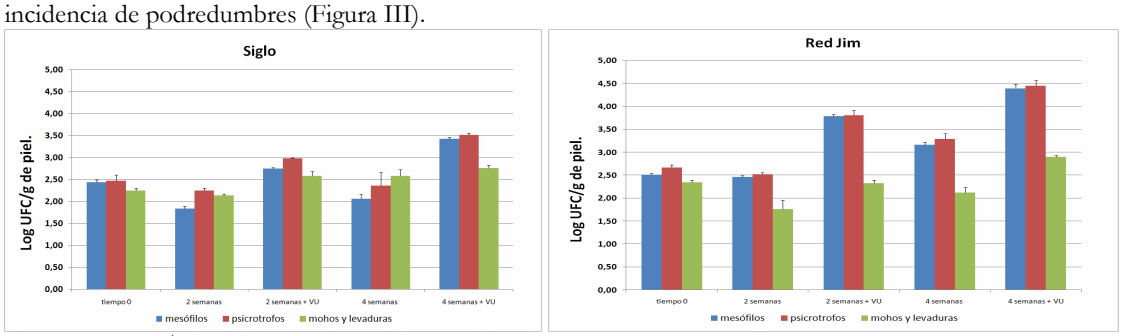


Figura I. Log UFC/g de piel de nectarinas 'Siglo' y 'Red Jim' durante 2 y 4 semanas de almacenamiento a 1º C y posterior vida útil (2 días a 20ºC).

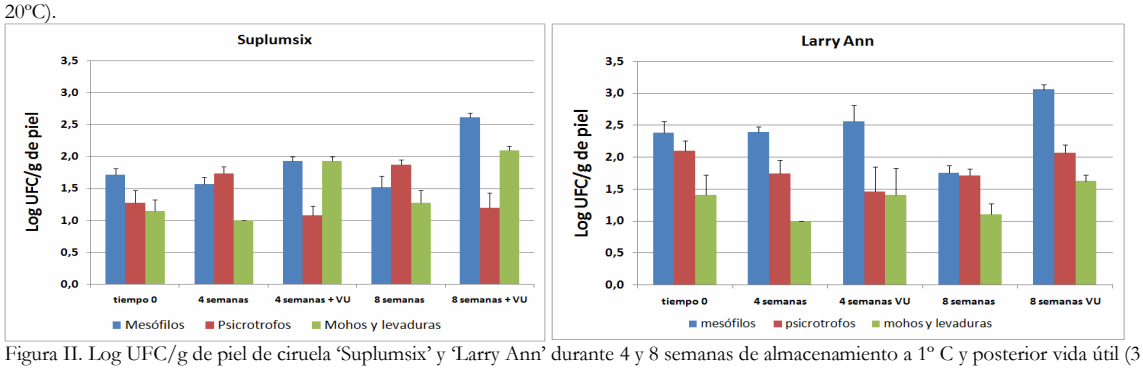


Figura II. Log UFC/g de piel de ciruela 'Suplumsix' y 'Larry Ann' durante 4 y 8 semanas de almacenamiento a 1º C y posterior vida útil (3 días a 20ºC).

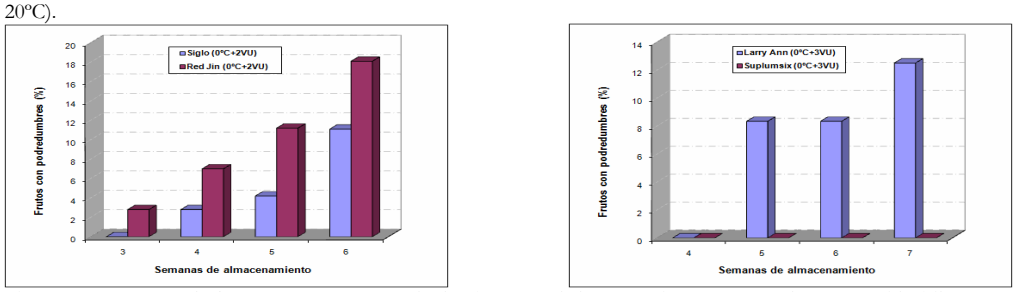


Figura III. Porcentaje de frutos que presentan podredumbres tras el almacenamiento postcosecha (1ºC) y vida útil (20ºC).

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados se concluye que tanto los factores intrínsecos como los extrínsecos afectan a la composición y carga de la población microbiana condicionando así, las estrategias de control microbiológico en campo y en el ambiente industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Tournas V.H. 2004. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. International Journal of food Microbiology, 99:71-77.

Tournas VH, Katsoudas E. 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruit. International Journal of Food Microbiology, 105: 11-17.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC .2004. Introduction to Food- and Airborne Fungi, 7th Edition. Utrech: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Sharma, R.R., Singh, D. and Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50:205-221.

P147 USO DE ELECTRONES ACELERADOS PARA AUMENTAR LA VIDA ÚTIL DE LOMO DE CERDO ADOBADO

I. García Márquez, M. I. Cambero, M. C. Cabeza, J. A. Ordóñez, R. Velasco y L. de la Hoz

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

ire-gm@hotmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El lomo adobado es un preparado cárnico que se elabora con lomo fresco de cerdo al que se añaden sales del curado (sal común, sales nitrificantes y ácido ascórbico) y especias e ingriedientes (ajo, pimentón y otras). A pesar de los aditivos utilizados y el almacenamiento bajo refrigeración que se exige para su distribución, la vida útil es

corta, no más de 4 - 6 días en aire y algo más de una semana a vacío. Cualquier método que implique un aumento de la vida útil conlleva un beneficio comercial considerable, siempre que se aseguren unas buenas condiciones higiénicas.
El presente trabajo se ha realizado con el fin de estudiar la posible ampliación de la vida útil del lomo adobado mediante la aplicación de radiaciones beta (electrones acelerados). Al tiempo se podría conseguir la higienización del producto, ya que se ha demostrado que esta tecnología es muy eficaz para reducir la carga de patógenos (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.) hasta niveles despreciables, tanto en productos cárnicos listos para el consumo (Cabeza y col., 2007) como en carne fresca (Ordóñez y col., 2007).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se adquirieron varias unidades de lomo adobado, elaboradas 24 horas *post-morten* en una industria local. Cada lomo se dividió en 5-6 trozos cilíndricos (8 cm de diámetro y 12 cm de lado), con un peso aproximado de 65 g, que se envasaron a vacío (20 kPa) en plásticos de baja difusión a los gases.
El tratamiento se realizó en la planta de electrones acelerados de "Ionisos Ibérica S.A." de Tarancón, que opera a 10 MeV. Se aplicaron dosis de 1 y 2 kGy, cuyo valor real se verificó con dosímetros de acetato de celulosa irradiados con las piezas de lomo. No se aplicaron dosis mayores porque experiencias previas demostraron que en carne fresca se producen cambios sensoriales detectables.
Tras el tratamiento, las piezas se almacenaron a 4ºC (temperatura normal de comercialización) y a 8ºC (abuso de temperatura). A diferentes tiempos se tomaron muestras para determinar los recuentos de diversos grupos microbianos. Los recuentos de la microbiota total, se hicieron en agar de recuento en placa (PCA), los de *Brochothrix thermosphacta* en agar STTA, las bacterias lácticas (LAB) en MRS a pH 5,5 y las enterobacterias en VRBG. Las placas se incubaron a 32ºC, excepto las de VRBG, que se hizo a 37ºC. La vida útil se estableció cuando el recuento total alcanzó la tasa de 1-5 x 10^7 ufc/cm^2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta de los diferentes grupos frente a la acción letal de los electrones acelerados fue diferente, ya que las dosis de reducción decimal mostraron valores aproximados de 3,3, 1,5 y 0,9 kGy para la microbiota total, LAB, y *B. thermosphacta*, respectivamente. En general, son valores elevados, sobre todo el de la microbiota total, pero téngase en cuenta, por una parte, que son estimaciones *groso modo* y, por otra, que esos grupos están formados por especies microbianas mixtas, aunque pertenezcan a las mismas familias. En el lomo adobado es posible, incluso, que una parte de la microbiota superficial esté compuesta por bacterias esporuladas procedentes del pimentón y especias utilizadas.
Tanto en las muestras control como en las irradiadas con electrones, la microbiota mayoritaria, cuando se alcanzaron valores del recuento total del orden de 10^7 ufc/cm^2, estuvo compuesta en la mayoría de los casos por LAB, independientemente de la tasa original que mostrasen los diferentes grupos microbianos, lo cual puede considerarse como normal en las muestras envasadas a vacío, ya que repetidas veces se ha demostrado que este grupo bacteriano es el que prevalece en la carne así envasada. Sin embargo, en atmósfera de aire este resultado fue sorprendente, dado que lo habitual en estas condiciones es que predomine la microbiota aerobia Gram negativa, principalmente las pseudomonas. Quizás la explicación de este fenómeno sea la presencia de agentes nitrificantes, ya que es bien conocido que las LAB son resistentes al nitrito (Jay y col., 2005). De hecho, las LAB son las bacterias dominantes en el proceso de maduración de los embutidos, a los cuales se le añaden sales nitrificantes para su elaboración. La mayor diferencia entre las muestras irradiadas y las no tratadas se observó en el número inicial de bacterias, que fue aproximadamente de una unidad logarítmica menos cuando se aplicó 1 kGy y de 2 cuando el tratamiento fue de 2 kGy. También se detectó la presencia de *B. thermosphacta,* lo que puede considerarse como normal. Su número aumenta ligeramente cuando hay una restricción de aire sin llegar a vacío (muestras envueltas, por ejemplo en plásticos semipermeables) y en el caso del vacío siempre se detecta a niveles inferiores a las LAB y similares a las enterobacterias si existen. En el presente estudio se detectaron niveles despreciables de enterobacterias, lo que indica que los lomos frescos se han separado de la canal en condiciones higiénicas adecuadas.
La vida útil de las muestras controles fue diferente dependiendo de si la atmósfera de almacenamiento era aire o vacío. En aire, se estimó una vida útil para las muestras control (no irradiadas) de unos 5 - 6 días tanto a 4 como a 8 ºC, mientras que a vacío, una vez el recuento total alcanzó el valor de 5x10^7 ufc, se mantuvo a niveles constantes, no sobrepasando el nivel de 10^8 ufc/cm^2. Se ha considerado la vida útil de estas muestras de 8 – 12 días a 4º C y de 6 – 10 días las almacenadas a 8º C, pero siempre con una carga bacteriana rayando en niveles próximos al umbral de no admisible. No obstante, puede decirse que el vacío es un método razonablemente adecuado para ampliar en unos días la vida útil de este producto aunque desde el punto de vista comercial puede resultar todavía corta. El tratamiento con electrones acelerados redujo el recuento total en el día 0, lo que produjo dos efectos. Por una parte, causó una disminución mayor de la microbiota distinta a las LAB, ya que, como antes se ha mencionado, fueron las que presentaron los valores D más elevados, lo que condujo a la presencia menor de bacterias que compitieran con las LAB. Por otra parte, la reducción general de los recuentos dio lugar a un aumento considerable de la vida útil, tanto en las muestras almacenadas en atmósfera de aire como a vacío. Cuando se aplicaron dosis de 1 kGy, se estableció una vida útil de unos 22 días y de 25, cuando la dosis fue de 2 kGy en las muestras almacenadas a 4º C. Es un aumento muy considerable. Piénsese el beneficio económico que supone tener

el producto 4 semanas en refrigeración en vez de una. La vida útil de las muestras mantenidas a 8º C fue, obviamente, menor pero, no obstante, el incremento de la misma fue también significativo, ya que tanto para 1 como 2 kGy, la vida útil estimada fue de alrededor de 15 días. Este hecho es de gran importancia porque si se produce un abuso de temperatura por cualquier causa, fortuita o no, no conlleva un crecimiento mucho más rápido de las bacterias supervivientes al tratamiento. Se está logrando una duplicación de la vida útil en las muestras almacenadas a 8º C.

Desde el punto de vista higiénico puede decirse que el tratamiento aplicado permite obtener un producto con un nivel despreciable de los patógenos comunes (*Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*). El más peligroso es *L. monocytogenes* que por su carácter psicrotrofo podría multiplicarse al ampliar la vida útil. No obstante, se ha observado previamente (Cabeza y col., 2007) que con dosis de 1 kGy se consigue el objetivo de seguridad alimentaria en otras matrices cárnicas donde puede crecer esta bacteria.

CONCLUSIONES

La aplicación de electrones acelerados a dosis de 1 y 2 kGy a lomos adobados permite ampliar considerablemente la vida útil de este producto cárnico (hasta 16 – 22 días bajo almacenamiento en aire y 22 – 24 días envasadas a vacío). Incluso si se produjera un abuso de temperatura (aumento incontrolado) se ampliaría igualmente la vida útil, aunque se reduciría a la mitad aproximadamente. Dosis inferiores a 2 kGy permite, al tiempo, higienizar el producto respecto a los patógenos más comunes, especialmente *L. monocytogenes.*

Este trabajo ha sido financiado por el programa CONSOLIDER-INGENIO 2010, proyecto CARNISENUSA (2007- CSD-00016) y la convocatoria de actividades de I + D del Banco Santander-UCM grupo 920276.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cabeza, M.C., Cambero, de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 8: 299-305.

Jay, J.M.; Loessner, M.J. y Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7ª ed. Ed. Springer, NY.

Ordóñez, J. A., Cabeza, M. C., Hoz, L. y Cambero, I. 2007. Uso de radiaciones beta para conseguir el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) en carne de pollo respecto a *Salmonella* spp. Rev. Comité Científico AESAN. 6: 67-87.

P200 ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL EN LANGOSTINOS PREPARADOS CON DIFERENTES SALSAS

Beatriz Barcenilla Gago[1], Mercedes Rubio[2], Karine, Lebrun[2], Marta Hernández[1] y David Rodríguez-Lázaro[1]*

[1] Instituto Tecnológico Agrario (ITA). Carretera de Burgos km 119 s/n, 47071, Valladolid, España.

ita-rodlazda@itacyl.es

[2] GAMBAFRESH, Pol. Ind. Montenuevo, 09320 Valdorros Burgos, España

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La vida útil de un alimento comprende el tiempo transcurrido entre la fabricación y el momento en que se presentan cambios significativos en él, que puedan generar rechazo en el consumidor final. Los factores que influyen en la vida útil son: la naturaleza y estado de la materia prima, el proceso de producción, las condiciones de distribución, y el tiempo y condiciones de almacenamiento, que conllevan cambios a nivel físico-químico, microbiológico y/o sensorial en el alimento.

El presente estudio tiene como objetivo principal estimar la vida útil de langostinos preparados en diferentes salsas y sometidos a un procedimiento previo de congelación/descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron cuatro muestras correspondientes a langostinos con las siguientes salsas: al ajillo, mediterránea, americana y curry. Las muestras se recibieron congeladas, se dejaron descongelar a 4ºC y se mantuvieron en refrigeración (4ºC) durante los días que duró el estudio.

Se analizaron los siguientes parámetros microbiológicos: recuento de aerobios mesófilos y coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* siguiendo métodos estandarizados de análisis a partir de 25 g de muestra. Se realizaron mediciones instrumentales del pH mediante un pH-metro Basic 20 Plus (Crison) y del color mediante colorímetro Minolta CR-400. El análisis sensorial se realizó mediante un panel de cata de 11 personas empelando una escala de 1 a 5, siendo 5 la característica más óptima. Las categorías evaluadas fueron: apariencia, olor, sabor y textura. Todos los análisis se realizaron a los 7, 8, 9 y 10 días desde la descongelación de las muestras. Para el estudio de los datos se empleó el programa SPSS 16.0 y el método de análisis utilizado fue un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor con prueba de rangos múltiples de Duncan, utilizando un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH medio obtenido para las muestras de salsa ajillo y mediterránea fue de 8.3 mientras que el pH de las salsas americana y curry fue de 8.2 y 8.6 respectivamente, sin observarse una variación significativa en ninguna de las muestras, aunque sí un ligero aumento del pH de la muestra de langostinos al ajillo y americana a los 8 días de haberse descongelado, descendiendo ligeramente a los 9 días y aumentando de nuevo a los 10 días de la descongelación. Las muestras de langostinos en salsa mediterránea y curry experimentaron un comportamiento similar y contrario a las anteriores, disminuyendo ligeramente a los 8 días de la descongelación y aumentando ligeramente a los 10 días.

Los valores de color instrumental no sufrieron modificaciones significativas, con unos valores medios de L* en torno a 36, a* de 1.5 y b* de 2.3 para las muestras de salsa ajillo y mediterránea, 5.5 en la salsa americana y 8 en la salsa curry. El valor de luminosidad (L*) de las muestras de langostinos en salsa ajillo, mediterránea y americana disminuyó ligeramente al cabo de 10 días de almacenamiento, y sin embargo en la salsa al curry, éste aumentó ligeramente con el paso del tiempo. Los valores de a* se mantuvieron constantes en las muestras de salsa mediterránea y americana, sin embargo éstos aumentaron ligeramente en el caso de las salsa al ajillo y disminuyeron ligeramente en el caso de salsa curry. Finalmente, los valores de b* experimentaron cambios similares en las cuatro muestras, aumentando y disminuyendo ligeramente a lo largo del tiempo.
No se comprobó la presencia de *L. monocytogenes, Salmonella* spp., *E. coli, St. aureus* en ninguna de las muestras analizadas y se observó un incremento tanto en los recuentos de aerobios mesófilos totales, como de coliformes totales a lo largo de la vida útil del producto (Figura 1a y 1b), no obstante estos valores se encuentran dentro de los valores establecidos por el RD 3484/2000 hasta febrero 2010 en el que fueron derogados por RD 135/2010.

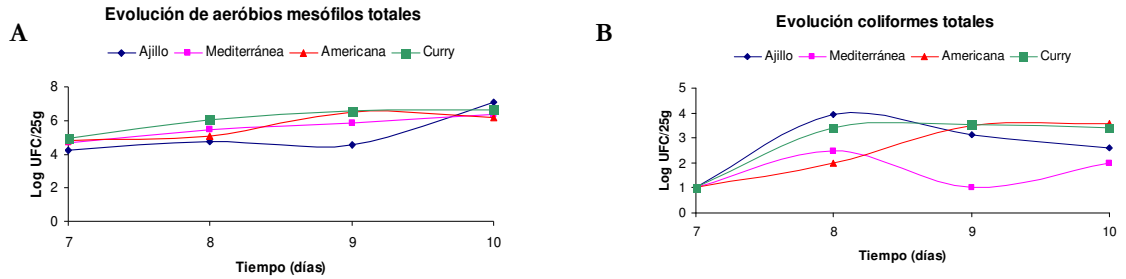


Figura 1. Evolución de los recuentos de aerobios mesófilos totales (A) y de coliformes totales (B) a lo largo del estudio.

Los catadores valoraron como aceptables las muestras de langostinos en salsa al ajillo y salsa mediterránea durante los 10 días que duró el análisis. Sin embargo, a partir del día 8 y 9 se observaron cambios significativos en las muestras de salsa americana y los langostinos en salsa curry, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación sensorial de los langostinos en salsa.

Calificación																
Tiempo	Apariencia				Olor				Sabor				Textura			
(días)	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
7	4,4^{a}	3,8^{a}	3,4^{a}	3,6^{a}	4,1^{a}	3,3^{a}	3,4^{a}	3^{a}	4,2^{a}	3,3^{a}	3,2^{a}	3,1^{a}	4,1^{a}	4^{a}	3,7^{a}	3,6^{a}
8	4^{a}	3,7^{a}	3,4^{a}	3,4^{a}	4,2^{a}	3,2^{a}	2,7^{b}	2,8^{a}	4,3^{a}	3,2^{a}	3,1^{a}	2,6^{b}	3,8^{a}	3,4^{b}	3,2^{a}	3,4^{a}
9	3,5^{b}	3,5^{b}	2,6^{b}	3,4^{a}	3,4^{b}	3,2^{a}	2,5^{b}	2,5^{b}	3,8^{a}	3,5^{a}	2,8^{b}	2,6^{b}	3,3^{b}	3,3^{b}	2,9^{b}	2,7^{b}
10	3,6^{b}	3,7^{a}	2,2^{b}	3,2^{b}	3^{b}	3,1^{a}	2^{c}	2,4^{b}	3,7^{a}	2,8^{b}	2,3^{c}	2,4^{b}	3,4^{b}	3,3^{b}	2,5^{b}	2,8^{b}

A: salsa al ajillo, B: salsa mediterránea, C: salsa americana y D: salsa curry. Las letras diferentes (a,b,c) indican diferencias significativas ($p<0.05$)

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados globales de los análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales se puede concluir que la vida útil de este tipo de productos es de al menos 8 días, pudiéndose ésta considerar de hasta 10 días en el caso de los langostinos en salsa al ajillo y mediterránea.

DESINFECCIÓN DE ALIMENTOS

COMUNICACIONES ORALES

O202 INACTIVATION OF NOROVIRUSes IN STRAWBERRY PUREE USING HIGH HYDROSTATIC PRESSURE

Katarina Kovač, Marta Diez-Valcarce, Marta Hernández and David Rodríguez-Lázaro
Instituto Tecnológico Agrario (ITA), Junta de Castilla y León, Valladolid, España. kovkovca@itacyl.es

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Enteric viruses, in particular noroviruses and hepatitis A virus, are increasingly recognized as a cause of food-borne diseases[1]. Numerous infections were already associated with consumption of raw fruits and vegetables[2]. This kind of foods can not be heat treated as temperature can affect negatively the rheological properties of the product. Consequently, other alternatives have been studied such as high hydrostatic pressure (HPP) processing. In contrast to heat, HPP does not disrupt covalent bonds thus maintaining the primary structure of proteins and therefore maintain their appearance, flavour, texture and nutritional qualities[3]. In our study, HHP was applied to strawberry puree inoculated with a virus model; murine norovirus (MNV-1), a surrogate of human noroviruses. The objective of the study was to evaluate the effect of HHP treatment with different pressures on the rate of inactivation of viral infectivity as well as to determine the effect of HHP on the viral genome.

MATERIAL AND METHODS

MNV-1 was propagated in the RAW 264.7, a mouse leukaemic monocyte macrophage cell. The titer of virus used in the experiments was ~3 x 10^6 $TCID_{50}$/mL. Fifteen grams of strawberry puree were inoculated with MNV-1 and left overnight in order that viruses attach to the matrix. Inactivation with HHP was performed using Wave 6000/135 machine (Hyperbaric, Burgos, Spain). Samples packed in bags with ice were treated for 5 min using a mild (200 MPa) and severe (400 MPa) pressures. All treatments were performed in triplicate. After treatment, virus was concentrated from the strawberry puree using the protocol based on the one described by Dubois and co-workers[4]. Virus particles were eluted from strawberry puree using Tris Glycine 1% Beef Extract (TGBE) buffer, pH 9.5 with added pectinase to prevent jelly formation[4-6]. Samples were filtrated through stomacher bags and then centrifuged to remove debris. Viruses were then concentrated with precipitation using 5× polyethylene glycol/NaCl solution which was added to the supernatant. After centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in PBS. Viruses were purified using chloroform-butanol solution. RNA from MNV-1 samples was extracted using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the recommendations of the manufacturer. Concentration of MNV-1 RNA was determined using real-time RT-PCR[7]. Infectivity of virus in samples was determined by Tissue Culture Infectious Dose 50 % ($TCID_{50}$/mL) method. The virus titer was established by determining the highest dilution of the specimen which produces a cytopathic effect in 50 % of the cell cultures or wells inoculated using Kärber formula.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the HHP effect on viral infectivity and viral genomes are shown in Figure 1. As expected, the reduction of viral infectivity was significantly different in both treatments. When using a mild treatment we only observed a slight reduction of the viral infectivity (1.17 log $TCID_{50}$/mL), while with treatment of 400 MPa total reduction was obtained (>3.33 log $TCID_{50}$/mL). From the Figure it is obvious that log reductions of viral titer were much higher when infectivity of virus was measured comparing to real-time RT-PCR results, what means that real-time RT-PCR can not be used as a tool to predict remained virus infectivity.

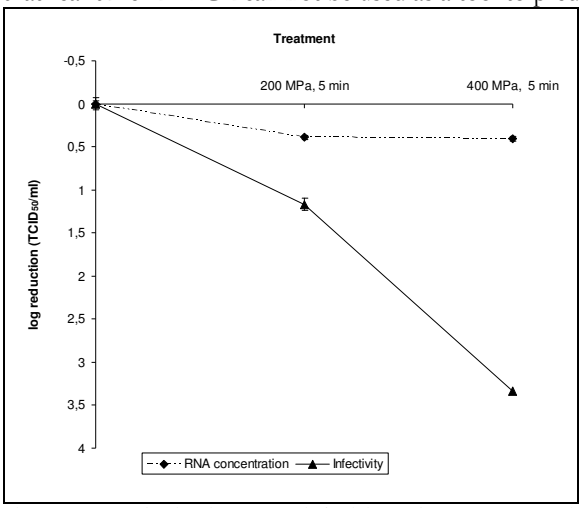


Figure 1. Log reduction in MNV-1 infectivity and RNA concentration after different HHP treatments. Error bars denote standard deviation derived from three independent experiments. No MNV-1 was detectable by infectivity assay with 400 MPa at 5 minutes treatment.

CONCLUSIONS

HHP is an effective tool to eliminate MNV-1 in strawberry puree. However more studies using different combinations of pressures and times should be carried out for understanding the reduction of the inactivation rates at high pressures.

REFERENCES

1. Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. International Journal of Food Microbiology, 90: 23-41.
2. Croci L., Dubois E., Cook N., de Medici D., Schultz A.C., China B., Rutjes S.A., Hoorfar J., Van der Poel W.H.M. 2008. Current methods for extraction and concentration of enteric viruses from fresh fruit and vegetables: towards international standards. Food Analytical Methods, 1: 73-84.
3. Murchie L.W., Cruz-Romero M., Ferry J.P., Linton M., Patterson M.F., Smiddy M., Kelly A.L. 2005. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 6: 257-270.
4. Dubois E., Agier C., Traoré O., Hennechart C., Merle G., Crucière C., Laveran H. 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. Journal of Food Protection, 65: 1962-1969.
5. Rzezutka A., Alotaibi M., D'Agostino M., Cook N. 2005. A centrifugation-based method for extraction of norovirus from raspberries. Journal of Food Protection, 68: 1923-1925.
6. Rzezutka A., D'Agostino M., Cook N. 2006. An ultracentrifugation-based approach to the detection of hepatitis A virus in soft fruits. International Journal of Food Microbiology. 108: 315-20.
7. Baert L., Wobus C.E., Van Coillie E., Thackray L.B., Debevere J., Uyttendaele M. 2008. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. Applied and Environmental Microbiology, 74: 543-546.

O208 ALTAS PRESIONES EN LA ELIMINACIÓN DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EN CARPACCIO DE TERNERA

María de Alba, Daniel Bravo y Margarita Medina
Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. de La Coruña Km 7, 28040 Madrid
de-alba.maria@inia.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El carpaccio es un alimento RTE (ready to eat) que puede contaminarse durante su preparación. Entre los tratamientos de higienización, las altas presiones se aplican en una gran variedad de alimentos, entre los que los productos cárnicos ocupan un lugar relevante. El objetivo del presente trabajo es conocer el efecto de distintos tratamientos de alta presión sobre los niveles de *Salmonella* Enteritidis en carpaccio de ternera loncheado contaminado con el patógeno, así como evaluar los cambios en el pH, la actividad de agua, la textura y el color durante la conservación del producto durante 30 días en condiciones de abuso de temperatura (8º C).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron tres cepas de *Salmonella* Enteritidis de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 4155, CECT 4300 y CECT 4396). Se inoculó carpaccio de ternera comercial con una mezcla de las tres cepas de *Salmonella* a aproximadamente 10^6 ufc/g. Las muestras fueron envasadas a vacío y se mantuvieron 24 h a 4º C. A continuación, se sometieron al tratamiento por altas presiones. Asimismo, se prepararon lonchas sin inocular para el análisis de aerobios totales, la determinación del pH, de la actividad de agua (a_w), el color y la textura.

Se aplicaron tratamientos de 450 MPa durante 5, 10 y 15 min a 12º C con un equipo de altas presiones modelo ACIP 6000 (ACB, Nantes) de 3.5 L de capacidad. Tras la presurización, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 8º C durante un periodo de 30 d.

Los análisis microbiológicos se realizaron inmediatamente después de la presurización y los días 1, 3, 7, 15, 21 y 30 de refrigeración a 8º C. Se efectuaron recuentos de *Salmonella* Enteritidis en placas de agar SS que fueron incubadas a 37º C durante 24 h. Asimismo, se realizó un enriquecimiento en muestras de 10 g en agua peptonada, seguido de caldo Rappaport Vassiliadis y siembra en agar SS. En las muestras no contaminadas se determinaron los niveles de aerobios totales en placas de TSA incubadas a 30º C durante 72 h.

Se determinó el pH con un pHmetro GPL 22 (Crison, Barcelona) y la a_w en un Aqua Lab Serie 3 (Decagon, EEUU), por duplicado. Los análisis de textura se realizaron con un equipo Instron 4301 (Instron Ltd., Barcelona) empleando las celdas Warner-Bratzler y Kramer. El color se analizó con un espectrofotómetro CM 700d (Minolta, Japón) determinándose los valores de L^* (luminosidad), a^* (tendencia al rojo) y b^* (tendencia al amarillo). Los análisis se realizaron los días 1, 15 y 30 de refrigeración a 8º C.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANOVA con el programa SPSS Win 12.0 con tratamiento y tiempo de refrigeración como efectos principales. La comparación de medias se realizó con el test de Tukey y un nivel de significación de $P<0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de *Salmonella* Enteritidis en carpaccio de ternera tras la aplicación de distintos tratamientos de presurización durante 30 d de refrigeración a 8ºC se recogen en la Tabla 1.

Se registró mediante el análisis de varianza, el efecto significativo del tratamiento de altas presiones ($P<0.001$) y del tiempo de refrigeración a 8º C ($P<0.05$) sobre los recuentos del patógeno. Tras la aplicación del tratamiento, se consiguieron reducciones de *Salmonella* Enteritidis de 2.68 y 4.94 log ufc/g con 450 MPa durante 5 y 10 min, respectivamente, mientras que no se detectó el patógeno en las muestras presurizadas a 450 MPa durante 15 min. Durante el periodo de refrigeración investigado, se observó una reducción de 0.26 log ufc/g en los niveles de *Salmonella* Enteritidis en el carpaccio no presurizado, que en las muestras tratadas a 450 MPa durante 5 min fue de 1.32 log ufc/g. En las muestras presurizadas con tratamientos más largos no se observó la recuperación del patógeno tras recuento directo, aunque se detectó tras enriquecimiento de las muestras.

Tabla 1.

	NP (No Presurizado)	450 MPa / 5 min	450 MPa / 10 min	450 MPa / 15 min
0 h	6.54[a]	3.86[b]	1.60[c]	ND[d]
1 d	6.40[a]	2.93[b]	ND[c]	ND[c]
3 d	6.45[a]	3.44[b]	ND[c]	ND[c]
7 d	6.55[a]	2.00[b]	ND[c]	ND[c]
15 d	6.45[a]	2.45[b]	ND[c]	0.50[d]
21 d	6.29[a]	2.08[b]	0.65[c]	ND[d]
30 d	6.28[a]	2.54[b]	ND[c]	ND[c]

ND, no detectado por recuento directo

[a,b,c] Los valores de la misma fila con distinto superíndice son significativamente ($P<0.05$) diferentes

El tratamiento y el tiempo de conservación a 8º C mostraron un efecto significativo ($P<0.001$) sobre los valores de pH del carpaccio, más altos en las muestras presurizadas con respecto a las muestras control sin presurizar a los 15 y 30 d de refrigeración. La actividad de agua se vio aumentada significativamente ($P<0.001$) por las altas presiones, con valores superiores en el carpaccio presurizado ($P<0.05$) a partir de los 15 d a 8º C.

La presurización y el tiempo de refrigeración afectaron significativamente ($P<0.001$) a los parámetros de color estudiados. Los valores de L^* fueron superiores en el carpaccio presurizado, aunque no se detectaron diferencias

entre los tres tratamientos de presurización el día 1. Sin embargo, *L** alcanzó valores más altos a los días 15 y 30 en las muestras presurizadas 10 y 15 min. El parámetro *a** disminuyó en las muestras presurizadas y también durante el periodo de refrigeración, y el parámetro *b** registró valores más bajos en las muestras presurizadas con respecto al carpaccio no presurizado, aunque las diferencias se atenuaron con el tiempo de conservación.
Con respecto a la textura, la presurización y el tiempo de refrigeración afectaron significativamente ($P<0.001$) a la fuerza al corte determinada con la celda Warner-Bratzler, con valores más bajos en las muestras presurizadas, que sin embargo aumentaron durante la refrigeración alcanzando valores más altos que en el control a los 30 d. También la fuerza máxima determinada con la celda Kramer resultó significativamente influida por la presurización ($P<0.05$) y el tiempo de refrigeración ($P<0.001$), con valores más altos en las muestras presurizadas durante 5 y 10 min, mientras que no se detectaron diferencias en esta característica entre el carpaccio presurizado a 450 MPa durante 15 min y el control no presurizado. Los valores de este parámetro también se incrementaron con el avance de la refrigeración, fundamentalmente en las muestras presurizadas.

CONCLUSIONES

El tratamiento de altas presiones a 450 MPa durante 5, 10 y 15 min, resultó muy eficaz en la inactivación de *Salmonella* Enteritidis inoculada en carpaccio de ternera. El efecto antimicrobiano se mantuvo a lo largo de los 30 d de refrigeración investigados en condiciones de abuso de temperatura. La alta presión dio lugar a un empalidecimiento del carpaccio y una menor tendencia al rojo, aunque el efecto fue mayor con los tratamientos más intensos. Asimismo, la textura resultó afectada con una menor resistencia al corte tras el tratamiento.

POSTERS

P84 ANTIMICROBIAL EFFECT OF ENTEROCIN AS-48 AND/OR BIOCIDES ON FOOD-BORNE PATHOGENIC BACTERIA

Natacha Caballero, Hikmate Abriouel, Araceli Castro, Mª Teresa García, Magdalena Martínez Cañamero, and Antonio Gálvez *Área de Microbiología, Dpto. de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain. agalvez@ujaen.es*

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Enterocin AS-48 is a cyclic peptide produced by *Enterococcus faecalis* S-48 to compete with other bacteria in their environment (Maqueda et al., 2004). Due to its activity against various Gram-positive and some Gram-negative bacteria it has clear potential for use as a food preservative (Abriouel et al., 2010). Here, we studied the effect of enterocin AS-48 and/or biocides on food-borne pathogenic bacteria growth with the aim to evaluate the use of those antimicrobials in food preservation.

MATERIALS AND METHODS

The effect of antimicrobials (enterocin AS-48 and/or biocides) was tested against pathogenic bacteria like *Bacillus* (vegetative cells), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri*, *E. coli* and *Salmonella*. Also, we determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of those antimicrobials used separately or combined in broth medium (TSB).

RESULTS AND DISCUSSION

The antimicrobial effect of AS-48 was highly dependent on bacterial species and strain tested being highly active against *Listeria* (MIC = 2 μg/ml) followed by various species of *Bacillus* (MIC of 2-12 μg/ml) and Gram-negative bacteria (*E. coli* and *Salmonella*). When biocides were tested against those bacteria different effects were observed depending on the bacteria tested and the biocide used. In general, triclosan, cetrimide and benzalkonium were the most active against the bacteria tested being the MIC ranging from 0.00025 to 0.025%, followed by hexadecylpiridinium and clorhexidine. The combination of AS-48 and biocides had a synergistic effect decreasing the amount of antimicrobials for total bacterial growth inhibition.

CONCLUSIONS

Results from this study strengthen the potential of AS-48 in combination with low concentration of biocides against bacteria of concern in the food industry.

REFERENCES

Maqueda M, Gálvez A, Martínez Bueno M, Sanchez-Barrena MJ, González C, Albert A, Rico M & Valdivia E (2004) Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr Protein Pept Sci* 5: 399-416.

Abriouel H, Lucas R, Ben Omar N, Valdivia E, Gálvez A (2010). Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiot. Antimicrob. Prot.* 2:77-89.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by project AGL2008-01553/ALI.

P112 PRODUCTOS ALTERNATIVOS AL HIPOCLORITO SÓDICO PARA LA DESINFECCIÓN Y CONTROL DE *SALMONELLA* EN MANZANA FRESCA CORTADA

*Abadias, Maribel**[1], Usall, Josep[1], Anguera, Marina[1], Alegre, Isabel[2] y Viñas, Inmaculada[2]*
[1]IRTA, Centre UdL-IRTA, XARTA-Poscosecha. Rovira Roure, 191, 25198, Lleida
isabel.abadias@irta.cat
[2]Universitat de Lleida, Centre UdL-IRTA, XaRTA-Poscosecha. Rovira Roure, 191, 25198, Lleida

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Durante los últimos años, el consumo de frutas y hortalizas mínimamente procesadas (MP) ha incrementado de forma espectacular, bien sea por motivos de conveniencia o bien por aspectos relacionados con la salud. Aunque frutas y hortalizas, y en particular las frutas por su acidez, se han considerado 'seguras' desde el punto de vista microbiológico, se han producido algunos brotes de toxiinfecciones alimentarias que se han relacionado con su consumo. Además, se ha demostrado que *Salmonella* puede crecer en manzana y melocotón fresco cortado a temperatura igual o superior a 10ºC incluso aún a pH muy bajo, entre 3.5-4.7 (Alegre et al. 2010a, b).

Durante el procesado de fruta MP no existe ninguna operación que garantice la eliminación total de los microorganismos, tanto patógenos como alterantes, por lo que la prevención de la contaminación y la implantación de un buen sistema de desinfección son puntos críticos para garantizar su seguridad microbiológica. Actualmente, el hipoclorito sódico es el desinfectante más utilizado en esta industria. No obstante, pierde actividad en contacto con materia orgánica, con la exposición a la luz, al aire y metales, es corrosivo y puede causar irritación de la piel y el tracto respiratorio de los trabajadores. Además, existe una creciente preocupación por la formación de compuestos potencialmente cancerígenos (p.ej. trihalometanos) cuando reacciona con la materia orgánica. Esto ha provocado la búsqueda de sistemas o productos alternativos al uso del cloro, más respetuosos para el medio ambiente y más seguros para el consumidor y para el operario en la industria. Entre los más estudiados se encuentran sustancias naturales, químicos de bajo riesgo, ozono, agua electrolizada, UV, cultivos bioprotectores o antagonistas, entre otros. El objetivo de este estudio es evaluar el uso de productos alternativos al uso del hipoclorito sódico para la reducción y control de *Salmonella* en manzana cortada durante su conservación a 10ºC, comparándolos con una solución estándar de hipoclorito sódico (100 ppm, pH 6.5) y con agua.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una mezcla de dos cepas: *Salmonella* Michigan BAA-709 (aislada de melón) y *Salmonella* Montevideo BAA-710 (aislada de un paciente con salmonelosis asociada a tomates). Se inocularon individualmente en medio líquido y se incubaron de 20 a 24 h a 37 ºC. Posteriormente, se centrifugaron, se redisolvieron en solución salina. Se estimó la concentración usando un espectrofotómetro (λ=420 nm) y se preparó un inóculo mixto con 107 o 106 ufc/ml de cada una de ellas para los ensayos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente.

En los ensayos *in vitro* se determinó la efectividad de 12 sustancias a distintas concentraciones poniendo en contacto directo en solución acuosa la sustancia a ensayar con ambas cepas de *Salmonella*, durante 1, 3 y 5 min, tras los cuales realizó un recuento en medio selectivo XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar). A partir de este ensayo se descartaron las sustancias que no presentaron ningún efecto y se seleccionaron para los ensayos *in vivo* (sobre manzana) aquellas que redujeron la población de *Salmonella*. Estas fueron: vainillina (20, 40 y 80 mM), carvacrol (500, 875 y 1000 ppm), peróxido de hidrógeno (H2O2, 0.5, 1 y 2%), ácido peracético (PAA, 40, 80, 120 ppm), N-acetil-cisteina (NAC, 0.25, 0.5, 1.0 %) y Citrox 14 WP (Citrox Ltd, UK, 5 g/l).

En el ensayo *in vivo*, se utilizaron manzanas 'Golden Delicious' que se desinfectaron superficialmente y se pelaron. Se obtuvieron cilindros de 1.2 cm de diámetro y 1 cm de longitud, se inocularon mediante inmersión en agitación durante 2 min en la suspensión de *Salmonella* (106 ufc/ml), se escurrieron y dejaron secar. A continuación, se trataron durante 1 min en agitación con el producto a estudiar. Se determinó la concentración antes y después del tratamiento mediante siembra en el medio selectivo XLD. Una parte de los cilindros de manzana, tras su desinfección, se conservaron en el interior de tubos de ensayo a 10ºC durante 6 días, para estudiar el efecto durante su conservación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 12 productos ensayados, 6 de ellos (carbonato de sodio y potasio, bicarbonato de sodio y potasio, chitosan y bromelaina a las 3 dosis ensayadas) no redujeron la población de *Salmonella* en manzana cortada tras el lavado mediante inmersión durante 1 min, por lo que fueron descartados. La reducción media obtenida tras el lavado con agua fue de 0.3 unidades logarítmicas, y con la solución de hipoclorito sódico fue de 1.0. Las reducciones obtenidas con las 3 dosis de carvacrol y vainillina ensayadas no fueron significativamente distintas ($P<0.05$) a las obtenidas con el agua. Las reducciones obtenidas con el H2O2 0.5%, 1%, 2%, NAC 1%, PAA 80 y 120 ppm fueron > 2 unidades logarítmicas. Excepto en los tratamientos con vainillina y PAA, la población de *Salmonella* en manzana cortada conservada a 10ºC se mantuvo los tres primeros días (Figura 1) y después aumentó ligeramente. Algunos estudios han indicado que el aumento de los patógenos tras la desinfección se debe a la reducción de la flora competitiva o a la degradación de estos productos durante la conservación. En manzana lavada con vainillina 80 mM o bien con NAC 1%, la población de *Salmonella* se redujo durante la conservación. Además, en el agua de lavado de los tratamientos de PAA, H2O2, Citrox y hipoclorito no hubo presencia de *Salmonella*, con lo que se previene de contaminaciones cruzadas de producto. Cabe destacar también que el NAC también tiene efecto antioxidante (Rojas-Grau et al., 2006).

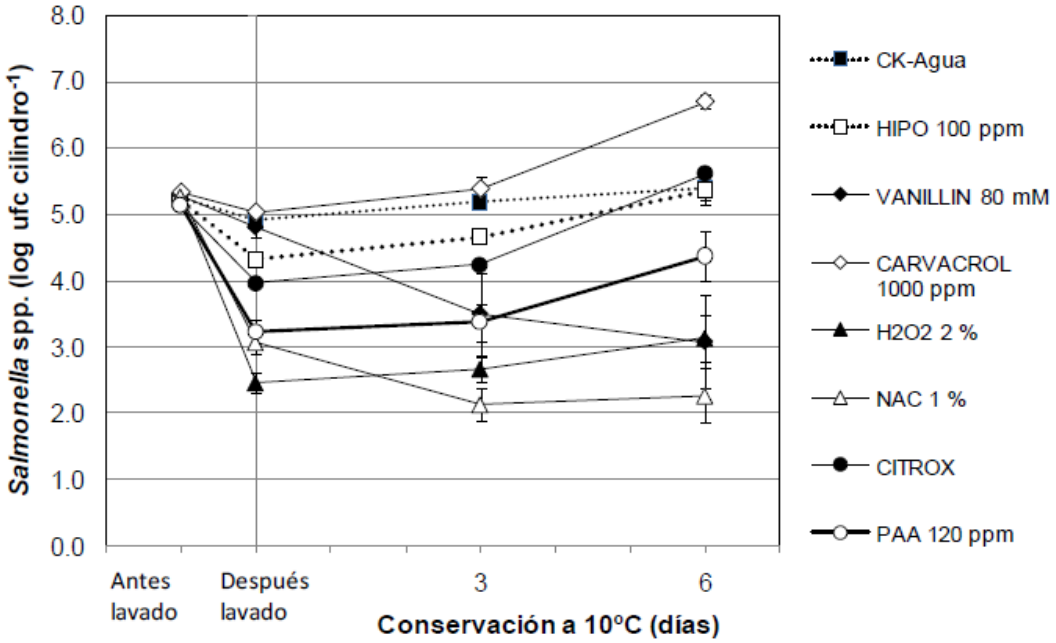


Figura 1. Efecto de distintos tratamientos sobre la población de *Salmonella* en man-zana fresca cortada artificialmente inocula-da y conservada a 10ºC.

CONCLUSIONES

Algunos de los tratamientos ensayados como el PAA, el H2O2 y el NAC podrían utilizarse como alternativas al hipoclorito sódico para la desinfección de manzana mínimamente procesada, ya que no solo redujeron la población después del tratamiento sino que también la mantuvieron durante la conservación, incluso a temperaturas abusivas (10 ºC). Además estos tratamientos también prevendrían contaminaciones cruzadas, ya que en el agua de lavado se eliminó totalmente. Estos productos están considerados como respetuosos con el medio ambiente. Futuros estudios incluyen la evaluación de estos tratamientos sobre otros patógenos, sobre la microbiota natural propia y su efecto en la calidad, principalmente nutricional y sensorial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alegre I, Abadias M, Anguera M, Oliveira M, Viñas I. 2010. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. Food Microbiol. 27: 70-76.

Alegre I, Abadias M, Anguera M, Viñas I. 2010. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria innocua* on minimally-processed peaches under different storage conditions. Food Microbiol., in press.

Rojas-Grau MA, Sobrino-Lopez A, Tapia MS, Martin-Belloso O. 2006. Browning inhibition in fresh-cut 'Fuji' Apple slices by natural antibrowning agents. J. Food Sci. 71: S59-S65.

P201 ELIMINACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE ALTAS PRESIONES HISROSTÁTICAS EN PATATA PRECOCIDA

Ana Belén Cano Nuño y David Rodríguez-Lázaro
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Carretera de Burgos km 119 s/n, 47071, Valladolid.
Ita-rodlazda@itacyl.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La evolución de nuevos hábitos alimenticios hacia alimentos con un mínimo procesado y unas características higiénico-sanitarias hace que las industrias busquen nuevos métodos de conservación de los alimentos. Unos de estos métodos es el tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas basado en el principio de Le Chatelier y el principio Isostático.

El objetivo de este estudio es la evaluación del tratamiento de Altas Presiones Hidrostáticas como método para la eliminación de *Listeria monocytogenes* en patata precocidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

25 gramos de patatas precocidas fueron inoculadas, por triplicado, con 4 concentraciones diferentes de la cepa *Listeria monocytogenes* CECT 911 y seguidamente fueron envasadas en bolsas multicapa coextruida alta barrera. Cada muestra fue tratada en un ciclo de 6000 bares 5 minutos utilizando la unidad presurizadora hidrostática discontinua modelo Wave 6000/135 (NC Hyprbaric).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos aparecen el la siguiente tabla.

Tabla. Resultados obtenidos con muestras inoculadas con *Listeria monocytogenes* antes y después del tratamiento de altas Presiones Hidrostáticas.

Antes de HHP UFC/muestra	log UFC/muestra	Después de HPP UFC/muestra	log UFC/muestra	Reducción (log)
$2{,}25 \times 10^3$	3,35	0,00	0,00	3,35
$1{,}80 \times 10^4$	4,26	0,00	0,00	4,26
$2{,}75 \times 10^4$	4,44	0,00	0,00	4,44
$1{,}00 \times 10^7$	7,00	50-75	1,70	5,4

Se puede comprobar la efectividad de la aplicación del método de Altas Presiones Hidrostáticas para la reducción de los niveles de *Listeria monocytogenes* en muestras alimentarias. En muestras con contaminaciones hasta 10^3 ufc de *Listeria monocytogenes* por g, se observa una completa eliminación. Estos resultados son de especial relevancia, ya que estos niveles de contaminación son los que normalmente se encuentran en la Industria Alimentaria. En niveles de contaminación superiores (10^7 UFC por 25 gramos de muestra) aunque no hay una reducción total de los niveles microbiológicos, se observa una notable reducción de más de 5 unidades logarítmicas.

CONCLUSIONES

El tratamiento de productos listos para el consumo, como p.ej. patatas precocidas, mediante la tecnología de altas presiones hidrostáticas es un procedimiento eficiente para la reducción de *L. monocytogenes*, y puede considerarse como totalmente efectivo en las concentraciones que este patógeno generalmente se suele encontrar en la Industria alimentaria

P206 COMBINACIÓN DE ALTAS PRESIONES Y BIOCONSERVANTES EN LA ELIMINACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN JAMÓN CURADO LONCHEADO

María de Alba, Daniel Bravo y Margarita Medina
Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. de La Coruña km 7, 28040, Madrid
de-alba.maria@inia.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El jamón curado lonchado es un alimento listo para el consumo que puede contaminarse durante su preparación. Entre los tratamientos higienizantes, las altas presiones se emplean en una amplia variedad de alimentos entre los que se encuentran los productos cárnicos loncheados. La aplicación de tratamientos combinados de altas presiones y bioconservantes ha sido propuesta como estrategia para incrementar la seguridad microbiológica de los alimentos y reducir la severidad de los tratamientos individuales. El objetivo del presente trabajo es conocer el efecto de diferentes tratamientos de alta presión en combinación con dos bioconservantes comerciales, sobre los niveles de *Escherichia coli* O157:H7 en jamón curado lonchead tras los tratamientos y durante la conservación del producto en condiciones de abuso de temperatura (8º C), así como evaluar los cambios producidos en el pH, la actividad de agua (a_w), la textura y el color del jamón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se inoculó jamón curado lonchead con la cepa *E. coli* O157:H7 CECT 4972 a aproximadamente 10^6 ufc/g. Las muestras se envasaron a vacío y se mantuvieron durante 24 h a 4º C para facilitar la adhesión del patógeno. Por otra parte, se prepararon lonchas de jamón sin inocular para las determinaciones de aerobios totales, pH, a_w, textura y color.

Se aplicaron tratamientos individuales de alta presión a 400 y 500 MPa durante 10 min, de los bioconservantes Fargo 37 (0.6 %) y nisina (100 IU/g) y tratamientos combinados de alta presión y bioconservantes. En los tratamientos combinados, los bioconservantes se añadieron al jamón antes del tratamiento de altas presiones. La presurización se realizó a 12º C en un equipo de 3.5 L de capacidad (ACIP 6000, ACB). Tras la aplicación de los tratamientos, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 8º C durante 60 d. El ensayo se realizó por duplicado.

Se efectuaron recuentos de *E. coli* O157:H7 en placas de VRBA y TSYEA incubadas 24 h a 37º C. En las muestras no inoculadas se determinó el contenido en aerobios totales en placas de TSA incubadas 72 h a 30º C. Los análisis microbiológicos se realizaron inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos, y a las 8 h y a los 1, 7, 15, 30, 45 y 60 d de refrigeración a 8º C.

Se determinó el pH por duplicado en homogeneizados en agua de jamón previamente desgrasado. La a_w se analizó por duplicado en los músculos *Quadriceps femoris* y *Biceps femoris*. Los análisis de textura se realizaron con un equipo Instron 4301 y las celdas Warner-Bratzler y Kramer, mediante tres medidas por músculo. El color se analizó con un espectrofotómetro CM 700d determinándose los valores de *L** (luminosidad), *a** (tendencia al rojo) y *b** (tendencia al amarillo) mediante seis medidas por músculo. Los análisis se realizaron los días 1, 30, 45 y 60 de refrigeración a 8º C.

Los resultados se sometieron a análisis de varianza con el programa SPSS Win 12.0 considerando el tratamiento y el tiempo de refrigeración como efectos principales. La comparación de medias se efectuó con el test de Tukey con un nivel de significación de $P<0.05$ utilizando el mismo programa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) en jamón curado lonchado tras la aplicación de los tratamientos y durante los 60 d de conservación a 8º C se recogen en la siguiente tabla:

	Control	400 MPa	500 MPa	Fargo	Nisina	400 MPa + Fargo	400 MPa + Nisina	500 MPa + Fargo	500 MPa + Nisina
0 h	6.13^{b}	5.88^{c}	4.85^{e}	6.10^{b}	6.42^{a}	5.96^{c}	4.81^{e}	5.03^{d}	4.32^{f}
8 h	6.25^{a}	5.39^{b}	4.90^{c}	6.08^{a}	6.22^{a}	5.36^{b}	5.21^{b}	4.79^{c}	4.28^{d}
1 d	6.16^{a}	4.44^{c}	4.07^{ef}	6.13^{a}	6.20^{a}	5.03^{b}	4.31^{cd}	4.22^{e}	4.00^{f}
7 d	6.27^{a}	3.47^{de}	3.54^{de}	5.97^{ab}	5.86^{b}	3.40^{e}	3.73^{cd}	3.98^{c}	3.01^{f}
15 d	5.93^{a}	3.16^{c}	2.99^{c}	5.75^{a}	5.99^{a}	3.23^{bc}	3.18^{c}	3.47^{b}	2.55^{d}
30 d	5.93^{a}	2.94^{d}	2.71^{d}	5.67^{b}	6.00^{a}	3.25^{c}	3.37^{c}	2.94^{d}	2.12^{e}
45 d	5.66^{a}	2.93^{bc}	2.29^{d}	5.97^{a}	5.69^{a}	3.27^{b}	2.00^{d}	2.69^{c}	2.11^{d}
60 d	5.70^{a}	2.18^{cd}	2.61^{bc}	5.57^{a}	5.38^{a}	3.29^{b}	2.74^{bc}	2.63^{bc}	1.81^{d}

^{a,b,c,d,e,f} Los valores de la misma fila con distinto superíndice son significativamente (P<0.05) diferentes

Tras la aplicación de las altas presiones a 400 y 500 MPa se comprobaron reducciones en los niveles de *E. coli* O157:H7 de 0.25 y 1.28 log ufc/g, respectivamente. Los bioconservantes no afectaron a los niveles del patógeno. Con los tratamientos de 400 y 500 MPa en combinación con nisina se consiguió una reducción de 1.32 y 1.81 log ufc/g, ligeramente superior en ambos casos a la suma de la observada con la aplicación de los tratamientos individuales.

Durante el periodo de refrigeración a 8º C, los niveles de *E. coli* O157:H7 en jamón curado no tratado decrecieron únicamente 0.43 log ufc/g. Esta disminución fue muy superior en las muestras presurizadas, con niveles después de 60 d de refrigeración 3.70 y 2.24 log ufc/g inferiores a los detectados inmediatamente después del tratamiento en jamón presurizado a 400 y 500 MPa, 2.67 y 2.07 log ufc/g inferiores en jamón presurizado a 400 MPa en presencia de Fargo y nisina, y 2.40 y 2.51 log ufc/g inferiores en jamón presurizado a 500 MPa en presencia de Fargo y nisina. A los 60 d de conservación a 8ºC, el efecto antimicrobiano del tratamiento combinado de alta presión a 500 MPa y nisina frente a *E. coli* O157:H7 fue superior a la suma de los efectos individuales de los tratamientos.

Se observaron valores de pH superiores (P<0.001) en el jamón tratado, que disminuyeron (P<0.001) con el tiempo de refrigeración. También los valores de a_w aumentaron por efecto del tratamiento (P<0.001) y del tiempo de conservación (P<0.05) a 8º C. En cuanto a la textura, se registraron valores inferiores en la fuerza al corte determinada con la celda Warner-Bratzler en el jamón tratado con respecto al control no tratado, tras la aplicación de los tratamientos, mientras que con la celda Kramer se observaron valores similares en la fuerza máxima después de los tratamientos, que aumentaron con el tiempo de refrigeración en las muestras tratadas. Los valores de L^* (P<0.001) y a^* (P<0.05) también resultaron afectados por los tratamientos. A los 30 y 45 d de refrigeración se registraron valores más altos de L^* y ligeramente más bajos de a^*en el jamón tratado, mientras que el parámetro b^* no resultó afectado.

CONCLUSIONES

La aplicación de altas presiones a 400 y 500 MPa durante 10 min resultó muy eficaz en la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 inoculado en jamón curado loncheado. Los tratamientos con bioconservantes no afectaron a la supervivencia del patógeno. Sin embargo, mediante altas presiones combinadas con nisina se consiguió una reducción ligeramente superior a la observada con la suma de los efectos individuales. La alta presión modificó algunos aspectos de la calidad del jamón, afectando levemente a la textura y al color del producto. Considerando que los niveles de contaminación esperables durante el procesado son bajos, y que el jamón curado es un producto estable por sus condiciones físicoquímicas, la reducción de *E. coli* O157:H7 alcanzada con los tratamientos de alta presión se considera muy efectiva.

ENOLOGÍA

COMUNICACIONES ORALES

O114 SELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS AUTOCTONAS DE LA COMUNIDAD DE MADRID PARA LA MEJORA AROMÁTICA DE VINOS ECOLÓGICOS

Tania Balboa-Lagunero[1*], *Teresa Arroyo*[1], *Juan M. Cabellos*[1] *y Margarita Aznar*[1,2]

[1]*Departamento de Agroalimentación, Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Finca "El Encín" A2 Km 38,2, Alcalá de Henares, 28800, Madrid*

tania.balboa@madrid.org

[2]*Departamento de Química Analítica, grupo GUIA, I3A, CPS, Universidad de Zaragoza, Mª de Luna 3, 50018, Zaragoza*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Tradicionalmente la elaboración de vino se ha realizado utilizando cepas de levaduras procedentes de la superficie de las uvas y del ambiente de las bodegas. Este tipo de vinificaciones con las levaduras presentes de forma natural garantizan una mayor tipicidad del vino, pero el uso de levaduras seleccionadas aporta una mayor estandarización del proceso; ofreciendo a su vez, la elección de características determinadas deseables *(1,2)*.

La limitación en las dosis de empleo del antiséptico y antioxidante dióxido de azufre (SO_2) permitidas en la elaboración de los vinos ecológicos favorece la tendencia a la oxidación y conlleva a la disminución de su calidad organoléptica. A su vez, la concentración de aminoácidos en el mosto es un factor decisivo en la formación de aromas, encontrándose diferencias significativas en los niveles de algunos volátiles importantes para la calidad organoléptica del vino *(3)*. Los estudios de Escudero *et al. (4)* y Silva Ferreira *et al. (5)* han determinado que compuestos tales como el metional y el fenilacetaldehído, asociados a la oxidación de los vinos blancos, podían ser sintetizados bien por peroxidación directa de sus alcoholes, o bien por degradación vía Strecker de sus aminoácidos de origen; apuntando a la degradación vía Strecker como vía principal de formación.

Este trabajo se ha centrado en la selección de cepas de la colección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas de la D.O. "Vinos de Madrid" existente en el IMIDRA cuyo metabolismo minimice la producción de aminoácidos precursores de aromas negativos *(6)* y produzcan niveles bajos de SO_2, para no sobrepasar los niveles admitidos en la elaboración de los vinos ecológicos.

Se realizaron microvinificaciones a escala de laboratorio en mosto artificial y en un mosto base natural. Se determinaron los niveles de SO_2, de aminoácidos diferentes y se analizaron los compuestos volátiles producidos tras la fermentación alcohólica y a diferentes tiempos tras un periodo de evolución a temperatura ambiente y aireación regular.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Levaduras: Se utilizaron 21 cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*. 16 autóctonas de la D.O. "Vinos de Madrid" de la colección del IMIDRA preseleccionadas por su óptima calidad enológica y 5 cepas comerciales. Todas estas levaduras fueron genotipadas mediante PCR múltiple de microsatélites (*7*).
- Fermentaciones: Se realizaron fermentaciones en el laboratorio en mosto sintético MS-300 con las 21 cepas de levaduras. Las condiciones de temperatura, agitación y aireación fueron controladas a lo largo de toda la fermentación. Posteriormente se seleccionaron 5 cepas autóctonas de la colección del IMIDRA en base a la concentración de aminoácidos y SO_2 y se ensayaron individualmente mediante el mismo procedimiento de fermentación sobre mosto natural de uva blanca de la variedad Palomino esterilizado por filtración. Los ensayos se realizaron por triplicado.
- Análisis de aminoácidos: Se analizaron las concentraciones de 20 aminoácidos siguiendo el método publicado por Hernández-Orte *et al. (8)* mediante HPLC con detección de fluorescencia y prederivatización de las muestras con el sistema AccQ-Fluor™.
- Análisis de SO_2: Se determinó la cantidad total de SO_2 presente en las muestras de cada fermentación mediante la utilización de un método fotométrico basado en la actividad enzimática de la sulfito-oxidasa y la NADH-peroxidasa, con el kit de Sulfito de Roche®.
- Análisis de compuestos volátiles: Se realizó la cuantificación mediante extracción líquido-líquido con diclorometano y posterior análisis de los microextractos por GC-FID siguiendo el protocolo publicado por Ortega *et al. (9)*. La toma de muestras se realizó al finalizar la fermentación alcohólica y a tiempos de 1 y 3 meses de evolución a temperatura ambiente y aireación regular, para simular un proceso de oxidación natural.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron resultados satisfactorios respecto a los principales parámetros de estudio (concentración de aminoácidos precursores de aromas de oxidación metionina y fenilalanina y contenido en SO_2) en las microvinificaciones. Ambos parámetros condujeron a la selección de cinco cepas de levaduras entre las 21 ensayadas. Dos cepas (CLI 706 y CLI 542) mostraron buenos resultados en cuanto a niveles concentración de metionina y fenilalanina. La cepa CLI 275 consumía mucha metionina. La menor concentración de fenilalanina correspondió a la cepa CLI 87. Aunque todos los valores de concentración de SO_2 fueron en general bajos, manteniéndose muy por debajo de los límites permitidos en vinos ecológicos, la cepa CLI 271 fue la que mostró menor contenido final en SO_2.

Tras los ensayos realizados en mosto natural, entre las cinco cepas preseleccionadas, se eligieron dos cepas como óptimas, en cuanto a la reducción de metionina y fenilalanina (CLI 271 y CLI 87); observándose además, que la cepa CLI 87 mostraba los niveles de SO_2 más bajos registrados en el estudio. Esta cepa ha mostrado propiedades floculantes, lo que la hace fácilmente separable del medio, siendo ésta una propiedad de utilidad para la elaboración de vinos espumosos.

De los resultados del análisis de componentes principales (PCA) se observa una clara direccionalidad y agrupación de las muestras en función de su estado de oxidación. Las muestras más evolucionadas presentan concentraciones mayores de compuestos tales como furfural, benzaldehído, lactato de etilo, succinato de dietilo, γ-butirolactona y propanol. Las muestras procedentes de las cepas CLI 87 y CLI 271 con resultados muy similares entre si, presentan valores más bajos para estos compuestos, lo que indica una menor "degradación". A su vez, se ha podido observar que compuestos como el metionol y el feniletanol estaban en menor concentración en las muestras más evolucionadas, probablemente debido a su degradación hacia compuestos de oxidación, tales como el metional y el fenilacetaldehído.

CONCLUSIONES

Se han identificado y seleccionado dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas de la D.O. "Vinos de Madrid" en base a su comportamiento respecto a dos aminoácidos precursores de compuestos de oxidación: metionina y

fenilalanina. La disminución de estos aminoácidos y la menor oxidación de los vinos, contrastada por el análisis de su composición aromática, hace pensar en su aplicación en un futuro a bodegas comerciales. No obstante, se requeriría previamente realizar ensayos en bodega piloto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
(1) Carrascosa, A.V.; Muñoz, R.; González, R. *Microbiología del vino*. AMV ediciones: Madrid, 2005; 19-56.
(2) Zironi R. *Vignevini* 1999, 10, 48-50.
(3) Hernardez-Orte, P. Cacho, J.F.; Ferreira, V. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2891-2899.
(4) Escudero, A.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4268-4272.
(5) Silva Ferreira, A.; Guedes de Pinho, P.; Rodrigues, P.; Hogg, T. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5919-5924.
(6) Martinez-Rodriguez A.J.; Carrascosa A.V.; Martín-Alvarez P.J.; Moreno-Arribas V.; Polo MC. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 29, 314-322.
(7) Vaudano, E.; García-Moruno, E. Food Microbiol. 2008, 25, 56-64.
(8) Hernandez-Orte, P.; Ibarz, M.J.; Cacho, J.; Ferreira, V. *Chromatographia* 2003, 57, 1-7.
(9) Ortega, C.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Chromatogr. A* 2001, 923, 205-214.

O165 ADAPTACIÓN DE LA LEVADURA VÍNICA A LAS BAJAS TEMPERATURAS: IMPORTANCIA DEL METABOLISMO LIPÍDICO

María López[1,2], Marián Redón, Nicolas Rozès[2] y José M. Guillamón[1,2]
[1]Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC), Avda. Catedrático Agustín Escardino 7, 46980 Paterna (Valencia).
aguli@iata.csic.es
[2]Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·li Domingo s/n, 43007, Tarragona.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fermentación a baja temperatura se está convirtiendo en una práctica enológica frecuente ya que permite acentuar el perfil aromático en vinos blancos y rosados. Se ha observado que la fermentación a bajas temperaturas (10-15 ºC) no solo incrementa la retención sino también la producción de algunos componentes volátiles [1]. A pesar de las ventajas asociadas a la fermentación a baja temperatura, esta baja temperatura produce fermentaciones muy lentas y con posibles paradas.

Un mecanismo que se observa en la levadura como respuesta al frío es la adaptación de la fluidez de la membrana. El objetivo de este trabajo es realizar un "screening" de los mutantes de la cepa *BY4742* en las rutas de síntesis de los lípidos, estudiando el crecimiento de las levaduras tanto en medio solido como líquido, a 28 ºC y 12 ºC. A partir de los resultados obtenidos, seleccionar aquellos genes cuyo fenotipo del mutante sea diferente al control a 12 ºC pero no a 28 ºC. De los genes seleccionados se han construido cepas mutantes en un derivado haploide de una levadura industrial, *QA23*. Un análisis fenotípico exhaustivo de estos mutantes pone de manifiesto aquellos genes con importancia capital en la adaptación a la baja temperatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

"Screening" de los mutantes de la cepa BY4742. Las cepas utilizadas para realizar el "screening" fueron los mutantes de la cepa *BY4742* de las rutas de síntesis de los fosfolipidos, esteroles y esfingolipidos. De estos mutantes se determinó el tiempo de duplicación y el crecimiento en medio sólido.

Construcción de las cepas. La cepa utilizada en la construcción de los mutantes fue el derivado haploide de la cepa comercial QA23 de *S.cerevisiae* (Lallemand S.A., Toulouse, Francia) construida en nuestro laboratorio. A partir de esta cepa se construyeron las cepas mutantes de los genes seleccionados en el "screening". Los genes fueron eliminados mediante la substitución por un "casette de delección" que presenta en sus extremos secuencias cortas homólogas a las del gen a eliminar y una resistencia al antibiótico geneticina [3]. El cassette fue amplificado por PCR, el cual se utilizó para transformar la cepa haploide usando el protocolo de transformación mediante acetato de litio [4]. Los transformantes se seleccionaron por resistencia a G418 geneticina. Aquellos que presentaron resistencia fueron analizados por PCR.

Análisis del fenotipo de las cepas construidas. A partir de un cultivo de YPD se inoculo de cada cepa una concentración celular de 0,2 de O.D en un volumen de 250µl de medio mínimo, utilizando una placa microtiter. El tiempo de duplicación se calculó midiendo la O.D a 600nm durante la fase exponencial del crecimiento utilizando el lector de placas (SPECTROstar, Omega). Los goteos se realizaron en placas de medio mínimo a partir de un cultivo de YPD siguiendo el mismo procedimiento con el que se realizaron los goteos para la cepa de *BY4742*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

"Screening" de los mutantes de la cepa BY4742. En los goteos en medio mínimo podemos observar que no todos los mutantes resisten igual al control las bajas temperaturas (Figura 1).

Los resultados obtenidos en el tiempo de duplicación muestran que el crecimiento de ciertos mutantes se ven afectados tanto a 12 ºC como a 28 ºC mientras que otros solo se ven afectados a 12 ºC.

Análisis del fenotipo de las cepas construidas. Los goteos y el tiempo de duplicación en los mutantes construidos mostraron el mismo resultado. Aquellas cepas que crecían peor a 12 ºC en medio sólido crecían también peor en medio líquido. En la tabla 1 se muestran los resultados del tiempo de duplicación de aquellos mutantes en los que se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control a 12 ºC.

Figura 1. Ejemplo de dos cepas mutantes que empeoran su crecimiento respecto al control BY4742.

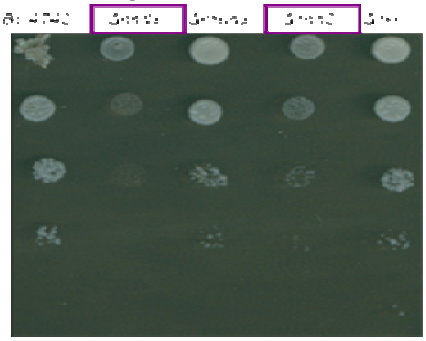


Tabla 1: Tiempo de duplicación de las cepas construidas que mostraron diferencias respecto al control (cepa hoQA23) a 12 ºC.

Cepa	28ºC	12ºC
Δcho2	4,63 ± 1,77 *	No crece *
Δopi3	3,28 ± 0,28 *	40,63 ± 5,69 *
Δgde1	2,57 ± 0,21	14,55 ± 0,57 *
Δpsd1	6,15 ± 0,25 *	64,06 ± 9,72 *
Δsct1	2,57 ± 0,16	13,89 ± 0,15 *
Δerg3	2,69 ± 0,06	29,88 ± 0,52 *
Δerg6	2,82 ± 1,19	19,14 ± 0,46 *
Δerg24	2,61 ± 0,16	14,40 ± 0,68 *
Δdpl1	2,72± 0,17	19,67 ± 0,74*
Δlcb3	2,84 ± 0,13 *	18,94 ± 0,96 *
hoQA23	2,60 ± 0,12	15,94 ± 0,60

CONCLUSIONES

El metabolismo lipídico tiene una gran importancia en la adaptación de la levadura vínica en su capacidad a crecer y fermentar a bajas temperaturas. Mediante el "screening" previo en la levadura de laboratorio BY4742 y la posterior construcción de cepas mutantes en estos genes en el derivado vínico, hemos detectado aquellos genes claves para dicha adaptación. El siguiente paso, ya bastante avanzado en nuestro laboratorio, es la construcción de cepas que sobre-expresen dichos genes, y, confiamos, obtener cepas con crecimiento mejorado y mayor actividad fermentativa a baja temperatura. Este es el primer paso para la obtención de cepas mejoradas respecto a esta característica, que puedan ser utilizadas en un futuro en la industria enológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Beltran,G., Novo,M., Leberre,V., Sokol,S., Labourdette,D., Guillamón,J.M, Mas,A., François,J. y Rozes,N. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. FEMS Yeast Res, 1167-1183.

[2] Güldener,U., Heck,S., Fiedler, T., Beinhauer,J. y Hegemann,J.H (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acid Research, 2519-2524.

[3] Gietz y Robin A.Woodsl (1998) Transformation of Yeast by the Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier DNA/PEG Method. Methods in Microbiology, 53-66.

AGRADECIMIENTOS:

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto del plan nacional AGL2007-65498-C02-02/ALI del Ministerio de Ciencia e Innovación.

O204 DISTRIBUCION DE CLONES DE *OENOCOCCUS OENI* AISLADOS DE VINOS TINTOS DE LA D. O. CA. RIOJA.

Lucía González, Rosa López, Pilar Santamaría, Patrocinio Garijo, Carmen Tenorio e Isabel López **

Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agroalimentario (CIDA). Ctra. Mendavia-Logroño,(NA-134) Km 88 Tf: 941-291383. ICVV (Gobierno de La Rioja- CSIC- Universidad de La Rioja).

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La elaboración del vino es básicamente el resultado de la acción secuencial de levaduras (fermentación alcohólica, FA) y bacterias lácticas (BL) fermentación maloláctica. Tradicionalmente, la FML se ha llevado a cabo por la microbiota espontánea de bacterias que acompañan a la uva y al vino. Diversos estudios [3] [6] han puesto de manifiesto la importancia del género *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) en el desarrollo de dicho proceso, así como han demostrado que la resistencia de las BL a las condiciones del vino y su influencia sobre las calidades organolépticas dependen de la cepa bacteriana [2]. Por lo tanto, es importante conocer la diversidad clonal de las cepas de *O. oeni* responsables de las FML de los vinos tintos de Rioja puesto que son ellas las que aportan tipicidad a nuestros vinos. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la diversidad clonal del género *O. oeni* en vinos tintos de la D.O.Ca. Rioja, en las tres subzonas que abarca la denominación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en 11 bodegas de la D. O. Ca. Rioja durante dos vendimias consecutivas y con uva de la variedad Tempranillo. Se seleccionó un depósito en cada bodega y se tomaron muestras en 4 momentos a lo largo de todo el proceso de elaboración: fin de FA, inicio de FML, FML tumultuosa (degradación del 60% de ácido málico) y fin de FML. El seguimiento de la FML se realizó mediante determinación del ácido málico utilizando un test enzimático. Las muestras recogidas en frascos estériles, fueron trasladadas al laboratorio y sembradas en MRS agar modificado al que se le añadió pimaricina para inhibir el crecimiento de levaduras. Se incubaron a 30ºC durante 10 días en condiciones de anaerobiosis. Se aislaron 15 colonias al azar, y posteriormente se llevó a cabo su identificación a nivel de especie y clon.

La identificación de las BL viables a nivel de especie se realizó mediante técnicas de microbiología clásica [4], PCR específica de especie [7] y secuenciación del un fragmento del rRNA 16S [5]. La caracterización a nivel de clon se realizó mediante electroforesis por campos pulsantes (PFGE) [1] utilizando dos enzimas de restricción (*Sfi*I y *Apa*I) y el sistema CHEF-DR III de BioRad. Los perfiles electroforéticos así obtenidos fueron analizados con el programa FP Quest™ (BioRad) utilizando el coeficiente de similitud de Pearson.

RESULTADOS

En los muestreos realizados durante el proceso de elaboración se aislaron un total de 946 cepas, de las cuales 841 pertenecieron a la especie *O. oeni*. La tipificación de estas cepas de *O. oeni* mediante PFGE utilizando las dos enzimas de restricción permitió obtener un total de 101 perfiles distinguibles. Se observó que en todas las fermentaciones, los clones mayoritarios que dirigen la FML estuvieron presentes desde el inicio hasta el final del proceso. De los 101 clones identificados, 10 se aislaron en más de tres bodegas de la D.O.Ca. Rioja. Los perfiles electroforéticos de estos 10 clones se muestran en la Figura 1 donde también aparece el dendrograma de similitud, obtenido utilizando el coeficiente de similitud de Pearson.

Al estudiar la distribución clonal en cada bodega, se observó que en todas menos en una, hubo al menos un clon que apareció en las dos vendimias estudiadas, pero en bajos porcentajes. Al estudiar la distribución geográfica en la D.OCa. Rioja, solo un clon (clon 10) apareció en 8 de las 11 bodegas.

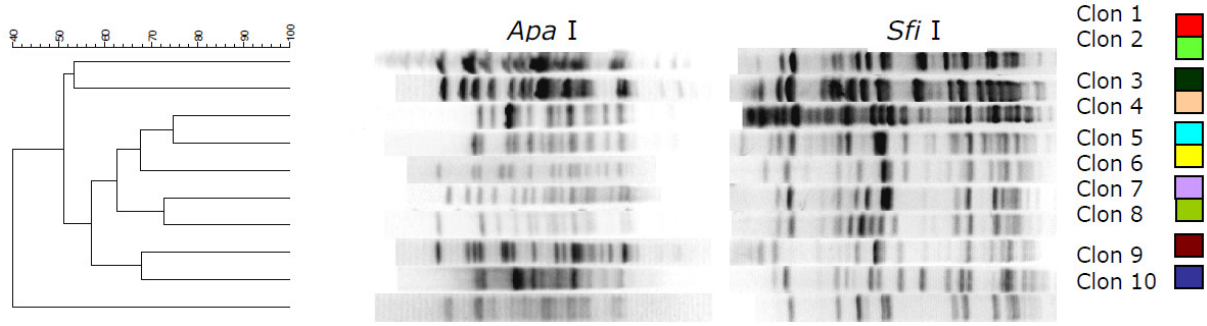


Figura 1. Perfiles de PFGE y dendrograma de similitud de los 10 clones que aparecieron en más de tres bodegas.

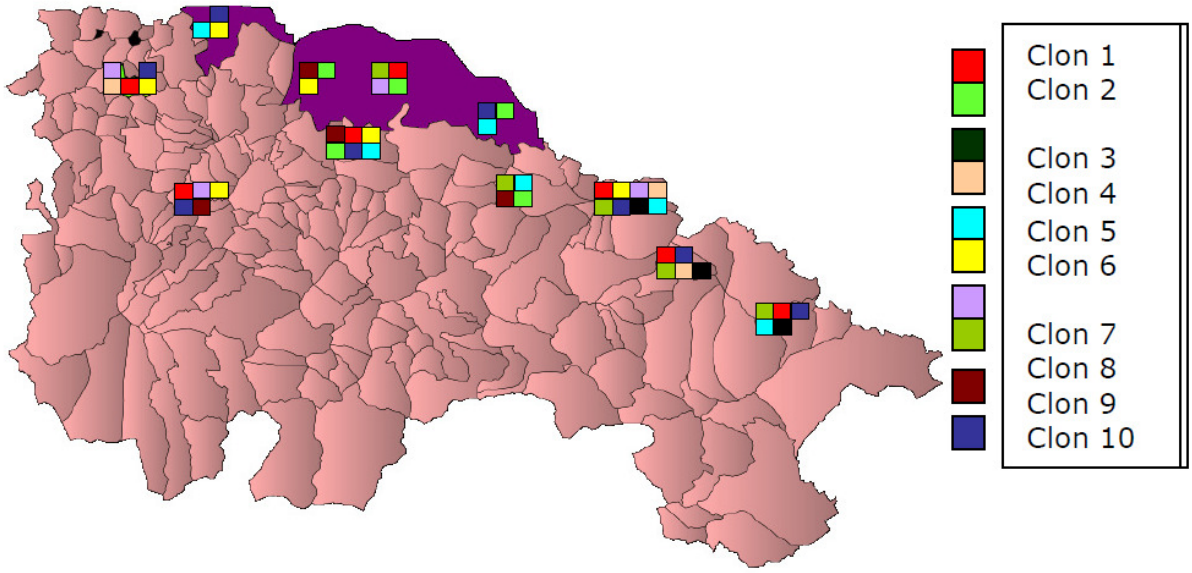


Figura 2. Distribución geográfica de los clones de Oenococcus oeni en las 11 bodegas estudiadas de la D.O.Ca Rioja.

En la Figura 2 puede observarse la distribución de estos 10 clones en la D.O.Ca. Rioja. Su porcentaje de aparición varió dependiendo del año y la bodega. El clon 10 apareció en 8 de las 11 bodegas estudiadas representando un total de 47 aislados.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que la FML espontánea en la D.O.Ca. Rioja estuvo dirigida mayoritariamente por *O. oeni*, observándose una moderada diversidad clonal, lo cual indicó la presencia de una microbiota adaptada a las condiciones de la bodega en cada campaña.

Excepto en una bodega de las 11 estudiadas, hubo sólo una cepa que se encontró en las dos vendimias aunque en porcentajes bajos.

Se detectó un grupo de cepas comunes que aparecieron en varias bodegas a lo largo de la denominación, pero cuya participación en la FML fue variable, en función de la bodega y el año.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
[1] Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N. (1997). Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. Current Microbiology 34: 226-229
[2] Britz, TI., Tracey RP. (1990). The combination effect of ph, SO_2, ethanol and temperature on the growth of *leuconostoc oenos*. J. Applied Bacteriol 68: 23-31.
[3] Dicks L.MT:, Dellaglio, F., Collins MD. (1995). Proposal of reclassify Leuconostoc oenos as Oenococcus oeni [corri.]gen.nov., comb. Nov. International journal of Systematic Bacteriology 45:395-397
[4] Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. (2000) Bergey's manual of deterinative bacteriology. W. R. Hensyl (ed.), 9th ed., *Williams and Wilkins, Baltimore, Md.*
[5] López, I.; Ruiz-Larrea, F.; Cocolin, L.; Orr, E.; Phister, T.; Marshall, M.; VanderGheynst, J. & Mills, D.A. (2003). Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69 6801-6807.
[6] Wibowo D., Davis CR:, Fleet, D., and Lee, TH. (1998). Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. American Journal of Enology and Viticulture. 39: 137-142.
[7] Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. and Dellaglio, F. (1998) Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 27 (5): 243-246.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto RTA2007-00104-00-00 con fondos INIA-FEDER

POSTERS

P68 ESTUDIO DE LEVADURAS IMPLICADAS EN FERMENTACIONES ESPONTÁNEAS DE VINOS TINTOS DEL CAMPO DE BORJA

Patricia Irisarri, Cristina Villellas, Isabel Otal y José Antonio Aínsa
Departamento de Microbiología, Universidad de Zaragoza. C/ Domingo Miral s/n, 50009, Zaragoza

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fermentación del mosto es un proceso microbiológico complejo que implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos. Después de tres o cuatro días de fermentación del mosto las levaduras que predominan son del género *Saccharomyces* y son las responsables últimas de la fermentación alcohólica. Para garantizar las características del vino propio de una zona actualmente se tiende a seleccionar cepas autóctonas muy bien adaptadas a la región de donde proceden, en nuestro caso, de la denominación de origen Campo de Borja. Para esta selección se tiene en cuenta una serie de criterios como, por ejemplo, el alto poder fermentativo, alta tolerancia al etanol, fenotipo killer…

Así pues, el principal objetivo de este proyecto es analizar la biodiversidad de poblaciones de levaduras de interés enológico, autóctonas de la zona del Campo de Borja seleccionando aquellas que tengan buenas características enológicas para utilizarlas como cultivos iniciadores en bodegas productoras de vino de esta zona.

MATERIAL Y MÉTODOS

Partimos de una muestra de vino de Bulbuente (Campo de Borja) de 2008 elaborado en una explotación familiar y que llevaba un año embotellado. A partir de aquí se aislaron las levaduras en medios YPD y DRBC, y se seleccionaron 27 aislamientos. La caracterización a nivel molecular se llevó a cabo mediante una extracción del DNA genómico utilizando el método de Querol y col. (1992) y la identificación de género y especie se realizó mediante la amplificación de la secuencia comprendida entre los dominios D1 y D2 del gen del RNA ribosómico 26S (Kurtztman y Robnett, 1998) y su secuenciación. Para el tipado de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó una amplificación de microsatélites mediante una PCR multiplex de dos locus polimórficos mediante primers marcados con distintos fluorocromos siguiendo el artículo de M.A. Pérez y col. (2001) aunque se introdujeron algunas modificaciones en relación a los fluorocromos y a la cantidad de los primers utilizados. La caracterización microbiológica se llevo a cabo mediante tres pruebas: 1) la sensibilidad al factor killer, frente a las cepas K^+R^+ (matadora) y K^-R^-(sensible) cedidas por la profesora C. Torres de la Universidad de La Rioja, 2) el estudio de la tolerancia a etanol, basado en el grado de inhibición de distintas concentraciones de etanol sobre el crecimiento celular en un medio de cultivo YPD liquido y 3) la determinación de azúcares residuales a partir de micro-fermentaciones puras de mosto natural, de uva Cabernet, esterilizado por filtraciones, inoculando la cepa elegida y haciendo el seguimiento de la fermentación midiendo la cantidad de azúcares residuales (Robyt y Whelan, 1972).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 27 aislamientos resultaron ser *Saccharomyces cerevisiae*. Del tipado de éstos, mediante la amplificación de microsatélites obtuvimos los tamaños en pares de bases de los locus amplificados con lo que pudimos hacer los agrupamientos que se muestran en la tabla 1, donde podemos observar que la mayoría de las cepas presentan el mismo patrón.

		Locus amplificado (tamaño en pb)	
Grupo	**Cepa**	**Sc AAT 1**	**Sc AAT 3**
Mayoritario	PY-1, PY-2, PY-3, PY-4, PY-5, PY-6, PY-7, PY-8, PY-9, PY-10, PY-11, PY-12 PY-14, PY-16, PY-17, PY-19, PY-21, PY-23, PY-25, PY-26, PY-27, PY-28	193	247
Minoritarios	PY-13	193	343
	PY-15	192,8	247,1 427
	PY-18	192,6	355,5
	PY-22	193 198,8	247
	PY-24		

Tabla 1. Agrupación según el número de repeticiones de cada locus amplificado.

A partir de este grupo mayoritario procedimos a hacer la caracterización microbiológica. Para la sensibilidad al factor killer todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* eran neutras. Para el estudio de tolerancia a etanol se seleccionaron dos aislamientos pertenecientes al grupo mayoritario PY-5, PY-21 las que nos dieron graficas de crecimiento similares, mostramos en la figura 1 los resultados de crecimiento para la cepa PY-5 a las distintas concentraciones de etanol. A partir de la tasa de crecimiento se calculó el porcentaje de inhibición y los resultados se recogen en la tabla 2.

	Medio				
	YPD	8% EtOH		12% EtOH	
Cepas	Tasa	Tasa	%i	Tasa	%i
PY- 5	0,4003	0,1674	58,18%	0,0347	91,33%
PY- 21	0,3603	0,1503	58,28%	0,037	89,73%

Tabla 2. Porcentajes de inhibición para las distintas concentraciones de etanol y tasas de crecimiento para las dos cepas estudiadas.

Podemos observar que las dos cepas mostraron valores de inhibición muy similares, ninguna de las cepas llegó al 100% de inhibición puesto que las cepas fueron aisladas de vino embotellado con un 12% de etanol. Con todo esto podemos decir que son cepas con carácter alcohol-tolerante.

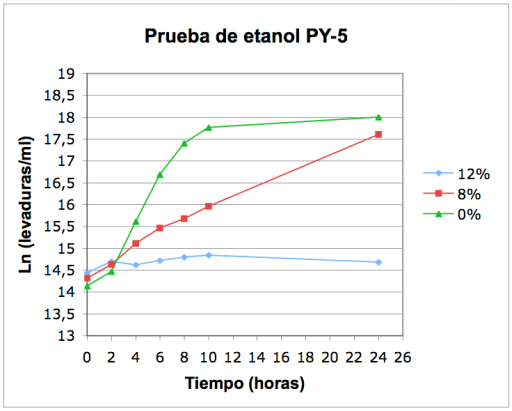


Figura 1. Grafico de crecimiento de la cepa PY-5 para las distintas concentraciones de etanol al 0%, 8% y 12%.

Para la cuantificación de azúcares residuales a partir de fermentaciones puras se partió de un mosto natural esterilizado de uva cabernet con un contenido en azúcares reductores de 290 g/l y se fueron midiendo las concentraciones a distintos tiempos hasta finalizar la fermentación como podemos observar en la figura 2. Calculando así el poder fermentativo de la cepa PY-5 siendo este de 287,05 g/l.

CONCLUSIONES

A partir de estos resultados, podemos concluir que las cepas PY-5 y PY-21 aisladas del grupo mayoritario cumplen algunos de los criterios enológicos deseables para una cepa iniciadora: resistencia a la toxina killer aunque no la produzcan, alta tolerancia a etanol y alto poder fermentativo puesto que el contenido residual de azúcares es muy bajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett (1998). "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences." Antonie Van Leeuwenhoek 73(4): 331-71.

Querol, A., E. Barrio, et al. (1992). "Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains." Appl Environ Microbiol 58(9): 2948-2953.

Perez, M.A., Gallego, F.J., Martínez, I., Hidalgo, P. (2001). "Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers" Letters in Applied Microbiology 33: 461-466

Robyt, J.F, Whelan, W.J. (1972) "Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5- dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper" Anal. Biochem 45(2):510-6.

P77 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS LEVADURAS *Saccharomyces cerevisiae* PRESENTES EN LAS INSTALACIONES, EL AIRE Y LAS FERMENTACIONES DE UNA BODEGA.

Patrocinio Garijo[1], Pilar Santamaría[1], Rosa López[1], Elena Ocón[2], Susana Sanz[2], Carmen Olarte[2], Ana Rosa Gutiérrez[2].

ICVV, Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (Gobierno de La Rioja[(1)], Universidad de La Rioja[(2)], CSIC). Madre de Dios 51, 26006 Logroño. (Spain).

patrocinio.garijo@larioja.org

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El origen de los microorganismos asociados a la vinificación y la vía por la cual llegan hasta el mosto es una cuestión debatida desde hace tiempo. En la actualidad se admite que tienen dos posibles orígenes: la uva y el material de la bodega (Mortimer y Polsinelli, 1999). El suelo, la variedad de uva y las técnicas culturales empleadas pueden influir en el ecosistema microbiano de las uvas (Renouf *et al.*, 2005 y 2006). Las uvas que entran en la bodega tienen una población importante de microorganismos adheridos a la pruina, pero en el equipamiento de la

bodega (tolva, estrujadora, despalilladora, depósitos, etc.) también existen microorganismos y así, las levaduras, las bacterias y los mohos que se encuentran en contacto con estas superficies pasan al mosto y, si las condiciones ambientales lo permiten, comienzan a multiplicarse y a fermentar.

Desde hace años, los bodegueros han venido observando que las primeras fermentaciones espontáneas, que tienen lugar en la bodega cada campaña, suelen ser más largas que las que suceden a continuación (Peynaud, 1989). La razón podría deberse al aumento de microorganismos que se produce en el primer depósito y su posterior diseminación por la bodega. Recientemente, Granchi, *et al.*, (2007), han sugerido que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que dominan la fermentación del primer depósito de cada vendimia, invaden el ambiente de la bodega y producen una inoculación natural en las fermentaciones siguientes. La diseminación de los microorganismos en la bodega tiene lugar por la maquinaria e instrumental de la misma, los insectos y… probablemente el aire.

El objetivo del presente trabajo fue comparar los clones de *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el ambiente (aire) y en las instalaciones de la bodega, con los que llevan a cabo las fermentaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

La toma de muestras se realizó en la Bodega Santos-Montiel de Tudelilla (La Rioja) durante los meses de septiembre a diciembre de 2006. En esta bodega sólo se elaboran vinos tintos y todas las fermentaciones, tanto alcohólica como maloláctica, se llevan a cabo de forma espontánea, sin inoculación con microorganismos seleccionados. Se realizaron muestreos en las instalaciones de la bodega, en los depósitos en fermentación y en el aire. Los muestreos en las instalaciones se llevaron a cabo cinco días antes de la entrada de la primera uva vendimiada en la bodega limpia. La toma de muestras se realizó con un hisopo humedecido en medio TSB sobre una superficie de 9 cm^2 en cada uno de los 10 puntos elegidos (tolva de recepción, despalilladora, estrujadora, bomba de pastas, pared del depósito, boca de salida del depósito, prensa, bomba de trasiego, suelo y pared de la bodega). Una vez iniciadas las vinificaciones, se tomaron muestras en tres depósitos en distintos momentos de la fermentación alcohólica (24 horas después del encubado: IF; fermentación tumultuosa: FT y final de fermentación: FF). El primer depósito muestreado (depósito A) se encubó con la primera uva que entró en la bodega (2 de octubre); el segundo (depósito B) se encubó el 9 de octubre (hacia la mitad de la campaña), mientras que en el tercero (depósito C) la uva procedía de la última vendimia, que se llevó a cabo el 16 de octubre. Simultáneamente a los muestreos realizados en las instalaciones y los mostos en fermentación, se tomaron muestras del aire de la bodega. El muestreo de aire se llevó a cabo con el muestreador de aire airIDEAL 3P, de la casa comercial Biomèrieux, que permite la toma de diferentes volúmenes de aire de forma directa en placas Petri con Cloranfenicol-Glucosa- Agar como medio de cultivo específico, para detectar la presencia de levaduras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar las cepas de *S. cerevisiae* aisladas en el aire de la zona de recepción y elaboración de la bodega con las aisladas simultáneamente en los depósitos en fermentación, y las identificadas previamente en las instalaciones, se encontraron varios clones comunes, lo que vino a confirmar el intercambio de microorganismos entre estos medios (Tabla 1).

CLONES COMUNES					
Aire elaboración	Aire recepción	Instalaciones	Depósito A	Depósito B	Depósito C
I_{T2}	I_{T1}	VI_I	IX_A		XIII_C
IV_{T2}		III_I	I_A	III_B	
VI_{T2}				VIII_B	X_C
VIII_{T2}		II_I	III_A	IX_B	II_C
IX_{T2}				V_B	
XI_{T2}		I_I	X_A	IV_B	
XII_{T2}	IV_{T1}				
XIII_{T2}			XVII_A	X_B	VIII_C
XVI_{T2}				XIII_B	
XVII_{T2}					III_C
XX_{T2}			VI_A	XI_B	IV_C
		V_I		II_B	

Colores iguales indican que se trata del mismo clon de *S. cerevisiae.*

CONCLUSIONES

Cinco de los clones presentes en las instalaciones lo estuvieron también en el aire de la zona de elaboración y en los depósitos en fermentación, lo que indica que se produjo un intercambio de microorganismos entre los tres medios. Por lo tanto en este trabajo se ha puesto de manifiesto que el aire es otra forma de diseminación de los microorganismos dentro de la bodega y causa de inoculación de los depósitos, además de los ya conocidos (insectos, utillaje…).

La técnica de análisis de la calidad microbiológica del aire, que se ha utilizado para el desarrollo de este trabajo, una vez optimizada, podría contribuir al control de procesos y desviaciones microbiológicas durante la elaboración y la conservación de los vinos lo que sería objeto de futuras investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origin of wine yeast. Research in Microbiology 150, 199–204.

Renouf, V., Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A. 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. Aust. J. Grape Wine Res., 11, 316-327

Renouf, V., Strehaiano, P. y Lonvaud-Funel, A. 2007. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. J. Int. Sci. Vigne Vin. 41 : 51-61.
Granchi, L., Augruso, S., Ganucci, D., Vicenzini, M., 2007. Biodiversité genomique de Saccharomyces cerevisiae pendant la fermentation spontanée du vin conditionnée par le progresión de la vendage dans la cave. Proceedings XXXth OIV World Congress, Budapest.
Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., Tenorio, C., López, I., López, R., Santamaría, P. 2010. Quantitative and Qualitative analysis of non-Saccharomyces yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. European Food Research and Technology.(In Press).
Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., 2008. Theoccurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. International Journal of Food Microbiology 125, 141–145.
Garijo, P., López. R., Santamaría, P. Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, A.R., 2009. Presence of lactic bacteria in the air of a winery during the vinification period. International Journal of Food Microbiology 136 (2009) 142–146.

P78 EVOLUCIÓN DE LAS LEVADURAS PRESENTES EN EL AIRE DE DISTINTAS ZONAS DE UNA BODEGA A LO LARGO DE UN AÑO.

Elena Ocón[2], Patrocinio Garijo[1], Pilar Santamaría[1], Rosa López[1], Susana Sanz[2], Carmen Olarte[2], Ana Rosa Gutiérrez[2].
ICVV, Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (Gobierno de La Rioja[(1)], Universidad de La Rioja[(2)], CSIC). Madre de Dios 51, 26006 Logroño. (Spain).
ana-rosa.gutierrez@unirioja.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Recientemente se ha sugerido al "aire" como posible fuente de diseminación y contaminación microbiana en las bodegas (Garijo et al., 2008, 2009). En esos trabajos se detectó que durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica, y principalmente durante la manipulación del mosto/vino, los microorganismos presentes en los depósitos eran expulsados al ambiente y al depositarse podían contaminar otros depósitos cercanos. Granchi *et al.* (2007), han sugerido que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que dominan la fermentación del primer depósito de cada vendimia, invaden el ambiente de la bodega y producen una inoculación natural en las fermentaciones siguientes. La diseminación de los microorganismos en la bodega tiene lugar por la maquinaria e instrumental de la misma, los insectos y probablemente también por el aire. El aire por sí mismo no permite el desarrollo microbiano y sólo actúa como soporte o transporte hasta que el microorganismo cae y se deposita. La tasa de sedimentación de los microorganismos es importante pues determina la tasa de recontaminación de productos o superficies durante el tiempo de exposición. Curiel et al. (2000), indicaron que los microorganismos pueden viajar a través del aire de tres maneras: adheridos a partículas de polvo, a gotas de agua, o como partículas individuales. En las bodegas, en función de las condiciones climáticas de la época del año o de la actividad que se desarrolla, así como del diseño de la misma, pueden cambiar las características del aire y con ello los microorganismos presentes en el mismo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la evolución del número de levaduras presentes en el aire de cuatro zonas de la bodega a lo largo de un año completo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

La toma de muestras se realizó mensualmente en una bodega comercial ubicada en Logroño (La Rioja) durante el período febrero-diciembre de 2008. La bodega está dividida en cuatro zonas principales: elaboración, crianza en barrica, botellero y embotellado. Estas zonas están claramente separadas entre si mediante tabiques, y además la primera y la última se encuentran en un nivel a ras del suelo, mientras que barricas y botellero son subterráneas. El muestreo de aire se llevó a cabo con el muestreador de aire airIDEAL 3P, de la casa comercial Biomèrieux, que permite la aspiración de diferentes volúmenes de aire y su impacto sobre placas Petri con Cloranfenicol-Glucosa-Agar como medio de cultivo específico, para detectar la presencia de levaduras. El volumen muestreado fueron 500 litros y los muestreos se realizaron por duplicado. Las placas se incubaron a 25ºC, y al cabo de 72 horas se procedió al recuento de las colonias crecidas. Este recuento se ajustó posteriormente mediante observación microscópica de las colonias. La población de levaduras se expresó como NMP/m^3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la Figura 1 se observa una variación en la población de levaduras en el aire a lo largo del año, y esta evolución es similar por zonas dos a dos: elaboración y embotellado por un lado y por otro barricas y botellero. Esta distribución coincide con la ubicación de ambas zonas a nivel del suelo o subterránea. Por otra parte también se observa un gran aumento de la población de levaduras en la zona de elaboración durante la época de vendimias (Octubre), por lo que la presencia de levaduras en aire también se puede relacionar con la actividad que se esté desarrollando en la bodega. El aumento que se detecta en todas las zonas en el mes de Mayo coincide con un aumento del nivel de humedad (Tabla 1) y también con aumento de la temperatura. Por lo tanto, la población de levaduras en el aire también parece condicionada por las condiciones ambientales causadas por los cambios climatológicos.

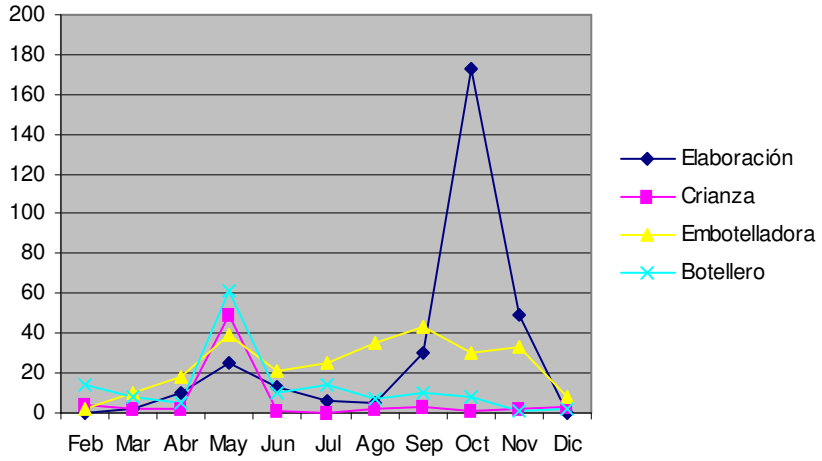


Figura 1. Evolución de la población de levaduras (NMP/m³) en 4 zonas a lo largo del año 2008.

Tabla 1. Temperatura y Humedad Relativa (ºC/%) en el aire de diferentes zonas de la bodega a lo largo del año

MESES	Vinificación	Crianza	Botellero	Embotelladora
Febrero	11.5/68.0	10.3/77.0	11.6/66.0	11.4/68.0
Marzo	13.7/69.0	12.0/75.0	12.8/69.0	14.9/70.0
Abril	14.5/53.0	12.9/72.0	14.0/60.0	17.1/59.0
Mayo	18.0/70.3	14.7/85.3	16.2/71.0	20.0/69.0
Junio	20.0/81.0	15.9/85.0	17.2/79.0	22.8/70.0
Julio	21.8/54.0	18.7/81.0	19.0/77.0	23.5/54.0
Agosto	22.6/45.0	19.9/81.0	20.4/78.0	22.9/51.0
Septiembre	21.3/71.0	19.4/76.0	19.7/68.0	22.5/86.0
Octubre	17.5/62.1	16.5/73.0	17.7/55.5	14.8/62.0
Noviembre	15.6/59.0	13.6/72.0	14.7/67.5	16.1/65.0
Diciembre	12.3/63.5	10.8/71.0	11.8/69.0	13.5/66.0

CONCLUSIONES

Existe una población de levaduras en el aire de las bodegas que varía en función de la zona, la ubicación, la actividad y la época del año

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Curiel, G.J., Van Eijk, H.M.J., Lelieveld, H.L.M., 2000. Risk and control of airborne contamination. In Encyclopedia of Food Microbiology. Edited by R.K. Robinson, C. A. Pp. 1816-1822. Academic Press. London

Granchi, L., Augruso, S., Ganucci, D., Vicenzini, M., 2007. Biodiversité genomique de Saccharomyces cerevisiae pendant la fermentation spontanée du vin conditionnée par le progresión de la vendage dans la cave. Proceedings XXXth OIV World Congress, Budapest.

Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. International Journal of Food Microbiology 125, 141–145.

Garijo, P., López. R., Santamaría, P. Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, A.R., 2009. Presence of lactic bacteria in the air of a winery during the vinification period. International Journal of Food Microbiology 136 (2009) 142–146.

P110 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DEL VIÑEDO Y SU EVOLUCIÓN DURANTE EL PROCESO FERMENTATIVO

Gustavo Cordero-Bueso, Javier Tello, Mª Dolores Vélez, Irene Aporta y Teresa Arroyo

[1]Departamento de Agroalimentación, Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario. Autovía A2, Km 38,2. 28800 Alcalá de Henares, Madrid, España.

teresa.arroyo@madrid.org

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Preservar la biodiversidad de especies autóctonas de levaduras vínicas es de enorme importancia, no sólo por su interés actual para la industria enológica, sino también para asegurar la conservación de un pool de genes de gran relevancia tecnológica para la industria alimentaria en general. El uso de cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* ha mejorado los procesos fermentativos y la calidad de los vinos, no obstante su uso continuado conlleva a una colonización de las bodegas donde son utilizadas y a la consecuente disminución de la biodiversidad microbiana de las mismas. Por este motivo, el viñedo constituye el hábitat ideal donde se debe preservar e incluso favorecer la presencia de especies fermentativas de levaduras. Además, actualmente hay un creciente interés tanto por especies indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* como por otras levaduras autóctonas que pueden contribuir al conjunto de caracteres sensoriales de los vinos, incluso en fermentaciones dirigidas. En este sentido, se han realizado extensos estudios ecológicos, utilizando métodos moleculares de identificación, con el propósito de nuevas levaduras mejor adaptadas a condiciones de fermentación locales (Mercado y col. 2007).

El objetivo de este trabajo es el de contribuir al conocimiento de la microbiota fermentativa del viñedo y su evolución en la etapa fermentativa:

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo 1: 150 cepas de levaduras aisladas en un viñedo centenario en cultivo ecológico y en una bodega ecológica de la zona de San Martín de Valdeiglesias. Ensayo 2: 150 Levaduras aisladas en viñedo convencional centenario y en bodega convencional en la zona de Arganda. Las levaduras se aislaron en cinco momentos diferentes F1 (Viñedo), FF1 (fermentación de las uvas recogidas en el viñedo en condiciones controladas de laboratorio), FF2 (Fermentación inicial en bodega), FF3 (mitad de fermentación en bodega) y FF4 (final de fermentación en bodega

Técnicas de identificación genética empleadas en el estudio:

PCR-RFLP de la región ITS del ADN ribosómico desarrollado por Granchi y col. (1999), utilizando el Software Bionumerics http://www.biosystematica.com, para la identificación genética de especies de levaduras pertenecientes a géneros no-*Saccharomyces*.

Análisis de los microsatélites multiplex o SSR de tres loci de microsatélites altamente polimórficos SC8132X , YOR267C y SCPTSY7 (Vaudano et García- Moruno, 2008).

Secuenciación de los diferentes genotipos y determinación del tamaño de los alelos por electroforesis capilar con ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem), para la identificación de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la distribución de especies en las diferentes fases del estudio realizado en condiciones ecológicas, correspondiente al ensayo 1. Se observa la presencia de cinco géneros, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii, Pichia anomala* y *Saccharomyces cerevisae*. En la Tabla 1 se recogen los 17 ecotipos correspondientes a *Saccharomyces cerevisiae* y su frecuencia de aparición en las cinco fases estudiadas. Los genotipos 9 y 10 aparecen en el viñedo y se mantienen en la bodega. Destaca la dominancia del genotipo 10 a lo largo de la fermentación.

Figura 1

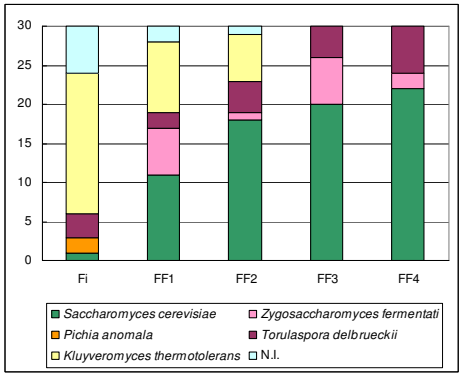


Tabla 1

Ecotipo	2	3	4	5	8	9	10	11	12	15	16-22
FI						1	3				
FF1							11				
FF2					3		15				
FF3							12	5		3	
FF4	1	2	1	2	2	1	4		2		1

En el ensayo 2, correspondiente a la zona de Arganda, se han identificado las especies *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii, Zygosaccharomyces fermentati, Pichia toletana* y *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2). La Tabla 2 muestra los ecotipos de *Saccharomyces cerevisae* encontrados y su distribución en las diferentes etapas de la fermentación. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas en el viñedo (ecotipos 11 y 147) no se han encontrado en la fermentación alcohólica. El tamaño de los alelos de los genotipos 4 y 11 que aparecen, en el viñedo y en la bodega, respectivamente, indica que se corresponden con los genotipos encontrados en la bodega analizada en la zona de San Martín de Valdeiglesias (ensayo 1).

Figura 2

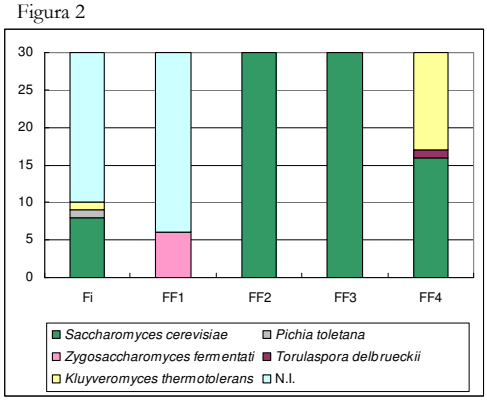


Tabla 2

Ecotipo	114	4	147	11
FI			4	1
FF1				
FF2	22	8		
FF3	7	23		
FF4	2	14		

CONCLUSIONES

En el ensayo 1, se observa una sucesión de especies de levaduras a lo largo de la fermentación, con predominio de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. El ecotipo 10, presente en el viñedo, participa activamente en el desarrollo de la fermentación, como lo muestra su presencia mayoritaria en las diferentes fases analizadas. En la última fase de la fermentación (FF4), se observa una elevada variabilidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. En el ensayo 2, también se aíslan levaduras del género *Saccharomyces* en el viñedo. A lo largo del proceso fermentativo se han determinado cuatro ecotipos de *Saccharomyces cerevisiae*, dos de los cuales, el 4 y el 11 están presentes en los dos ensayos realizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vicenzini M (1999). J. Appl. Microbiol 87, 949-956.
Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina, M. (2007). *Food Microbiol* 24, 403-412.
Vaudano, E., Garcia-Moruno E., (2008). *Food Microbiol*, 25, 56-64.

P131 LIBERACIÓN Y BIOCONVERSIÓN DE ALCOHOLES MONOTERPÉNICOS POR DISTINTAS ESPECIES DEL GÉNERO SACCHAROMYCES Y SUS HÍBRIDOS

Amparo Gamero, Paloma Manzanares, Amparo Querol y Carmela Belloch
Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA), CSIC. Avda/ Agustín Escardino, 7, 46980, Paterna, Valencia
amgallu@iata.csic.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Entre las enzimas más importantes empleadas en vinificación están las glicosidasas (glucosidasas, arabinofuranosidasas, ramnosidasas y xilosidasas), encargadas de la liberación de aromas varietales a partir de precursores aromáticos presentes en el mosto. Es deseable que las levaduras vínicas presenten estas actividades enzimáticas para la mejora de la calidad aromática del vino. Ya en 1994 Rosi et al. estudiaron estas actividades en *Saccharomyces cerevisiae* y en 1997, Mateo and Di Stefano, en *S. bayanus*. Sin embargo, en procesos fermentativos de zonas climáticas frías ha sido descrita la presencia de híbridos entre las especies *S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *S. kudriavzevii* (Masneuf et al., 1998; Groth et al.,1999; Gónzalez et al., 2006). Además, se ha observado que los vinos obtenidos por los *Saccharomyces* híbridos son más aromáticos que los producidos por las especies parentales (González et al., 2007), indicando una posible mayor actividad glicosidasa por parte de estos híbridos.

Los objetivos del presente trabajo se centraron en evaluar la actividad de diferentes glicosidasas (β-D-glucosidasa, β-D-xilosidasa, α-L-arabinofuranosidasa, α-L-ramnosidasa) a nivel cualitativo (en placa) y cuantitativo (actividad extracelular, intracelular y ligada a la pared celular). También se realizaron fermentaciones con diferentes especies del género *Saccharomyces* y con los híbridos entre ellas y se analizó la composición en terpenos de los vinos resultantes. Finalmente se estudió la capacidad de las levaduras parentales e híbridas para la bioconversión de terpenos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Levaduras: 4 cepas de *S. cerevisiae*, 5 cepas de *S. bayanus*, 1 cepa de *S. kudriavzevii*, 4 híbridos *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, 6 híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y 2 híbridos *S. cerevisiae* x *S. bayanus* x *S. kudriavzevii*.

Evaluación cualitativa de la actividad glicosidásica: según Manzanares et al. (1999), adicionando en el medio el azúcar correspondiente y a 25ºC. Los tiempos de incubación fueron los siguientes: actividad β-D-glucosidasa (24 h), β-D-xilosidasa (48 h), α-L-arabinofuranosidasa (72 h),α-L-ramnosidasa (72 h).

Evaluación cuantitativa de la actividad glicosidásica: incubación en mosto a 16ºC durante 72 horas. Ensayo enzimático según Manzanares et al. (1999).

Evaluación de la hidrólisis de los terpenos glicosilados: microfermentaciones en mosto de la variedad Moscatel a 16ºC. Cuantificación de los terpenos liberados mediante microextracción en fase sólida en espacio de cabeza-cromatografía de gases. Los terpenos liberados fueron calculados como la diferencia entre los terpenos presentes en cada muestra menos los terpenos presentes en el mosto.

Evaluación de la bioconversión de terpenos: en medio mínimo con linalol o geraniol a 16ºC (King and Dickinson, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *screening* en placa de las diferentes actividades glicosidasas se realizó con todas las cepas, sin embargo, solo se realizó el estudio a nivel cuantitativo de las actividades β-D-glucosidasa y β-D-xilosidasa, ya que no se detectó ninguna actividad α-L-arabinofuranosidasa y α-L-ramnosidasa. La cuantificación de las actividades se realizó a nivel intracelular, extracelular y a nivel de pared celular, detectándose en este último caso la mayor actividad enzimática (datos no mostrados). En todos los casos se observó un mayor nivel de actividad β-D-glucosidasa que de β-D-xilosidasa.

Como los niveles de actividad detectados de ambas enzimas fueron bajos, se pensó que esto podría ser debido al empleo de un sustrato artificial (pNPG o pNPX), por lo que se decidió emplear los terpenos glicosilados presentes de forma natural en mosto de la variedad Moscatel como sustrato para la detección de las actividades glicosidasas en las distintas levaduras, aproximándonos más así a la realidad enológica. El citado mosto presentaba de partida ciertos niveles de linalool (0,367 mg/l) y de geraniol (0,111 mg/l), valores en ambos casos por encima del umbral

sensorial. Nerol y α-terpineol no fueron detectados en el mosto. Una vez finalizadas las fermentaciones con cada una de las cepas del estudio se pudieron observar las distintas variaciones en el perfil aromático. Los niveles de linalol fueron más bajos en todos los casos, apareció α-terpineol y se incrementó el geraniol, aunque esto último únicamente ocurrió en el caso de las cepas de *S. bayanus* y en el triple híbrido CID1. El nerol no se detectó en ningún vino. El análisis del coeficiente de correlación de Pearson produjo un valor de 0.190 indicando que las variables "actividad β-D-glucosidasa" y "cantidad de terpenos liberados" están muy poco relacionadas. Esta baja relación entre las variables indica la posibilidad de que en la cantidad de terpenos liberados estén interfiriendo otros procesos diferentes de la actividad β-D-glucosidasa, como la ya estudiada bioconversión de terpenos (King and Dickinson, 2000; de Carvalho et al, 2006).

Los análisis realizados demostraron la bioconversión del geraniol en linalool y α-terpineol por todas las cepas estudiadas. En todos los análisis realizados, el porcentaje de conversión de geraniol fue mayor a linalol que a α-terpineol. En general las cepas de *S. cerevisiae* presentaron una menor incorporación de geraniol a la célula, aunque algunas de las cepas de esta especie fueron las de mayor porcentaje de bioconversión a linalol y a α-terpineol. Al contrario, *S. kudriavzevii* y *S. bayanus* fueron las especies que presentaron una mayor incorporación de geraniol a la célula, aunque el porcentajes bajos de bioconversión a linalol o α-terpineol, en general. Los híbridos también presentaron bastante incorporación de geraniol en la célula, aunque, en general, transformaron menor proporción que *S. cerevisiae* en linalol y α-terpineol. La conversión de geraniol en linalool y α-terpineol indica la actividad de transportadores de membrana en *Saccharomyces* que introducen los terpenos en la célula, no solo secuestrándolos del vino, sino que además los terpenos pueden ser biotransformados en otros terpenos que son de nuevo liberados al vino. Estos dos procesos están desfigurando la relación entre la actividad β-D-glucosidasa y la cantidad de terpenos liberados en el vino.

CONCLUSIONES

A pesar de no haberse detectado niveles elevados de actividades glicosidasas en las cepas del género *Saccharomyces* estudiadas, pudo observarse que estas enzimas están activas en distintas especies e híbridos del género *Saccharomyces,* ya que éstas fueron capaces de liberar alcoholes monoterpénicos glicosilados presentes de forma natural en mosto de la variedad Moscatel. El secuestro y biotransformación de terpenos en las cepas de *Saccharomyces* son procesos muy importantes, ya que pueden suponer la desaparición hasta el 80% del geraniol presente en el mosto. El impacto que el secuestro y transformación de terpenos tiene en la calidad del vino es considerable, ya que los niveles de terpenos pueden variar bruscamente a lo largo del proceso fermentativo y, debido a que los umbrales y aromas característicos son diferentes para cada terpeno, estas variaciones en el nivel de terpenos puede cambiar el perfil aromático de los vinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arévalo, M., Úbeda, J.F., Cordero, R.R., Briones, A.I., 2005. Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β-glucosidase activity in wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 99, 558-564.

de Carvalho, C.C., da Fonseca, M.M., 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol Adv.*24(2),134- 42.

González, S.S., Barrio, E., Gafner, J., Querol, A., 2006.Natural hybrids from *Saccharomyces bayanus, S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in wine fermentations. FEMS Yeast Research 6(8), 1221-34.

Gonzalez,S.S.; Gallo,L.; Climent,M.A.; Barrio,E.; Querol,A. 2007. Enological characterization of natural hybrids from Saccharomyces cerevisiae and S. kudriavzevii. Int.J. Food Microbiol. 116 (1):11-18.

Groth, G., Hansen, J., Piškur, J., 1999. A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 1933-1938.

King, A.J., Dickinson, J.R, 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. Yeast 16:499-506.

Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A., 1999. Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the production of β-D-xylosidase activity. Int. J. Food Microbiol. 46, 105-12.

Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., Dubourdieu, D., 1998. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3887-3892.

Mateo, J.J., Di Stefano, R., 1997. Description of the β-glucosidase activity of wine yeasts. Food Microbiol. 14, 583-591.

Rosi, I., Vinella, M., Domizio, P., 1994. Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. J. Appl. Bacteriol. 77(5), 519-27.

P153 SUSCEPTIBILIDAD Y TOLERANCIA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA FRENTE A EXTRACTOS FENÓLICOS DERIVADOS DEL VINO

[1]*Carolina Cueva,* [1]*Irene Bustos* [1], *Begoña Bartolomé* [1], *Teresa Requena,* [1]*M.Victoria Moreno-Arribas,* [2]*Rosa del Campo*

[1]*Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. C/Nicolás Cabrera 9, Madrid, 28049.*

c.cueva@ifi.csic.es

[2]*Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal. Ctra.Colmenar km 9.1, Madrid, 28034. rosacampo@yahoo.com*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El tracto digestivo del ser humano, además de realizar la absorción de nutrientes, aloja una microbiota muy diversa constituida en su mayor parte por bacterias anaerobias incultivables. La distribución de la microbiota a lo largo del intestino es variable en cuanto a especies y densidad, siendo el intestino grueso donde se alcanza la mayor densidad de bacterias.

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios para conocer el papel de la microbiota intestinal sobre la salud del hospedador y las interacciones entre ambos. Entre las funciones de dicha microbiota, destacan la de nutrición, modulación del sistema inmune, resistencia a la colonización de patógenos, desarrollo del epitelio intestinal y recuperación de energía metabólica (Hooper *et al.,* 2002; Backhed *et al.,* 2004; Requena *al.,* 2010). Uno de los factores que más influyen en la composición y variabilidad de la microbiota intestinal es la dieta, y por tanto, es importante conocer si la ingesta de determinados alimentos podría modificar la composición de dicha microbiota.

El objetivo planteado en este trabajo fue evaluar la susceptibilidad y/o tolerancia de la microbiota intestinal humana frente a dos extractos fenólicos comerciales obtenidos a partir de vino y pepitas de uva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos extractos fenólicos comerciales, uno procedente de vino tinto (Provinols®) y otro de pepitas de uva (Vitaflavan®) y 50 muestras de heces de voluntarios gastrointestinalmente sanos.

Para determinar el efecto de los extractos sobre la microbiota intestinal, se procedió de la siguiente manera: se homogeneizó 1 g de cada muestra de heces en 10 ml de solución salina estéril (0,9% NaCl), se agitó hasta solubilizarlo y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para sedimentar los restos de fibra. Del sobrenadante de dicha centrifugación se recogieron tres alícuotas de 2700 µl en tubos estériles, y se pusieron en contacto con 300 µl de extracto fenólico de vino (10 mg/ml), 300 µl de extracto fenólico de pepita de uva (10 mg/ml) o 300 µl agua estéril (control). Todos los tubos se incubaron durante 3 horas a 37ºC y después se sembraron alícuotas de 100 µl en medios de cultivo selectivos (MRS, Manitol Salt, Mac Conckey y M-*Enterococcus*) e inespecíficos (Sangre de Carnero y TSA) suplementados con 1mg/ml de los extractos fenólicos. Tras la siembra, las placas se incubaron a 37ºC durante 18 horas, y transcurrido este tiempo se realizó un recuento de colonias y se procedió al aislado de aquellas bacterias sensibles/resistentes a los extractos. La identificación de dichas bacterias a nivel de especie se realizó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos extractos fenólicos ensayados difieren en su modo de actuación sobre los diferentes grupos bacterianos de la microbiota intestinal humana. Así, el extracto de pepitas de uva, a la concentración estudiada (1mg/ml), presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de enterobacterias, bacterias lácticas, enterococos y estafilococos. Por el contrario, el extracto de vino tinto a la misma concentración, estimula el crecimiento de los enterococos y de las bacterias lácticas, mostrando a su vez una clara inhibición de las bacterias gram-negativas y los estafilococos.

Existen por tanto diferencias en la susceptibilidad y/o tolerancia de los microorganismos de la microbiota intestinal frente a los extractos estudiados. Dicho comportamiento se explicaría en base a diferencias en la composición fenólica de los extractos. El extracto de pepita es especialmente rico en proantocianidinas de la uva (monómeros, oligómeros y polímeros de flavan-3-oles), mientras que el contenido de estos compuestos en el extracto de vino tinto es proporcionalmente menor, aunque este extracto contiene otros compuestos fenólicos como antocianos, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos, etc. Estos resultados están en consonancia con estudios previos (Aura *et al*., 2008), donde se ha visto un efecto inhibitorio de las procianidinas o taninos condensados frente a la microbiota intestinal, y abren nuevas líneas de investigación con respecto al efecto de estimulación del crecimiento de diversos grupos bacterianos por parte de otros polifenoles del vino.

CONCLUSIONES

Estos son los primeros resultados de un amplio estudio que pretende evaluar los efectos potencialmente beneficiosos del consumo moderado de vino sobre la microbiota intestinal. Los ensayos realizados hasta el momento ponen de manifiesto que los polifenoles del vino inhiben y/o estimulan selectivamente los grupos bacterianos de la microbiota intestinal *in vitro*, Nuestro próximo objetivo es culminar la identificación de las bacterias más susceptibles y tolerantes a la acción de estos compuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aura, A-M., Mattila, I., Seppanen-Laakso, T., Miettinen, J., Oksman-Caldentey, KM., Oresic, M. Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: Comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochemistry Lett.* 2008, 1: 18-22.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(44): 15718-15723.

Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 2002; 22:283-307.

Requena, T., Monagas, M., Pozo-Bayón, M.A., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., del Campo, R.; Ávila, M., Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Moreno-Arribas, M.V. Perspectives of the potencial implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends Food Sci.Technol.* 2010, en prensa, doi:10.1016/j.tifs.2010.04.004

Walter, A., Cerdeno-Tarraga, A., Bentley, S. Faecal matters. *Nature Rev. Microbiol.* 2006; 4: 572–573.

P160 SELECCIÓN DE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE UNA CARENCIA DE NITRÓGENO DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Alicia Gutiérrez[1], Rosana Chiva[1], Marta Sancho[2], Albert Mas[2], Gemma Beltrán[2] y José M. Guillamón[1,2]*

[1]*Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC), Avda. Catedrático Agustín Escardino 7, 46980 Paterna (Valencia).*

aguli@iata.csic.es

[2]*Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·li Domingo s/n, 43007, Tarragona.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Niveles insuficientes de nitrógeno asimilable en el mosto durante la fermentación alcohólica, pueden ser limitantes para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* desde un punto de vista nutricional (1), y el principal causante de las paradas de fermentación (2). La cantidad de nitrógeno necesaria para completar la fermentación depende de la composición del mosto y de la cepa utilizada. *Saccharomyces* es incapaz de asimilar de la misma manera las diferentes fuentes nitrogenadas, siendo el amonio y los aminoácidos fundamentales para su crecimiento y por lo tanto las fuentes preferidas de nitrógeno (3). Durante las primeras horas de fermentación, las células de levadura captan la mayoría de fuentes nitrogenadas presentes en el mosto que son asimiladas y degradadas en un orden de preferencia, que viene marcado por el mecanismo de "Represión por Catabolito del Nitrógeno" (NCR). Una de las soluciones para prevenir la falta de nitrógeno en mosto, es el suplemento con sales de amonio, lo cual produce un aumento de biomasa y una mejora en la velocidad fermentativa. Adiciones excesivas de nitrógeno pueden producir nitrógeno residual, no asimilado al final de la fermentación, lo que lleva a la inestabilidad microbiana y la posible producción de carbamato de etilo, agente carcinogénico, en el vino. Por lo tanto, el conocimiento del contenido en nitrógeno del mosto y el requerimiento por parte de la levadura son consideraciones importantes para un rendimiento óptimo del proceso fermentativo.

Por esta razón, el objetivo principal de este estudio es obtener marcadores que nos indiquen el momento de la fermentación en el que se produce carencia de nitrógeno en el mosto, y así poder adicionar los suplementos en concentraciones adecuadas. En el siguiente trabajo se ha estudiado la efectividad de diferentes marcadores de naturaleza diversa, desde una actividad de una enzima intracelular, a un cambio en la expresión génica que responde a los aumentos o disminuciones en función de la disponibilidad de nitrógeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro cepas vínicas, comercializadas por la empresa Agrovin en forma de levadura seca activa, eran utilizadas en este estudio (PDM, EP2, RVA y TTA). Antes de la inoculación en el medio, la levadura era rehidratada en agua a 37ºC durante 30 min, y se inoculaba una población inicial de 2 X 10^6 cel/mL. Las fermentaciones eran llevadas a cabo en mosto sintético (pH 3.3), con 200 g/L de azúcar (4). Solo variaba la concentración de nitrógeno (60, 140 y 300 mg/L). Las fermentaciones se realizaron a una temperatura de 28ºC y una agitación de 120 rpm.

Con las muestras tomadas a diferentes tiempos de la fermentación, se realizó la determinación del contenido intracelular de trehalosa siguiendo el protocolo de Parrou y Francois (5), la medición de las actividades enzimáticas arginasa (6) y glutamato-deshidrogenasa (7) y la cuantificación de la actividad transcripcional de los genes *GAP1*, *DAL4* y *GDH1* por PCR cuantitativa a tiempo real.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se observó que los marcadores más eficaces, en cuanto a la detección de una falta de nitrógeno en el medio, fueron la actividad arginasa y la actividad transcripcional de los genes *GAP1* y *DAL4*, destacando este último. El inicio de la síntesis de trehalosa se produce a partir de las 24h en las tres fermentaciones, por lo que está más relacionado con el inicio de la fase estacionaria que con una falta de nitrógeno en el medio. También se observa una relación directa entre la trehalosa sintetizada y la concentración de nitrógeno en el mosto (Fig.1 A). La enzima arginasa se activa cuando la disponibilidad de nitrógeno asimilable en el medio es baja y la célula ha de movilizar sus reservas intracelulares, especialmente en forma de arginina. La inducción temprana de esta actividad se produce en todos los casos, presentando una alta actividad en las fermentaciones pobres en nitrógeno (Fig.1 B). En las primeras horas de fermentación la actividad enzimática GDH1 es elevada, cayendo bruscamente a las 8h, ya que se ha consumido todo el nitrógeno disponible en el mosto (mayoritariamente amonio que es el substrato de la reacción). En las siguientes horas la actividad enzimática es baja aunque aumenta con respecto a las 8h, ya que las levaduras ya han consumido todo el amonio pero la actividad puede ser debida a los aminoácidos que hay en el medio, que son captados más tarde (Fig.1 C). En cuanto a la actividad transcripcional mostrada en la Fig.1 D, vemos que el gen *GDH1* es el que resulta menos apropiado para nuestro propósito ya que tiene una actividad muy baja durante toda la fermentación. En el caso del gen *GAP1*, se observa que es un buen marcador para las cepas, porque presenta una mayor actividad en el momento de escasez de nitrógeno del medio. También hemos observado una inducción temprana en la fermentación con déficit nitrogenado. El gen *DAL4* también presenta una inducción temprana y una fuerte actividad en la fermentación con déficit de N.

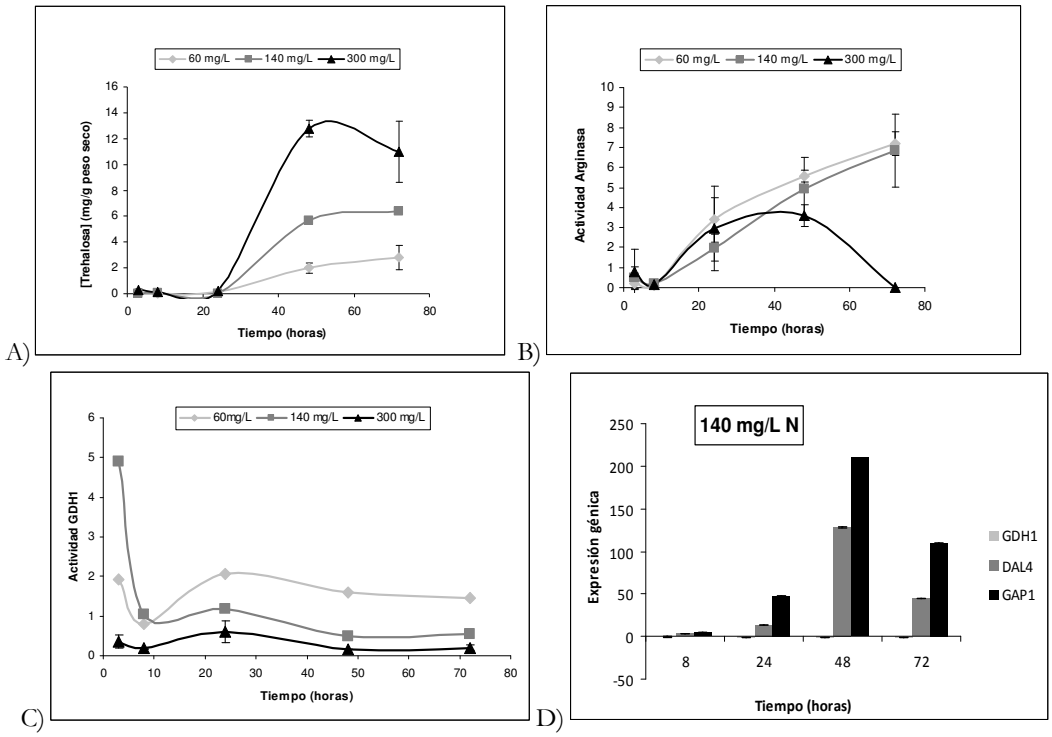


Figura 1. Determinación de los diversos marcadores bioquímicos y moleculares en la cepa PDM. (A) Contenido intracelular de trehalosa (B) Actividad arginasa (C) Actividad GDH1 (D) Actividad transcripcional de los genes *GDH1*, *DAL4*, *GAP1* (140 mg/L)

CONCLUSIONES

Tanto la actividad arginasa como la actividad transcripcional de los genes *GAP1* y *DAL4*, se podrían considerar buenos marcadores, uno bioquímico o enzimático y el otro molecular. La simplificación de estos protocolos, junto con la adaptación para su uso industrial, podría ser útil para determinar las carencias de nitrógeno en bodega.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Ingledew, M., Kunkee, R.E. 1985. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. Am. J. Enol. Viticult. 36:65-76
(2) Bisson, L. 1999. Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Viticult. 50:107-119.
(3) Ough, C.S.; Amerine M.A. 1988. Nitrogen Compounds. Methods for analysis of must and wines.Segunda edición. John Wiley and sons. University of California.
(4) Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J.M. Nitrogen catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae during wine fermentations. FEMS Yeast Res. 2004, 4, 625-632.
(5) Parrou, J.L. and Francois, J. 1997. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. Anal. Biochem. 248,186-188.
(6) Carrasco, M.P., Pérez-Ortín, J.E. and del Olmo, M. (2003) Arginase activity is a useful marker of nitrogen limitation during alcoholic fermentation. Syst. Appl. Microbiol. 26, 471-479.
(7) Doherty, D. 1970. L-Glutamate dehydrogenases (yeast). Methods Enzymol. 17:850-856.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo dentro del proyecto CENIT DEMETER "Nutrientes nitrogenados en la fermentación alcohólica: necesidad y efecto sobre su desarrollo" en colaboración con la empresa Agrovin.

GENÓMICA DE MICROORGANISMOS

POSTERS

P100 TIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *GEOTRICHUM CANDIDUM* AISLADAS DEL QUESO ARTESANAL DE "ARMADA"

Noelia Sacristán[1], Elena Fernández[2], José María Castro[3], María Eugenia Tornadijo[1] y Baltasar Mayo[2]
[1]Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. C/ Campus de Vegazana, s/n, 24071, León
nsacv@unileon.es
[2]Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), Carretera de Infiesto s/n, 33300, Villaviciosa, Asturias.
[3] Departamento de Biología Molecular, Facultad de CC Biológicas y Ambientales, Universidad de León. C/ Campus de Vegazana, s/n, 24071, León.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Geotrichum candidum es un hongo dimórfico con características de levadura y de hongo filamentoso, presente de manera habitual en quesos de pasta blanda o semidura madurados por mohos, como el queso de Armada. Esta

especie posee numerosas propiedades de interés en la industria quesera: consume lactato y produce varios enzimas que degradan proteínas y lípidos, generando compuestos que contribuyen al aroma y a la textura característicos de este tipo de quesos.
Durante muchos años los métodos usados para identificar levaduras se basaron fundamentalmente en criterios morfológicos, características fisiológicas o una combinación de ambos (Barnett y col., 2000), pero no es posible distinguir especies del género *Geotrichum* exclusivamente sobre la base de las características fenotípicas debido al alto grado de polimorfismo y variabilidad en dichos caracteres (Pottier y col., 2008). Esto, unido a las dificultades para la lectura de las pruebas de crecimiento, ha conducido inexorablemente hacia el uso de técnicas moleculares.
El objetivo de este trabajo fue la tipificación mediante técnicas moleculares de 39 cepas de *Geotrichum candidum* aisladas por Tornadijo y col. (1998) en distintas etapas de la producción artesanal del queso de Armada para su uso en la elaboración de un cultivo iniciador autóctono.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se aislaron e identificaron mediante métodos basados en criterios fenotípicos y morfológicos así como por secuenciación parcial del ARN_r 26S, treinta y nueve cepas de *Geotrichum candidum* de queso de Armada (elaborado con leche cruda) en distintos puntos de muestreo a lo largo de su proceso de elaboración (leche, cuajada y queso de 2 y 4 semanas de maduración).
El ADN aislado y purificado de las cepas se sometió a análisis mediante la técnica RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA). Con el fin de optimizar y estandarizar el protocolo a seguir, se ensayaron varios *primers* (GATA-4, GTG-3, Ari1, Omt1 y M13), así como temperaturas de anillamiento específicas para cada uno de ellos.
Se utilizaron las condiciones de PCR descritas por Geisen y col. (2001) con algunas modificaciones. Los productos PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Los resultados se recogieron y analizaron mediante el sistema de digitalización de imágenes "Gel Doc 2000" (BioRad) y el programa "Quantity One".
El estudio de similitud de bandas de los diferentes perfiles obtenidos se realizó mediante el coeficiente de Sorensen usando el programa "MVSP 3.1". El análisis de grupos de los distintos perfiles de bandas fue obtenido empleando el método "UPGMA".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los *primers* que se seleccionaron como más adecuados por el perfil de bandas obtenido fueron Ari1, Omt1 y M13, siendo los dos primeros los que mayor repetitividad mostraron (90% frente al 85% del *primer* M13). Con los *primers* Ari1 y Omt1 se requiere menos de un 90% de similitud entre las cepas para que puedan ser consideradas diferentes. Bajo estas condiciones se obtuvieron 16 perfiles genéticos distintos para las cepas objeto de estudio. En caso de integrar los resultados obtenidos utilizando los tres *primers* se obtenían 17 perfiles genéticos diferentes.
El uso exclusivo de los *primers* Ari1 y Omt1 mostró resultados claramente más consistentes y repetitivos en relación con la distinción de cepas (Fig.1).

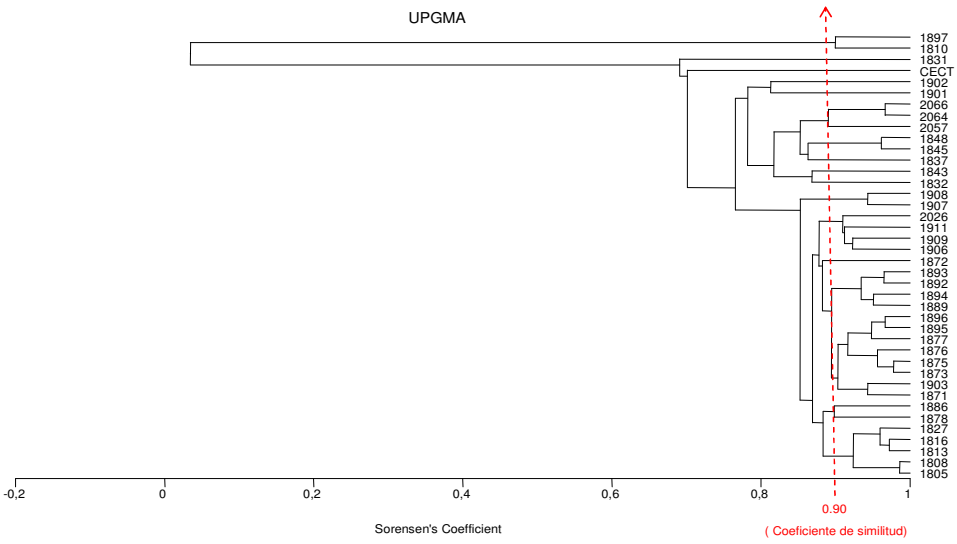


Figura 1. Dendrograma que muestra el coeficiente de similitud de Sorensen para los perfiles de bandas obtenidos y agrupados mediante el método UPGMA. La flecha indica el 90% de similitud, por encima de cuyo valor dos cepas pueden ser consideradas la misma.

CONCLUSIONES

1.- La técnica RAPD-PCR es de utilidad en la discriminación intraespecífica de *G. candidum*.
2.- Se han obtenido 16 perfiles genéticos característicos a partir de 39 cepas de *G. candidum* aisladas del queso de Armada y caracterizadas previamente en base a su aptitud tecnológica.

3.- Los *primers* Ari1 y Omt1 han resultado ser los más adecuados para su uso en la discriminación de cepas de esta especie fúngica.
4.- La técnica RAPD-PCR permite obtener patrones adecuados de utilidad en los programas de selección de co-cultivos iniciadores para la elaboración de queso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000. Yeasts: characteristics and identification. 3rd edn. Cambridge university press, Cambridge.
Geisen, R., Cantor, M. D., Hansen, T. K., Holzapfel, W. H., Jakobsen, M. 2001. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. International Journal of Food Microbiology 65, 183–191.
Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J.P., Guéguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. International Journal of Food Microbiology 126, 327-332.
Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Sarmiento, R.M., Carballo, J., 1998. Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. Le Lait 78, 647–659.

METODOLOGÍA

POSTERS

P102 SOBREDIMENSIONADO DEL MODELO DE BIGELOW EN LA CUANTIFICACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS APLICADOS A CONSERVAS DE ALIMENTOS

Juan Ignacio Reguera[1], *Agustín León*[2] *y Gonzalo Sacristán*[1]
[1]*Área de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos. Pza. Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos*
jiru@ubu.es
[2]*Area de Tecnología de los Alimentos. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid, Avda. de Madrid 44, 34004 Palencia.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS
La cuantificación de tratamientos térmicos mediante el modelo tradicional de Bigelow (Bigelow, 1921) está basada en el cálculo del valor esterilizante *F*. Para la obtención de dicho valor se requiere del conocimiento de los parámetros *D* y *Z* que se obtienen de las cinéticas térmicas del microorganismo de referencia considerado. No obstante, estudios recientes (León, 2010) demuestran que el modelo de Bigelow sobredimensiona en exceso los resultados, especialmente cuando se cuantifica el efecto esterilizante obtenido sobre microorganismos de referencia con un valor pequeño del parámetro *D*. En estos casos, se consideran más reales los resultados proporcionados por modelos estadísticos de tipo predictivo. En este trabajo se contrastan los resultados obtenidos por ambos modelos en el cálculo del efecto de esterilización sobre *Bacillus coagulans* en tratamientos térmicos aplicados a conservas de judías verdes extrafinas de la variedad *Helda.*

MATERIAL Y MÉTODOS
Para la elaboración de las conservas se trabajó con judías verdes despuntadas, cortadas en trozos de unos 2 cm, escaldadas a 85 ºC durante 1,5 min y envasadas en latas de hojalata de ½ Kg de capacidad, a las que se les aplicaron una serie de tratamientos de autoclavado a las *temperaturas de trabajo* (T_{ai}) de 105, 107, 110 y 115 ºC durante tiempos comprendidos entre 3 y 35 min en un autoclave vertical de 30 l de capacidad de la marca Autester modelo E-30 Dry-PV.
Teniendo en cuenta el pH del alimento (5), el indicador considerado para valorar la esterilización obtenida por los tratamientos fue *B. coagulans* y para seleccionar el tratamiento ideal se utilizó la indicación descrita por Hayes (1992) y Brennan *et al.* (1998) que recomiendan para este indicador la obtención de un factor de reducción igual o superior a 5.
Mediante el método de Bigelow, los efectos esterilizantes obtenidos por los tratamientos de autoclavado se obtuvieron con la fórmula siguiente:

$$n_{sonda} = F^{Z}_{T_{ai}} \Big/ D_{T_{ai}}$$

Para el método estadístico se partió de los datos de n_{real} obtenidos en la elaboración de la cinética de *B. coagulans* a temperaturas constantes, obteniéndose una base correctora que proporcionó el número de reducciones $n_{predicho}$ de los tratamientos en función de las temperaturas de los ensayos (T_{ai}) y de los tiempos de proceso referidos a dichas temperaturas (*F*), de forma que, introduciendo en esta base correctora las temperaturas de trabajo de tratamientos de autoclavado y los tiempos de proceso referidos a estas temperaturas ($F^{Z}_{T_{ai}}$) se obtuvieron los efectos buscados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
De los valores D de estos ensayos se deduce un valor para el parámetro *Z* de 10,64 ºC. Dicho valor fue inferior a los propuestos por Stumbo (1973) ($14<Z<18$) y ligeramente superior al descrito por Brennan *et al.* (1998) ($Z=10$ ºC). Para Z = 10,64 ºC se obtuvo un valor D_{121} = 0,0264 min. Este valor estuvo dentro del rango de valores propuestos por Stumbo (1973) y descritos por Brennan *et al.* (1998) ($0,01<D_{121}<0,07$).
La ecuación de la base correctora para aplicar el método estadístico fue la siguiente:

$$n_{predicho} = f(T_{ai},F) = -12{,}85 + 0{,}147911 \cdot T_{ai} + 0{,}04485 \cdot F \quad (\boldsymbol{R^2} = 74{,}97)$$

Tabla 1. a) (Izquierda) Ensayos de termodestrucción de *B. coagulans*. b) (Derecha) Sobredimensionado del método de Bigelow. Selección del tratamiento ideal.

T_{ai} (ºC)	t_{ai} (min)	N_f (ufc/ml)	n_{real}	F (min)
80 (D_{80} = 192,31 min) (N_o = 126.000.000 ufc/ml)	10	113.200.000	0,05	9,61
	20	100.000.000	0,10	19,23
	25	92.800.000	0,13	25,00
	35	83.200.000	0,18	34,61
90 (D_{90} = 21,28 min) (N_o =200.000.000 ufc/ml)	15	100.800.000	0,30	6,38
	20	33.200.000	0,78	16,59
	25	18.600.000	1,03	21,92
	30	7.600.000	1,42	30,20
95 (D_{95} = 7,56 min) (N_o =400.000.000 ufc/ml)	5	26.240.000	1,18	8,92
	15	1.484.000	2,43	18,37
	25	150.000	3,42	25,86

Tratamientos		Tiempos de proceso	M. Bigelow	M. estadístico	Sobredimensionado
T_{ai} (ºC)	t_{ai} (min)	$F^{Z}_{T_{ai}}$ (min)	n_{sonda}	$n_{predicho}$	(%)
105	3	4,24	5,05	2,87	75,96
105	7	8,26	9,83	3,05	222,30
105	10	10,66	12,69	3,16	301,58
105	20	20,93	24,92	3,62	588,40
105	30	31,02	36,93	4,07	807,37
107	3	3,90	7,21	3,15	128,89
107	6	7,40	13,70	3,31	313,90
107	10	13,25	24,54	3,57	587,39
107	20	19,87	36,79	3,87	850,65
107	30	31,60	58,52	4,39	1.233,03
110	3	3,69	13,20	3,59	267,69
110	10	10,28	36,71	3,88	846,13
110	15	15,72	56,14	4,13	1.259,32
110	25	26,71	95,39	4,62	1.964,72
110	35	37,41	133,60	5,10	2.519,61
115	3	4,17	43,40	4,35	897,70
115	10	11,01	114,71	4,65	2.366,88
115	20	21,57	224,73	**5,13**	4.280,70
115	30	31,28	325,87	5,56	5.760,97

Puede apreciarse que el grado de sobredimensionado del método de Bigelow fue muy grande en todos los casos y aumentó con la temperatura de los tratamientos. En el tratamiento resaltado en verde (tratamiento seleccionado para $n \geq 5$) fue superior al 4,280 %.

CONCLUSIONES

1. El modelo de Bigelow puede utilizarse para la obtención del parámetro Z con el objetivo de calcular el valor tradicional de esterilización F pero no para determinar los factores de reducción n obtenidos por los tratamientos térmicos ya que se cometerán errores altos, especialmente cuando se cuantifican indicadores microbianos de bajo valor del tiempo de reducción decimal (D).
2. Los valores de los parámetros termocinéticos para *Bacillus coagulans* en solución de judías verdes (pH = 5) fueron Z = 10,64 ºC y D_{121} = 0,0264 min (A_f = 1,04).
3. De los tratamientos aplicados en el trabajo, el que alcanzó con mayor exactitud el efecto de esterilización sobre *B. coagulans* considerado como ideal ($n \geq 5$) fue 115 ºC durante 20 min.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bigelow, W.D. (1921) *"The logarithmic nature of thermal death time curves"*. J. Infect. Dis., 29, 528-536.

Brennan, J.G.; Butters, J.R.; Cowell, N.D.; Lilly, A.E.V. (1998) Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Zaragoza. Acribia.

Hayes, G.D. (1992) Manual de datos para ingeniería de los alimentos. Zaragoza. Acribia.

León, A. (2010) "Corrección del modelo de Bigelow. Aplicación en el cálculo de los efectos de cocción y de esterilización sobre *Bacillus coagulans* en una conserva de judías verdes *(Phaseolus vulgaris* var. *Helda)"*. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid.

Stumbo, C.R. (1973) Thermobacteriology in Food Processing 2nd ed. New York, London. Academie Press.

P210 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE TIPADO PARA LA LEVADURA DETERIORANTE DE ALIMENTOS *PICHIA GUILLIERMONDII*

Eva María Rivas-Fernández, Petra Wrent, J. M. Peinado y María-Isabel de Silóniz

Departamento de Microbiología III, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM). C/ José Antonio Novais N.2, 28040 Madrid.

siloniz@bio.ucm.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El deterioro de los alimentos es un proceso muy complejo que es el resultado final de muchos factores tanto intrínsecos, como extrínsecos, implícitos e industriales, los cuales interactúan entre ellos en una red muy compleja (Deak y Beuchat, 1996). En muchos procesos tradicionales, la influencia relativa de cada factor se ha equilibrado empíricamente, evitándose así el deterioro. Sin embargo, algunos de los cambios diseñados para mejorar el producto o el proceso de producción o/y seguir las tendencias del mercado para obtener productos más "naturales" puede introducir grandes alteraciones en esa red favoreciendo el deterioro del producto. En las industrias de alimentos, el tipado puede ser considerado bajo dos perspectivas: una la diferenciación de biotipos con propiedades específicas, tales como la producción de compuestos volátiles que mejoren el sabor, maduración (Andrade et al., 2009), o por el contrario puedan hacer que una cepa presente capacidades deteriorantes para un producto determinado (Martorell et al., 2006), o con el fin de monitorizar una cepa, por ejemplo durante el

proceso de fermentación (Suezawa et al., 2008), y la otra con el fin de determinar la fuente de contaminación, por ejemplo, para resolver problemas de contaminación a lo largo de la cadena de producción en un proceso industrial específico (Martorell et al., 2005).
P. guilliermondii pertenece al grupo II de Davenport, y se aísla frecuentemente de frutas, bebidas dulces, jugos de fruta, aceitunas, carnes y productos lácteos (Deak y Beuchat, 1996) y bebidas alcohólicas, donde se ha descrito el deterioro (Martorell et al. 2006) y en este trabajo abordamos un estudio comparativo de las técnicas utilizadas principalmente para el tipado de levaduras en alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas usadas en este trabajo se muestran el la Tabla 1. Las cepas fueron mantenidas rutinariamente en YMA (Yeast Morphology Agar) a 28 °C.

2. Metodologías de tipado utilizadas en este trabajo

La Tabla 2 muestra los cebadores utilizados.

2.1 Extracción del DNA

El DNA genómico se extrajo siguiendo el protocolo Querol et al. 1992.

2.2. Análisis del DNA mitocondrial (mtDNA)

Después de la extracción las muestras fueron digeridas con la endonucleasa *Hinf*I (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) como describió previamente Querol et al, 1992.

2.3. Análisis de PCR fingerprinting.

Los oligonucleótidos $(GACA)_4$ Taper Group (Madrid, Spain) fueron utilizados según Andrade et al. 2006.

2.4. Análisis RAPD-PCR

Los perfiles se generaron utilizando varios decámeros como cebadores (OPA 2, OPA 3, OPA 9) Taper (Madrid, Spain) de acuerdo a Matorell et al., 2006.

2. 5. Análisis de PCR-RFLP de la región IGS delDNA ribosómico.

La región intergénica del rDNA (IGS) fue amplificada con los CNL12 y CNS1 (Appel & Gordon, 1995) y las condiciones descritas previamente Romero et al., 2005, Quirós et al, 2006. Los productos de amplificación se digirieron con las *Hha*I, *Hap*II and *Mbo*I (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas de *P. guilliermondii,* las aisladas de las muestras como las cepas de referencia presentan un tamaño de IGS de 2900pb. Su digestión con la enzima de restricción *Hha*I generó 4 patrones diferentes, como se muestra en la Tabla 3. Con la técnica del DNA mitocondrial se obtuvieron 7 polimorfismos. La utilización de los RAPDs produjo resultados variables no reproducibles (Figura 1, Tabla 1) y por último la amplificación de microsatélites con el oligonucleótido $(GACA)_4$ generó tres patrones.

Tabla 1. Patrones obtenidos con RFLP del DNA mitocondrial, RFLP de la región IGS del DNA ribosómico, amplificación de microsatélites y RAPDs de las cepas aisladas de *P. guilliermondii* y otras de referencia. (v) Patrón variable

M1	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	I	v	v
M2	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	II	v	v
M3	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	III	v	v
M4	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	II	v	v
M5	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	I	v	v
M6	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
M7	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
M8	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	IV	v	v
YFB 1	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YN 2	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YF3	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YFB4	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YN5	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YF6	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YFB7	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	V	v	v
YN8	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YF9	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
YA10	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
MA11,1	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
CECT 1456 T	B	B2 (1000+450+410+390+220+170+140)	I	v	v	v
CECT 1438	A	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
CECT 10100	C	B3 (850+410+390+250+220)	II	v	v	v
CECT 10157	D	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
CECT 1019	G	B1 (1000+600+450+410+170+140)	III	v	v	v
CECT 1021	E	B4 (1200+600+450+410+140)	I	v	v	v
CECT 12839	F	B1 (1000+600+450+410+170+140)	I	v	v	v
CECT 12791	E	B1 (1000+600+450+410+170+140)	III	v	v	v

Tabla 2. Cebadores utilizados para el tipado de las diferentes cepas.

5,8S-ITS rDNA	ITS1, TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4, TCCTCCGCTTATTGATATGC
IGS rDNA	CNL12, CTGAACGCCTCTAAGTCAG
	CNS1, GAGACAAGCATATGACTACTG
Genomic DNA	$(GACA)_4$
Genomic DNA	OPA-2, TGCCGAGCTG
Genomic DNA	OPA-3, AGTCAGCCAC
Genomic DNA	OPA-9, GGGTAACGCC

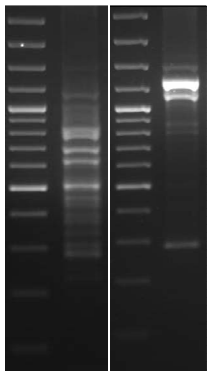


Figura 1. Ejemplo de la no reproducibilidad de misma cepa (Mi1) con RAPD OPA 3

CONCLUSIONES
Los mejores resultados se obtienen con la técnica de RFLP del DNA mitocondrial seguida por la de RFLP de la región IGS del DNA ribosómico. Ambas son muy reproducibles y la segunda además, proporciona unos patrones más claros y fáciles de seguir sin necesidad de comparación entre cepas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Andrade et al. 2006. International Journal of Food Microbiology 107, 48 – 58.
Appel & Gordon 1995. Experimental Mycology, 19, 120-128.
Andrade et al. 2009. Food Microbiology 26, 578-586.
Deak, T. and Beuchat, L.R. 1996. Handbook of food spoilage yeasts CRC Press. Boca Ratón. Flo.
European Parliament. 2002. Official Journal of the European Communities. L31/1-L31/24.
Martorell et al. 2005. International Journal of Food Microbiology. 101, 293-302.
Martorell et al. 2006. International Journal of Food Microbiology. 106, 79 – 84.
Querol et al 1992. . Applied Enviromental Microbiology 58 , 2948-2953.
Quirós et al. 2006. Antonie van Leeuwenhoek 90, 211-219.
Romero et al. 2005. FEMS Yeast Research 5, 455-461.
Suezawa et al. 2008. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 72, 2452-2455.

AGRADECIMIENTOS
Este estudio se ha realizado gracias al proyecto financiado por la Universidad Complutense de Madrid: UCM-BSCH GR58/08.

MICROORGANIMOS ALTERANTES

POSTERS

P143 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS* ALTERANTES DE PRODUCTOS DE PANADERÍA

Luisa de Garnica[*], *Borja Linaje, Jesús Santos y Andrés Otero*
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus Universitario, s/n, 24071, León
mlgarg@unileon.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS
La alteración microbiana de los productos de panadería es uno de los factores que más condiciona la vida útil de este tipo de productos, así como la causa de importantes pérdidas económicas [1]. Este tipo de alteración puede ser debido al crecimiento y actividad de mohos, levaduras o bacterias; entre estas últimas, destacan las pertenecientes al género *Bacillus*, como productoras del defecto conocido como "pan filante" o "ropey bread", debido a la acción de proteasas y amilasas y a la producción de un polisacárido extracelular[1].
El objetivo del trabajo que se presenta es el estudio microbiológico de bocadillos comerciales congelados y envasados en atmósfera modificada y la caracterización de las cepas de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* aisladas de los mismos

MATERIAL Y MÉTODOS
Se analizaron 15 muestras de bocadillos comerciales envasados individualmente en atmósfera modificada y congelados, que presentaban diversos rellenos (chorizo-queso, jamón-queso y salchichón-queso) y que llevaban entre 1 y 80 días congelados desde la fecha de fabricación. Todas las muestras se encontraban dentro del período de consumo preferente.
De cada muestra se tomaron 25 gramos que se homogeneizaron en 225 de peptona al 0,1 % y se realizaron las determinaciones de microorganismos aerobios mesófilos sobre placas de TSA incubadas a 30 ºC y, tras tratamiento a 80 ºC durante 15 minutos, de microorganismos esporulados aerobios.
Se registraron las características morfológicas de las colonias obtenidas en el medio de recuento de esporulados aerobios y se seleccionaron un número representativo de colonias de cada tipo morfológico para su caracterización posterior por medios fenotípicos y genéticos.
Las colonas aisladas es estudiaron fenotípicamente mediante el estudio de su morfología en placa, tinción por el método de Gram, actividades oxidasa y catalasa, degradación del almidón, oxidación/fermentación de la glucosa y producción de ácido a partir de manitol[2].
Dos colonias representativas de los distintos tipos morfológicos fueron posteriormente analizados en las galerías de identificación BBL Crystal Gram Positive Identification System y mediante la amplificación y digestión con *Alu*I de un fragmento, específico del género *Bacillus*, del gen del ADNr 16S según la técnica descrita por Wu y col. [3]. Los datos fueron procesados mediante el programa GelCompar v6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
El recuento de microbiota aerobia ofreció un valor medio de 3,8 log ufc/g, con valores comprendidos entre 2 y 5,5 log ufc/g, mientras que el recuento medio de microorganismos esporulados aerobios fue de 1,9 log ufc/g (1,3-2,8 log ufc/g). Estos valores de microorganismos esporulados se pueden considerar bajos si se comparan con los que

se citan en la bibliografía para productos de panadería, entre 2 y 4 log ufc/g [4;5], aunque hay que considerar que en estos trabajos no analizaban productos congelados.
Como era esperable, la mayoría de las colonias aisladas correspondían a microorganismos del género *Bacillus*. En total se estudiaron 60 aislamientos, que se agruparon en 12 tipos morfológicos distintos, como se muestra en la siguiente tabla:

MORFOLOGÍA DE LA COLONIA	**Nº CEPAS**	**%**
Translúcida. Borde irregular. Producción de mucus. Elevación en superficie.	2	3,3
Opaca. Blanca. Crateriforme. Mucus bajo la superficie.	9	15
Opaca. Blanca. Centro seco. Borde irregular. Producción de mucus.	7	11,6
Opaca. Borde irregular. Aspecto arrugado. Mucus bajo la superficie.	6	10
Blanca. Mucoide. Centro elevado de distinta consistencia.	3	5
Circular. Opaca. Color amarillo-anaranjado. Borde regular. Colonia a nivel de superficie.	6	10
Circular. Opaca. Color blanco. Borde regular. Colonia a nivel de superficie.	5	8,3
Circular. Opaca. Color amarillo-anaranjado. Borde regular. Colonia a nivel de superficie.	4	6,6
Circular. Opaca. Color blanco. Borde regular. Colonia a nivel de superficie. Prominencia central	8	13,3
Circular. Opaca. Color blanco. Borde irregular. Centro elevado de aspecto arrugado. Mucus bajo la superficie.	5	8,3
Circular. Opaca. Color blanco. Borde irregular. Aspecto seco.	2	3,3
Circular. Opaca. Color blanco. Borde irregular. Aspecto rizoide. Producción de mucus.	3	5

El resultado de la identificación mediante las galerías BBL Crystal mostró que las cepas pertenecían al género *Bacillus*, principalmente a las especies *B. brevis*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*.
Veintidós de las 24 cepas estudiadas por PCR amplificaron un fragmento del gen del ADNr 16S específico del género *Bacillus*. El análisis de restricción presentó dos patrones de corte diferentes: uno coincidente con el perfil de *B. licheniformis* (6 cepas) y otro con el de *B. subtilis* (9 cepas); el resto de los amplicones no pudo ser digerido con *Alu*I.

CONCLUSIONES

Se ha puesto de manifiesto la presencia de *Bacillus* spp. en productos de panadería congelados.
La identificación de las cepas aisladas, llevada a cabo por métodos fenotípicos y genéticos, muestra que las especies más comunes son *B. brevis*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J. P. Smith et al., "Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products--a Review," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, no. 1 (2004): 19-55.
2. APHA, *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, ed. F. P. Downes and K. Ito. 4 ed. (Washington, D.C.: APHA, 2001).
3. X. Y. Wu et al., "Development of a Group-Specific PCR Combined With ARDRA for the Identification of *Bacillus* Species of Environmental Significance," *Journal of Microbiological Methods* 64, no. 1 (2006): 107-119.
4. H. Rosenkvist and A. Hansen, "Contamination Profiles and Characterisation of *Bacillus* Species in Wheat Bread and Raw Materials for Bread Production," *International Journal of Food Microbiology* 26, no. 3 (1995): 353-363.
5. I. B. Sorokulova et al., "Genetic Diversity and Involvement in Bread Spoilage of *Bacillus* Strains Isolated From Flour and Ropy Bread," *Letters in Applied Microbiology* 37, no. 2 (2003): 169-173.

P167 EVALUACIÓN DE ALGUNOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *PSEUDOMONAS* EN CARNE DE AVE

Carlos Alonso-Calleja, Elena del Río, Miguel Prieto y Rosa Capita
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071, León.
carlos.alonso.calleja@unileon.es.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En el género *Pseudomonas* se incluyen los principales microorganismos responsables de la alteración superficial de los alimentos proteicos almacenados en atmósferas aerobias en condiciones de refrigeración (Nychas *et al*., 2008). Por ello, existe la necesidad de cuantificar las poblaciones de estas bacterias, lo que habitualmente se hace, por razones prácticas, mediante siembra directa en agar *Pseudomonas* CFC (Ghafir *et al*., 2008). Este trabajo, que se ha llevado a cabo utilizando carne de ave procedente de un matadero del noroeste de España, ha tenido como objetivos determinar: 1) la selectividad del medio *Pseudomonas* CFC, 2) las especies de *Pseudomonas* presentes y 3) la utilidad de diferentes procedimientos para la identificación de estos microorganismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 50 muslos de pollo adquiridos inmediatamente después del sacrificio y el despiece en el matadero. Al cabo de 5 días de almacenamiento a 3±1º C se procedió al aislamiento de 50 colonias (1 colonia/muslo) en agar *Pseudomonas* con Cetrimida, Fucidina y Cefaloridina (CFC, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido). Para la identificación de las cepas se utilizaron las pruebas de tinción por el método Gram, actividad catalasa y actividad citocromo oxidasa. Las cepas que se correspondían con bacilos cortos Gram-negativos, catalasa positivos y oxidasa positivos se identificaron con el sistema API 20NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las cepas que mostraron resultados idénticos con el sistema miniaturizado se agruparon, identificándose una cepa de cada perfil con el sistema API 20E (bioMérieux) y mediante ribotipado. Para la adscripción a especie se emplearon las bases de datos APIweb ver. 7.0 (API 20NE) y APIweb ver. 4.1 (API 20E). Para el ribotipado se empleó el sistema automatizado

RiboPrinter® (Dupont Qualicon, Wilmington, DE, EE.UU.), usando el enzima de restricción *Eco*RI. Para la interpretación y análisis de los patrones de bandas generados se analizaron los resultados de la digitalización de la huella dactilar formada por el patrón de ribotipado. El número, posición e intensidad relativa de los fragmentos de DNA específicos fueron estimados automáticamente mediante análisis por el software del RiboPrinter®, obteniéndose un registro digital (256 valores numéricos) para cada cepa ensayada. Las distancias de agrupamiento entre patrones se estimaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson, y las cepas se agruparon mediante el algoritmo de Ward usando el programa informático Statistica® 6.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). Los agrupamientos se establecieron para aislamientos que presentaban valores inferiores a 0,3 en su distancia de agrupamiento (1-Pearson r). Este valor se estableció en base a los resultados de un análisis previo de los perfiles de ribotipado de dos cepas bacterianas en tres geles diferentes (Capita *et al*., 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo que respecta a la selectividad del medio *Pseudomonas* CFC, de las 50 cepas aisladas únicamente 17 (34%) se adscribieron a este género tras las pruebas de caracterización, obteniéndose, por lo tanto, un 66% de falsos positivos. Este porcentaje es superior a los observados en la mayoría de los trabajos consultados llevados a cabo con carne de ave (Arnaut-Rollier *et al*., 1999). La mayor parte de los aislamientos realizados a partir de *Pseudomonas* CFC (28 cepas; 56%) se correspondieron con bacterias Gram-negativas oxidasa negativas, un pequeño porcentaje (4 cepas; 8%) con bacterias Gram-positivas y una cepa (2%) se adscribió al género *Aeromonas*. Estos grupos microbianos son coincidentes con los hallazgos de otros autores. Los antibióticos que contiene el medio *Pseudomonas* CFC (cetrimida, fucidina y cefaloridina) se consideran buenos agentes selectivos para el aislamiento de *Pseudomonas*, habiéndose observado su capacidad para inhibir el desarrollo de la mayoría de las enterobacterias, de las bacterias Gram-positivas, y del grupo de mohos y levaduras (Mead y Adams, 1977). Sin embargo, estos antibióticos permiten el crecimiento de algunos grupos microbianos diferentes a *Pseudomonas* spp. Así, al igual que en el presente estudio, también otros autores han observado la presencia en este medio de algunas colonias de enterobacterias al estudiar diferentes alimentos de origen animal (Flint y Hartley, 1996; Salvat *et al*., 1997). También, al igual que nosotros, otros investigadores han aislado a partir de *Pseudomonas* CFC cepas de bacterias Gram-negativas, oxidasa positivas fermentadoras, principalmente *Aeromonas* spp. (Anónimo, 1995).

Por lo que respecta a las especies de *Pseudomonas* detectadas, el API 20 NE permitió la adscripción de las cepas a las especies *Ps. putida* (10 cepas) y *Ps. fluorescens* (7 cepas), que se encuentran entre las más frecuentemente aisladas a partir de carne de pollo al cabo de varios días de almacenamiento en refrigeración en atmósferas aerobias, situándose entre los principales microorganismos alterantes de la carne (Tryfinopoulou *et al*., 2002; Hinton *et al*., 2004). La mayoría de los autores consultados señalan que no es tampoco infrecuente la detección de *Aeromonas* spp. en el alimento estudiado. Hay que señalar que la utilización del API 20E y de la técnica de ribotipado no permitieron mejorar la identificación realizada. Así, los mayores porcentajes de identificación se obtuvieron con el API 20NE, que además proporcionó una mejor discriminación, permitiendo la adscripción de cada cepa a una única especie.

La presencia de *Ps. putida* y de *Ps. fluorescens* en la carne de pollo es consecuencia de la presencia de estos microorganismos en el ambiente de las explotaciones o de las plantas de procesado (Craven y Macauley, 1993). Según Tryfinopoulou *et al.* (2002) la composición de la población de *Pseudomonas* en un alimento al cabo de varios días de almacenamiento suele ser un reflejo de la proporción inicial de cada especie. La variación en la duración de la fase de latencia o del tiempo de generación de las diferentes especies en cada alimento puede también contribuir a explicar la dominancia de unas u otras especies al final del periodo de almacenamiento.

CONCLUSIONES

1) El medio *Pseudomonas* CFC presenta una escasa selectividad para el aislamiento de estos microorganismos a partir de carne de pollo.

2) Las especies de *Pseudomonas* detectadas (*Ps. putida* y *Ps. fluorescens*) se encuentran entre las más frecuentemente aisladas por otros autores a partir de carne de pollo al cabo de varios días de almacenamiento.

3) El API 20NE mostró un mejor comportamiento que el 20E para identificar las cepas de *Pseudomonas* (mayores capacidad de discriminación y porcentaje de identificación). Asimismo, se consideran más satisfactorios los resultados conseguidos con el API 20NE que con el RiboPrinter®, dada la superior probabilidad de identificación y el menor coste económico de la primera técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anónimo (1995). *Pseudomonas* agar base, pp 2/177-2/178. En: *The Oxoid Manual*. Oxoid Ltd., Hampshire.

Arnaut-Rollier, I., De Zutter, L. y Van Hoof, J. (1999). Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International Journal of Food Microbiology* 48, 87-96.

Capita, R., Alonso-Calleja, C. y Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1366-1375.

Craven, H.M. y Macauley, B.J. (1993). Microorganisms in pasteurised milk alter refrigerated storage. 1. Identification of types. *Australian Journal of Dairy Technology* 47, 38-45.

Flint, S. y Hartley, N. (1996). A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas* species that cause spoilage of milk and dairy products. *International Dairy Journal* 6, 223-230.

Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., De Zutter, L. y Daube, G. (2008). Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork and poultry meat in Belgium. *Journal of Food Protection* 71, 35-45.

Hinton, A., Cason, J.A. y Ingram, K.D. (2004). Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology* 91, 155-165.

Mead, G.C. y Adams, B.W. (1977). A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads with poultry meat spoilage. *British Poultry Science* 18, 661-670.
Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. y Koutsoumanis, K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78, 77-89.
Salvat, G., Rudelle, S., Humbert, F., Colin, P. y Lahellec, C. (1997). A selective medium for the rapid detection by an impedance technique of *Pseudomonas* spp. associated with poultry meat. *Journal of Applied Microbiology* 83, 456-463.
Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E. y Nychas, G.J.E. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1), 65-72.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen la subvención concedida por el Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS 04-0722).

PROBIÓTICOS

COMUNICACIONES ORALES

O96 EFICACIA DEL *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS* EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN POBLACIÓN DE EDAD AVANZADA

Marco Antonio Moro[1], Rebeca Alonso[2], Isabel Cuevas[1], Celina Quirós[1], Juan Saavedra[3] y Carlos López[2]
[1]*Centro Nacional de Competencia Tecnológica de la Leche (CNCT-Leche). Calle del Rosal, 7 bis, 33009, Oviedo*
marcomg@ficyt.es
[2]*Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias. Calle Julián Clavería, s/n, 33006, Oviedo.*
[3] *Atención Primaria Área Sanitaria VI. Servicio de Salud del Principado de Asturias.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los probióticos son microorganismos no patógenos que ejercen una influencia positiva sobre la salud o la fisiología del huésped al ser ingeridos. Entre las propiedades beneficiosas de estos microorganismos se encuentra su actividad inmunomoduladora. A lo largo de la vida se produce un envejecimiento del sistema inmune que ocasiona un deterioro de su capacidad defensiva que se conoce como inmunosenescencia y que implica una serie de modificaciones tanto en la respuesta innata como adaptativa. Este proceso se caracteriza fundamentalmente por (1) la limitación del repertorio de los linfocitos T y la acumulación de células oligoclonales de memoria efectora dirigidas frente a agentes infecciosos ubicuos; (2) la involución tímica y desaparición de células "naïve"; y (3) un estado inflamatorio crónico. El mecanismo basal de esta falta de memoria inmunológica no se conoce pero tiene gran importancia desde un punto de vista clínico, particularmente la disfunción de la respuesta inmune humoral responsable de la eficacia de la vacunación. Existe una clara asociación entre la funcionalidad del sistema inmune y la longevidad de los individuos, encontrándose considerables evidencias de que la inmunosenescencia implica mayor morbilidad y mortalidad. En este sentido, evitar o retrasar el deterioro del sistema inmune se considera decisivo para conseguir un mejor estado general y una mayor longevidad. En este proyecto se pretende evaluar las posibles propiedades beneficiosas sobre la respuesta inmune en individuos ancianos de una cepa seleccionada in vitro de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. La supervivencia de determinadas cepas de esta especie bacteriana al tránsito intestinal ha sido demostrada, así como su gran capacidad de resistir condiciones ambientales adversas. Estas características, junto con el origen de las bacterias, aisladas en una región de Bulgaria donde la población presenta características inusuales de longevidad nos llevan a postular sus posibles efectos favorables sobre el sistema inmune.

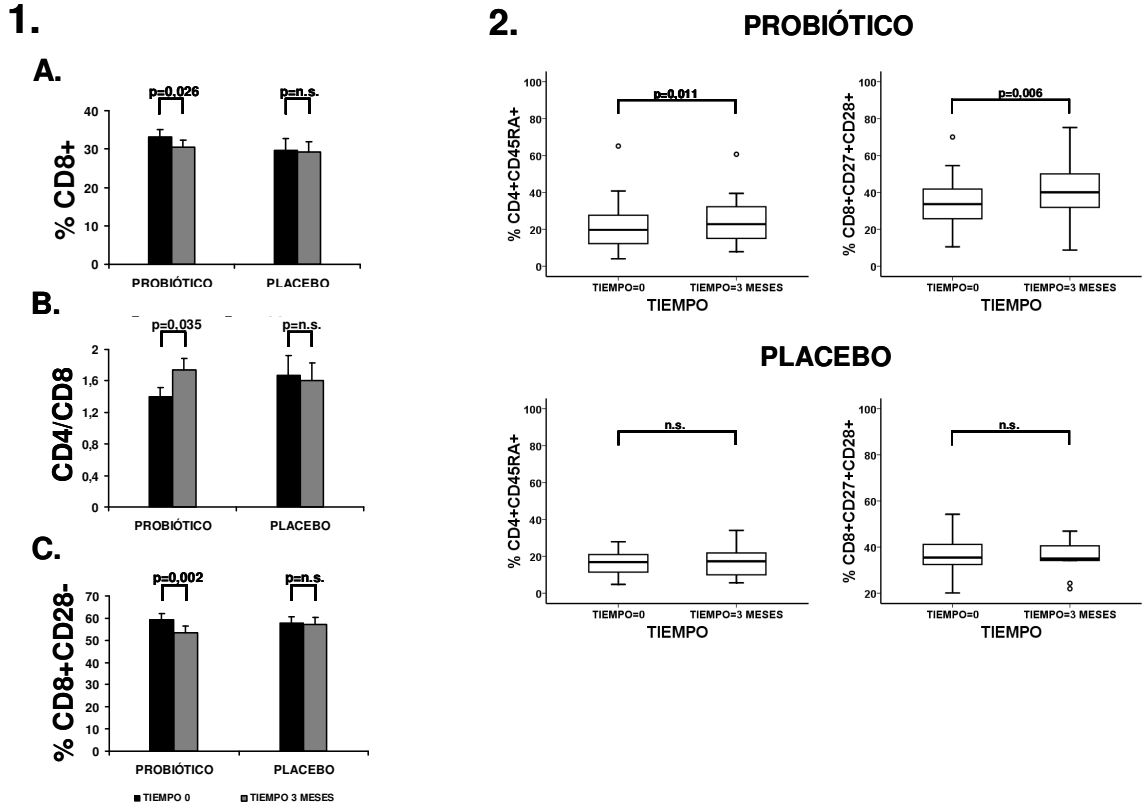
MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 42 sujetos con edad superior a 65 años sin una patología inmunológica de base y atendidos en el área sanitaria VIII del Principado de Asturias. Los voluntarios se dividieron en dos grupos (probiótico, n=26; placebo, n=16). El diseño fue idéntico a un ensayo clínico: prospectivo, doble ciego, controlado con placebo. A los individuos en estudio se les administraron 3 cápsulas al día, tanto de probiótico como de placebo, durante un periodo de 3 meses. Se evaluó la función celular mediante fenotipado de subpoblaciones celulares por citometría de flujo: linfocitos T (CD3+, CD4+, CD8+), linfocitos B (CD19+), células NK (CD16+, CD56+), marcadores de memoria y de senescencia celular (CD28+, CD27+, CD45RA+, CD45RO+, CD31+, NKG2D+). Todas estas determinaciones se realizaron a tiempo 0 y 3 meses.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias en la distribución de las poblaciones de linfocitos B y NK en ninguno de los dos grupos. En los individuos que tomaron el probiótico se encontró una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T CD8+ (Figura 1A), que se reflejó en un aumento, también significativo, del cociente CD4/CD8 (Figura 1B). La inversión de este cociente (CD4/CD8<1) es uno de los principales parámetros que definen el perfil de riesgo inmunológico (IRP) que relaciona el envejecimiento del sistema inmune con morbilidad y mortalidad a los dos años. Otro de los parámetros que define el IRP es el porcentaje de la subpoblación de células de memoria CD8+CD28-, cuyo aumento se relaciona directamente con el proceso de inmunosenescencia. Observamos una disminución significativa en el porcentaje de esta población a los tres meses de tomar el probiótico (Figura 1C), mientras que los niveles se mantuvieron estables en los individuos del grupo placebo. Cuando se analizaron las frecuencias de células naïve, que aún no han entrado en contacto con el antígeno, encontramos un aumento significativo en el porcentaje de la subpoblación CD4+CD45RA+ (Figura 2). Dentro de

la población de linfocitos T CD8+ encontramos diferencias significativas en la población CD27+CD28+, que representa un grupo de células poco diferenciadas, necesaria para poder enfrentarse a nuevos patógenos (Figura 2).



Entre los efectos inmunomoduladores descritos por la acción de los probióticos se encuentran también la inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatorias. Éstas podrían estar directamente implicadas en el fenotipo y la inmunocompetencia de las células del sistema inmune, siendo las responsables del grado de diferenciación de las distintas subpoblaciones, así como del patrón de migración de las células dendríticas o de la producción de células T reguladoras.

CONCLUSIONES

La inmunomodulación producida por nuestro probiótico podría favorecer el mantenimiento de una adecuada respuesta inmunológica, frenando el envejecimiento de las subpoblaciones de linfocitos T e incrementando el número de células inmaduras potencialmente respondedoras. Estos resultados deberán ser confirmados en un mayor número de individuos sometidos a un tiempo de ingesta del probiótico más prolongado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ferguson, F. G., A. Wikby, et al. (1995). "Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors." J Gerontol A Biol Sci Med Sci 50(6): B378-82.

Donnet-Hughes, A., F. Rochat, et al. (1999). "Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose." J Dairy Sci 82(5): 863-9.

Olsson, J., A. Wikby, et al. (2000). "Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study." Mech Ageing Dev 121(1-3): 187-201.

Marcos, A., J. Warnberg, et al. (2004). "The effect of milk fermented by yogurt cultures plus Lactobacillus casei DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress." Eur J Nutr 43(6): 381-9.

del Campo, R., D. Bravo, et al. (2005). "Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers." Appl Environ Microbiol 71(1): 547-9.

Hadrup, S. R., J. Strindhall, et al. (2006). "Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly." J Immunol 176(4): 2645-53.

Castellazzi, A. M., C. Valsecchi, et al. (2007). "In vitro activation of mononuclear cells by two probiotics: Lactobacillus paracasei I 1688, Lactobacillus salivarius I 1794, and their mixture (PSMIX)." Immunol Invest 36(4): 413-21.

So, J. S., C. G. Lee, et al. (2008). "Lactobacillus casei potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis." Mol Immunol 46(1): 172-80.

POSTERS

P103 CAPACIDAD INMUNOMODULADORA Y ADHESIÓN A CÉLULAS INTESTINALES DE BAL AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO

Montserrat Nácher-Vázquez[1], Jordi Cerveró[2], Mª Luisa Gil[2], Daniel Gozalbo[2], Celia Murciano[2], Gloria Sánchez[1] y Rosa Aznar[1,2]

[1]*Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimento (IATA, CSIC). Av. Agustín Escardino, 7. 46980 Paterna. Valencia.*
montsemv@iata.csic.es
[2]*Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València. Av. Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot. Valencia.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los probióticos actualmente utilizados en alimentos funcionales se reducen a algunas cepas pertenecientes a estirpes de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus,* generalmente de origen intestinal. Muchas de ellas, al igual que los cultivos estárter del yogur, producen exopolisacáridos (EPSs) y se ha sugerido que el efecto beneficioso para la salud humana de estos microorganismos, puede estar relacionado con la actividad biológica antitumoral, antiinflamatoria, inmunomoduladora y reductora de los niveles de colesterol de estos biopolímeros prebióticos. Junto a la resistencia al estrés gástrico, la capacidad de adhesión a la mucosa intestinal es otra característica importante de las bacterias probióticas. En este contexto los EPSs producidos y secretados por las bacterias lácticas (BAL) parecen estar implicados en el reconocimiento celular y en la formación de biofilms facilitando así la colonización bacteriana y protección frente a hábitats hostiles (Ruas-Madiedo et al., 2002). Sin embargo, muchas de las bacterias probióticas son incapaces de colonizar el intestino y deben ser ingeridas con regularidad para que persista cualquier propiedad favorable para la salud.

Los productos enriquecidos con probióticos se encuentran a la cabecera en el mercado de alimentos funcionales y, en este sentido, las BAL son de especial interés para la industria alimentaria debido a su condición GRAS (Generally Recognised As Safe). Con el fin de aumentar la diversidad de cultivos probióticos, actualmente se encuentran en estudio cepas de BAL aisladas de otros ecosistemas (Fernández de Palencia et al., 2009). El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad inmunomoduladora y de adhesión a enterocitos de BAL, aisladas de productos cárnicos, y previamente seleccionadas como potenciales probióticos por su capacidad para sintetizar exopolisacáridos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado con 10 cepas aisladas de productos cárnicos: 1 *Lb. brevis,* 3 *Lb. curvatus,* 3 *Lb. plantarum,* 1 *Lb. sakei* y 2 *Leuconostoc mesenteroides.*

a) Ensayos de producción de citocinas. Los ensayos de estimulación se realizaron, por triplicado utilizando una concentración de $2{,}3x10^5$ macrófagos por pocillo y $5x10^5$ BAL, fijadas en paraformaldehído, tras un tiempo de exposición de 24 h. Se determinaron los niveles de citocinas producidas, TNF-α (proinflamatoria) e IL-10 (reguladora/antiinflamatoria), mediante ELISA utilizando los kits de eBioscience y siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los ensayos se incluyó Zymosan como control positivo de estimulación.

b) Capacidad de adhesión a enterocitos. Se ensayaron tres niveles de concentración bacteriana, siguiendo los procedimientos previamente publicados (Cammarota et al., 2009), y dos líneas celulares, Caco-2 y HT-29, derivadas de carcinoma de colón. Ambas líneas celulares se mantuvieron en cultivo durante 15 días para obtener su diferenciación y polarización.

Se utilizaron cultivos bacterianos en MRS en fase logarítmica (O.D. 600 nm <1), resuspendidos en medio DMEM (sin antibióticos). Los ensayos de adhesión se realizaron por triplicado, manteniendo un pocillo como control. Tras incubación de 1 hora a 37ºC, en cámara con 5% de CO_2, los pocillos fueron sometidos a 3 lavados en PBS. La capacidad de adhesión se determinó por recuento en placa (MRS), tras tripsinización, expresándose en porcentaje con respecto al control sin lavar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la capacidad inmunomoduladora, como primera aproximación se han estimado los niveles de producción de TNF-α e IL-10 por macrófagos peritoneales de ratón, como citocinas indicadoras de una respuesta (proinflamatoria y antiinflamatoria/reguladora, respectivamente). Los niveles (media de los triplicados) de IL-10 producidos tras estimulación por los aislados de cárnicos oscilaron entre 55 y 1.278 pg/ml y los de de TNF-α entre 223-3.184 pg/ml: (IL-10, TNF-α) *Lb. curvatus* MMB7 (328, 674), M44 (428, 1.132), MMH(2A)5 (1.278, 2.626), *Lb. brevis* M49 (338, 412), *Lb. sakei* MMH(2M)2 (278, 1.806), *Lc. mesenteroides* RTF10 (55, 223), RTB1 (392, 3.184), *Lb. plantarum* MMB2 (120, 669), MMD10 (209, 2.136), MMA14 (223, 2.485). En la Figura 1, se representa la relación IL-10/TNF-α de los valores de citocinas producidos.

En cuanto a la adhesión, en la Figura 1 se representa el porcentaje de adhesión a células Caco-2 observándose que las distintas especies de *Lactobacillus* ensayadas poseen mayor adhesión a células Caco-2 (2-5%) que los *Leuconostoc mesenteroides* (0,2-1,5%). Este resultado se confirmó en ensayos con células HT-29 para las cepas *Lb. plantarum* MMD10, *Lb. sakei* MMH(2M)2 y *Lc. mesenteroides* RTF10 y RTB1. Las tres cepas de *Lb. plantarum* presentaron un nivel de adhesión del 5% a Caco-2, coincidiendo con *Lb. sakei*, *Lb. brevis* y una de las cepas de *Lb. curvatus* (MMB7). Estos valores se encuentran en el rango descrito para bacterias lácticas (Cammarota et al., 2009).

CONCLUSIONES

De las cepas evaluadas, *Lb. brevis* M49 presenta los mejores resultados de adhesión e inmunoestimulación, seguida por *Lb. curvatus* MMB7, *Lb. plantarum* MMB2 y *Lb. sakei* MMH(2M)2. Estas cepas son candidatos para futuros ensayos "in vivo".

Especies y cepas ensayadas
Lactobacillus brevis M49
Lactobacillus curvatus M44, MMB7, MMH(2A)5
Lactobacillus plantarum MMA14, MMB2, MMD10
Lactobacillus sakei MMH(2M)2
Leuconostoc mesenteroides RTF10, RTB1

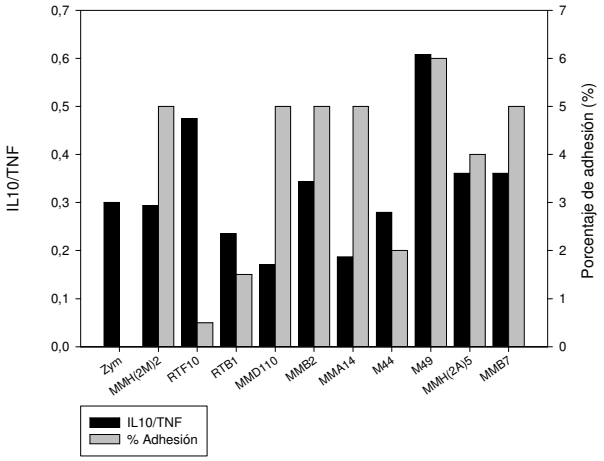


Figura 1. Producción "in vitro" de citocinas por macrófagos murinos, expresada como la relación IL10/TNF-α, en respuesta a las distintas cepas BAL ensayadas, y adhesión a células Caco-2 de dichas cepas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Fernández de Palencia, P., Werning, M.L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M.T., Irastorza,Corbí, A.L., López, P. (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-β-D-glucan producer *Pediocus parvulus* 2.6. Appl. Environ. Microbiol. Appl. Environ. Microbiol. 75, 4887-4891.
Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 12,163-171.
Cammarota, M., De Rosa, A., Stellavato, A., Lamberti, M., Marzaioli, I., Giuliano, M. (2009). *In vitro* evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: Emphasis on innate immunity. Int. J. Food Microbiol. 135, 90–98.

P106 RESISTENCIA A ESTRÉS GÁSTRICO DE PEDIOCOCCUS PARVULUS Y LACTOBACILLUS *SUEBICUS* PRODUCTORES DE (1->3,1->2)-BETA-D-GLUCANO TRAS SU ADICIÓN A ALIMENTOS

Patricia Elizaquível[1], Jordi Cerveró[1], Montserrat Nácher-Vázquez[2], Maria Teresa Dueñas[3], Gaizka Garai-Ibabe[3], Pilar Fernández de Palencia[4], Paloma López[4] y Rosa Aznar[1,2]
[1]*Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València. Av. Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot. Valencia.*
[2]*Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimento (IATA, CSIC). Av. Agustín Escardino, 7. 46980 Paterna. Valencia.*
[3]*Departamento de Química Aplicada. Facultad de Química. Universidad del País Vasco. Apdo. 20080 San Sebastian.*
[4]*Centro de Investigaciones Biológicas CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. 28006 Madrid.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Ciertos expopolisacáridos (EPS) de origen microbiano como el (1->3)-β-D-glucano, presentan efectos beneficiosos para la salud como son: reducción del colesterol, actividades antitrombóticas, antitumorales o inmunomoduladores o efectos prebióticos (de Vrese M. y Schrezenmeir, 2008). Entre los productores de β-D-glucanos, las bacterias lácticas (BAL) son de especial interés para la industria alimentaria debido a su condición GRAS (Generally Recognised As Safe). La producción de (1->3, 1-> 2)-β-D-glucano ha sido descrita en aislados de sidra de *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus suebicus*, y se ha demostrado la capacidad inmunomoduladora y de resistencia a estrés gástrico de *P. parvulus* 2.6 (Fernández de Palencia et al., 2009). No obstante, la resistencia a estrés gástrico puede variar en función del alimento que se utilice como vehículo para su administración por vía oral. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la resistencia al estrés gástrico (G) y estrés gastrointestinal (GI) de cepas de *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus suebicus,* productoras de (1->3, 1->2)-β-D-glucano, a partir de cultivos líquidos y tras su incorporación en la fabricación de tres tipos de alimento (yogur, zumo de naranja y mezcla zumo-leche).

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se han incluido tres aislados de sidra ahilada y productores de (1->3, 1-> 2)-β-D-glucano: *P. parvulus* 2.6, *P. parvulus* CUPV22 y *Lb. suebicus* CUPV221. Se cultivaron en medio MRS, a 30 ºC durante 48 h. Los alimentos ensayados, yogur, zumo de naranja y zumo-leche (50 % zumo de naranja, 20 % leche desnatada, 22.2 % agua, 0.3 % de pectina y 7.5% de azúcar) se inocularon con alrededor de 10^8 ufc/ml. Para la elaboración del bio-yogur se utilizó leche desnatada y el inóculo comercial YoMix (Danisco), adicionándose cada una de las cepas en estudio, por separado. En todos los casos, se tomaron alícuotas de 15 ml para someterlas a la simulación de estrés gástrico y gastrointestinal según el modelo *in vitro* del tracto digestivo adaptado de Fernández de Palencia y cols. (2009) como se muestra en la Figura 1. La supervivencia se determinó mediante recuento en placa de MRS, a 30 ºC durante 48 h.

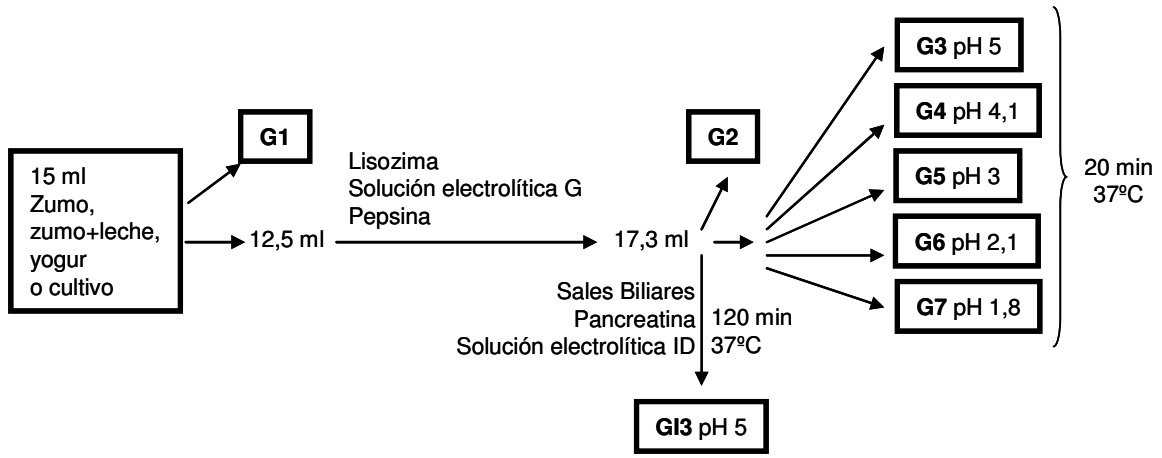


Figura 1. Esquema del modelo *in vitro* para la simulación del estrés gástrico y gastrointestinal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se muestran los resultados de los recuentos obtenidos para las tres cepas ensayadas tanto en cultivo puro como en los tres tipos de alimento. En cultivo puro, *P. parvulus* CUPV22 y *Lb. suebicus* CUPV221 resisten el estrés gástrico (G), hasta pH 3, y el gastrointestinal (GI). *P. parvulus* 2.6 resiste G hasta pH 2,1 pero no GI. Sin embargo, la incorporación de *P. parvulus* 2.6 en yogur y en mezcla zumo-leche, aumenta su resistencia a GI, e incluso a G (pH 1,8) en zumo de naranja. *P. parvulus* CUPV22 soporta el GI tras su incorporación en todos los alimentos mientras que resiste el G a los pH más bajos en zumo-leche y zumo de naranja. En el caso de *Lb. suebicus* CUPV221, se observa un notable aumento de su resistencia a estrés G y GI tras su incorporación a zumo de naranja, aunque no resiste a los pHs más bajos (2,1 y 1,8). Cabe destacar la ausencia de crecimiento de *Lb. suebicus* CUPV221 en las muestras de estrés G y GI tras su incorporación a yogur y mezcla zumo-leche.

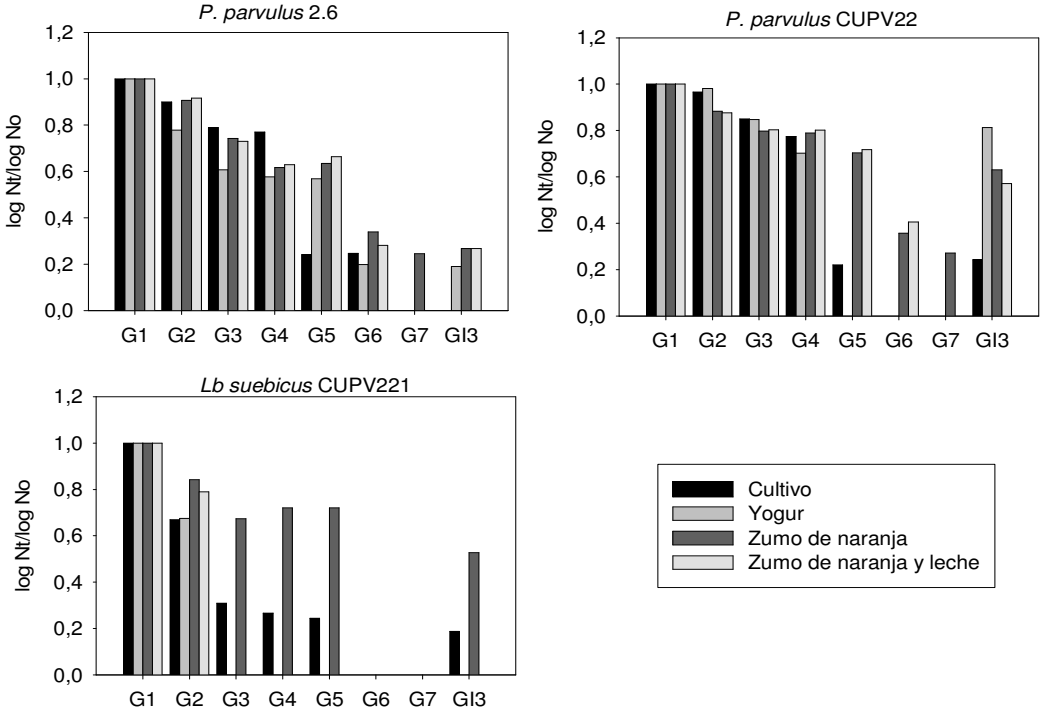


Figura 2. Análisis de la supervivencia al estrés gástrico (G) y gastrointestinal (GI) de las tres cepas ensayadas en cultivo puro, y tras su incorporación a yogur, zumo de naranja, y mezcla zumo-leche mediante recuento en placa (MRS, 48 h 37ºC). Nt, recuento en placa tras el tratamiento; No, recuento inicial (G1).

CONCLUSIONES

La incorporación de las cepas en estudio en zumo de naranja, parece tener un efecto de aclimatación a pH ácido, mejorando su supervivencia a estrés gástrico y/o gastrointestinal, por lo que parece la mejor opción. Además, se observado un efecto protector para *P. parvulus* CUPV22 y 2.6, a estrés gástrico en zumo-leche y a estrés gastrointestinal en yogur, especialmente para *P. parvulus* CUPV22.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De Vrese M. & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv.Biochem.Eng Biotechnol., 111,* 1-66.

Fernández de Palencia, P., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Duenas, M. T., Irastorza, A., Corbi, A. L., Lopez, P. (2009). Probiotic properties of 2-substituted (1,3)-b-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Appl.Environ.Microbiol., 75,* 4887-4891.

P107 NUEVA ESTRATEGIA EN EL CONTROL DEL ESTADO SANITARIO DE LOS CARACOLES. PRIMEROS RESULTADOS.

M. Angeles Calvo, María Rodríguez, Lidia Domínguez, E.Leonardo Arosemena, Gisela Girmé, Carles Adelantado y Lucía Pérez
Grup de Recerca en Microbiologia Aplicada i Medi-ambiental. Facultad de Veterinaria. UAB. Bellaterra (Barcelona)
mariangels.calvo@uab.cat

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Entre los problemas detectados en la producción del caracol destacan los relacionados con su salud. Con el fin de establecer el estado sanitario de los caracoles y proponer una nueva estrategia para su control, en el Departamento de Sanitat i Anatomia Animals de la UAB, se está desarrollando una investigación, para establecer la microbiota habitual de los caracoles así como su comparación entre lotes de animales sanos y animales con procesos patológicos, con el fin de poder seleccionar cepas favorables presentes en los caracoles sanos que puedan tener aplicación como probióticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La especie de caracol con la que se ha trabajado es *Helix aspersa* Müller

Ejemplar de *Helix aspersa*

Huevos de *Helix aspersa*

A partir de heces obtenidas de lotes de caracoles sanos así como de lotes con evidentes síntomas de enfermedad, procedentes en ambos casos de granjas de producción, se ha procedido a la homogenización y preparación de las mismas, con el fin de realizar un banco de diluciones decimales que permitan establecer los recuentos y la presencia de dos grupos representativos de bacterias, como son las bacterias lácticas y las *Enterobacteriaceae.*

Obtenidas las cepas se procedió al aislamiento e identificación de cepas lácticas presentes exclusivamente en animales sanos, con el fin de poder seleccionarlas como posibles probióticos, en base a los criterios establecidos internacionalmente.

Posteriormente, se procedió a adicionar una suspensión valorada de la cepa al agua de riego de los caracoles, con el fin de observar el efecto que la administración de esta cepa probiótica pudiera tener sobre la microbiota de los caracoles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos, podemos destacar una menor carga de bacterias lácticas, consideradas beneficiosas y una mayor concentración de *Enterobacteriaceae,* causantes de procesos digestivos, en el caso de caracoles con sintomatología clínica, en comparación con las detectadas en caracoles con un correcto estado sanitario. A partir de las cepas lácticas aisladas y comprobada su inocuidad, para los caracoles, se ha procedido a humedecerlos diariamente con agua enriquecida con una cepa de *Lactobacillus,* aislada de caracoles sanos. Con el fin de comprobar la eficacia del tratamiento se han mantenido lotes control a los que se humedecía con agua sin adición del microorganismo. Diariamente, se ha cuantificado el número de bajas y el de puestas, tanto en los lotes tratados como en los lotes control.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos, hasta el presente, pone en evidencia el efecto positivo detectado en los grupos de caracoles tratados con *Lactobacillus*, en comparación con los controles, dado que se detecta en términos generales, una menor mortalidad y un mayor número de puestas en el primero que en segundo. Asimismo se ha elaborado pienso al que se adiciona la cepa láctica seleccionada, a una concentración del orden de 10^9 UFC/g (*Lactobacillus* por gramo de pienso) y que se suministra a lotes de caracoles.

En este caso, podemos indicar que el pienso no es rechazado por los caracoles y que tras su diario consumo, manifiestan un mejor estado sanitario general que los caracoles alimentados con el pienso control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Charrier, M.Y., Combet-Blanc, Y y Ollivier, B.- Bacterial flora in the gut of *Helix aspersa* : evidence for a permanent population with a dominant homolactic intestinal bacterium, *Enterococcus casseliflavus. 1998*. Can. J. Microbiol. 44: 20-27.

Charrier, M.Y., Fonty, G., Gaillard-Marinie, B., Ainouche, K. y Andant G.- Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum (Gasteropoda:Pulmonata).* 2006. Biological Research 39 (4): 669-681.

P127 EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO SELECTIVO DE *ENTROCOCCUS FAECIUM* Y *BACILLUS SUBTILIS* VAR. *AMYLOLIQUEFACIENS*

M. Angeles Calvo, María Rodríguez, Lidia Domínguez, E.Leonardo Arosemena, Carles Adelantado, Lucía Pérez y Cristina Lleal.
Grup de Recerca en Microbiologia Aplicada i Medi-ambiental. Facultad de Veterinaria. UAB. Bellaterra (Barcelona)
estebanleonardo.arosemena@uab.cat

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación, ha sido revisar las metodologías de aislamiento de *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* y *Enterococcus faecium*, cepas administradas como probióticos, con el fin de poder establecer un método que facilite la diferenciación de estas dos especies con las más comúnmente aisladas de las heces y muy directamente relacionadas con ellas como son *Bacillus subtilis* y *Enteroccus faecalis.*

MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de muestras de probiótico se procedió al aislamiento e identificación de las dos cepas en estudio: *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* y *Enterococcus faecium*. Asimismo se adquirieron a la CECT dos cultivos de referencia de *Bacillus subtilis* y *Enteroccus faecalis*, respectivamente, con el fin de comparar macroscópica y microscópicamente las especies y poder aportar una metodología con el fin de separar las cepas, en caso de aislarse simultáneamente de las heces.

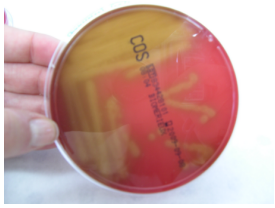
Las metodologías aplicadas podemos resumirlas en: aislamiento e identificación de las cuatro cepas en estudio, siembra en medios de cultivo para proceder a separar las cepas semejantes y evaluación de las actividades enzimáticas

RESULTADOS Y COMENTARIOS

a.- *Enterococcus faecium/ Entercoccus faecalis*

Las colonias de *Enterococcus faecium* presenten una similitud morfológica con las de *Enterococcus faecalis*. *E. faecium* manifiesta en Agar sangre α-hemólisis, en tanto que, en general, *E. faecalis* no es hemolítico.

Enterococcus faecalis (no hemolítica)



Enterococcus faecium (α-hemolítica)

Desarrollo de las cepas en agar sangre. Obsérvese la clara diferencia de capacidad hemolítica entre una y otra especie

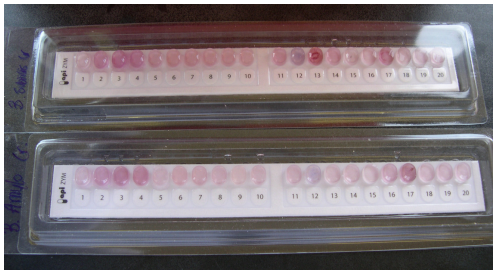
b.-*Bacillus subtilis* i *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*

Las dos cepas presentaron correcto desarrollo y muy semejante en Agar triptona soja (TSA), así como en agar almidón.

Al ensayar la actividad amilolítica, ésta se detecta en las dos cepas, por lo que no puede ser considerada una actividad diferencial entre ellas. Con el fin de profundizar en las actividades enzimáticas, se llevó a cabo el ensayo APY ZYM, obteniendo los perfiles enzimáticos que se aportan en la Fotografía siguiente.

Bacillus subtilis

B. var. *Amyloliquefaciens*



Se detecta una variación cualitativa y/o cuantitativa en la presencia de determinados enzimas que puede ser un buen sistema para diferenciar las dos cepas en estudio. La variación de color en cada uno de los ensayos realizados, determina la detección de la variación cualitativa o cuantitativa de los enzimas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Marguet, E., R., Vallejo, M. y Olivera N. L. *Virulence factors of* Enterococcus *strains isolated from ovine cheese. 2008*. Acta bioquím. clín. latinoam..42(4): 53-58

Ülger, C. y Çirako, C. α-Amylase production by *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* in different PEG solutions. 2004. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17(1): 93-94.

P129 PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE 12 CEPAS DE *LACTOBACILLUS REUTERI* PARA SU PONTENCIAL USO COMO PROBIÓTICOS EN EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS DE CERDO IBÉRICO

Ruiz-Moyano S., Martín A., Aranda E., Hernández A., Serradilla M.J., Casquete, R. y Córdoba M.G.
Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura (UEX). Carretera de Caceres s/n, 06007, Badajoz
srmsh@unex.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las bacterias probióticas son utilizadas en los alimentos por su capacidad de producir un efecto beneficioso sobre una o varias funciones del organismo. Los embutidos crudos curados son adecuados para llevar microorganismos probióticos debido a que son productos fermentados no calentados y pueden favorecer la supervivencia de las bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal. En trabajos previos, estas cepas de *L. reuteri* han mostrado una buena adaptación a las condiciones de maduración de estos productos, además de tolerar las condiciones de pH, sales biliares y enzimas pancreáticos del tracto gastrointestinal (Ruiz-Moyano y col. 2008). Sin embargo, para desarrollar sus efectos beneficiosos, los microorganismos probióticos además deben adherirse a la mucosa intestinal, al menos temporalmente. Esta capacidad está estrechamente ligada a los efectos positivos de los probióticos, así una persistencia más prolongada en el tracto intestinal da lugar a una mayor posibilidad de mostrar sus efectos metabólicos hacia bacterias perjudiciales, además de interacciones beneficiosas con la superficie de la mucosa. Por tanto, en los microorganismos probióticos, la capacidad de adhesión y persistencia en el intestino humano es una característica fundamental.

En este sentido, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la capacidad de adhesión al epitelio intestinal e inhibición competitiva de la adhesión de enteropatógenos de 12 cepas de *L. reuteri* adaptadas adecuadamente a las condiciones de los embutidos crudos curados y al tránsito gastrointestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

La adhesión de las cepas estudiadas a las células del intestino humano se realizó con células Caco-2 (ATCC HTB37) diferenciadas después de 15 días. Las células fueron crecidas en DMEM suplementado con un 20% de suero fetal vacuno, 1% de glutamina 200 mM, 1% de aminoácidos no esenciales y 100 U/ml de penicilina y estreptomicina. Para realizar el ensayo se añadió una suspensión de DMEM conteniendo 10^8 ufc/ml de bacterias. Después de 60 minutos las células fueron lavadas y lisadas posteriormente con una solución de Tritón X-100 al 0,05%. El número de bacterias adheridas se determinó en agar MRS. La adhesión de las BAL fue expresada como porcentaje de las bacterias viables adheridas respecto al número inicial de bacterias añadidas a las células Caco-2. *Escherichia coli* CECT 4267 y *L. acidophilus* ATCC 4356 fueron utilizados como cepas con una alta y baja capacidad de adhesión, respectivamente.

Además se estudió la inhibición competitiva de la adhesión de *E. coli* CECT 4267 y *Salmonella choleraesuis* CECT 4395. Para lo cual en primer lugar se realizó la adhesión de cada patógeno por separado. Posteriormente se llevo a cabo el ensayo de inhibición competitiva igual que el ensayo de adhesión añadiendo una suspensión de DMEM conteniendo 10^8 ufc/ml de una de las cepas de *L. reuteri* y 10^8 ufc/ml del *E. coli* o de *S. choleraesuis*. El número de bacterias adheridas se determinó en agar levine para *E. coli* y agar XLD para *S. choleraesuis*. La inhibición de la adhesión de las BAL fue calculada mediante la siguiente fórmula:

%Inhibición=(A/B)x100

A: ufc de *E. coli* CECT4267 o *S. choleraesuis* CECT4395 adheridas en la presencia de *L. reuteri*.

B: ufc de *E. coli* CECT 4267 o *S. choleraesuis* CECT 4395 adheridas en la ausencia de *L. reuteri*.

Cada ensayo de adhesión como de inhibición de adhesión fue realizado por triplicado con células de tres sucesivos pases. La enumeración de las bacterias adheridas se realizó por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de los microorganismos probióticos de adherirse a la mucosa intestinal, al menos temporalmente, es crucial ya que es en el intestino donde van a ejercer sus efectos beneficiosos. El empleo de la línea celular Caco-2 para estudiar la capacidad de adhesión de cepas probióticas ha sido evaluado frente a ensayos *in vivo*, demostrando una alta correlación entre ensayos *in vitro* con células Caco-2 y ensayos *in vivo* (Jacobsen y col. 1999). En nuestro estudio se pudo observar que 4 cepas de *L. reuteri* (P563, P519, P542 y P370) mostraron una muy alta capacidad de adhesión con porcentajes de adhesión superiores al 14%. Además, otras 4 cepas de *L. reuteri* (P503, P504, P561y P546) mostraron porcentajes de adhesión que no diferían en más de un 2% con respecto a un microorganismo con una alta capacidad de adhesión *E. coli* CECT 4267 (8.06±1.66%). Por último, el resto de cepas estudiadas mostraron una baja capacidad de adhesión con porcentajes de adhesión similares a *L. acidophilus* (0.78±0.21%) (Figura 1). Resultados similares fueron obtenidos por Jacobsen y col. (1999), que también encontró diferencias en la capacidad de adhesión entre cepas de la misma especie, siendo por tanto la capacidad de adhesión dependiente de la cepa.

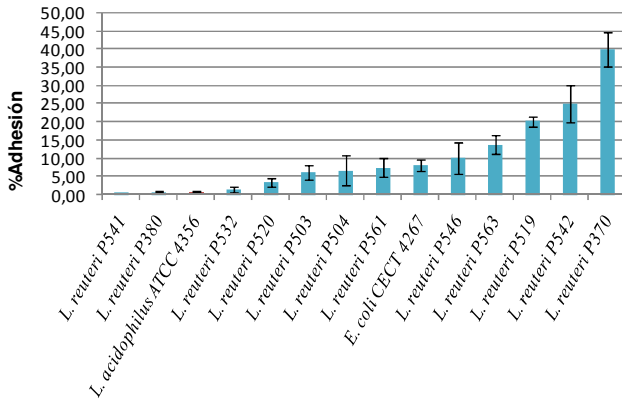


Figura 1. Porcentaje de adhesión de las 12 cepas de *L. reuteri.*

En base a los estudios *in-vitro* realizados aquellas cepas con una alta capacidad de adhesión (>6%) se seleccionaron para estudiar la exclusión competitiva de enteropatógenos, ya que la capacidad de adhesión es considerada el primer paso requerido para la colonización intestinal y es un prerrequisito fundamental para la exclusión competitiva de enteropatógenos (Forestier y col., 2001). Cinco cepas de *L. reuteri* (P503, P563, P561, P504 y P370) disminuyeron la adhesión de *E. coli* en porcentajes superiores al 35%, siendo la cepa *L. reuteri* P370 la que presentó una mayor capacidad de inhibición (44,7%). Así mismo, las cepas *L. reuteri* P542, P519 y P546, también mostraron una capacidad moderada de inhibir la adhesión de *E.coli*, 14,7%, 20,08%, 27,92% y 29,06%, respectivamente. Con respecto a *S. choleraesuis* dos cepas, *L. reuteri* (P561 y P370), presentaron una gran capacidad de inhibir su adhesión entorno a un 50%. Así mismo, las cepas *L. reuteri* (P504, P519, P503 y P542), mostraron una moderada capacidad de inhibir la adhesión de *S. choleraesuis* en porcentajes que variaban entre el 17% y 24%. De las cepas estudiadas, *L. reuteri* P370 y *L. reuteri* P561 presentaron una alta capacidad de inhibir a ambos patógenos, además 4 cepas de *L. reuteri* (P503, P504, P519, P542), fueron capaces de inhibir en diferentes porcentajes la adhesión de ambos patógenos. La inhibición parcial de la adhesión de bacterias patógenas a los receptores del epitelio intestinal puede dar lugar a disminución de la colonización intestinal de estas bacterias y en consecuencia modificar el proceso de patogenicidad.

CONCLUSIONES

Dos de las cepas estudiadas, *L. reuteri* P370 y P561, presentaron una alta capacidad de adhesión y de inhibir la adhesión de *E. coli* y *S. choleraesuis,* mostrando su capacidad para establecerse y competir con enteropatógenos en el tracto intestinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. y Joly, B., 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Research in Microbiology 152, 167-173.

Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. y Jakobsen, M., 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Applied and Environmental Microbiology 65, 4949-4956.

Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Pérez Nevado, F., Córdoba, M.G., 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. Meat Science 80, 715-721.

PRODUCTOS FERMENTADOS

COMUNICACIONES ORALES

O82 COMUNIDADES POLIMICROBIANAS EN LAS FERMENTACIONES DE ACEITUNAS: INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS BIOFILMS MIXTOS BACTERIAS LÁCTICAS-LEVADURAS

Jesús Domínguez Manzano✉ *y* *Rufino Jiménez Díaz*

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Padre García Tejero, 4, Aptdo. 1078, 41012 Sevilla.

✉*jdmanzano@ig.csic.es.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Entre las bacterias lácticas que fermentan alimentos se encuentra la especie *Lactobacillus pentosus*, responsable de la producción de un número considerable de vegetales fermentados, principalmente aceitunas de mesa, alimento de alto valor socioeconómico para la Comunidad Autónoma de Andalucía. Esta bacteria se encuentra formando parte de una microbiota muy diversa que comparte con ella nicho ecológico en las salmueras de fermentación (otras bacterias lácticas y levaduras). Puesto que se trata generalmente de fermentaciones abiertas y sin control microbiológico alguno (se basan en un procedimiento tradicional, empírico), sus conexiones e interrelaciones con

los otros microorganismos van a ser determinantes a la hora de asegurar el predominio de *L. pentosus* sobre éstos, así como su subsistencia a lo largo del proceso fermentativo, a fin de obtener un producto final aceptable, evitando el deterioro de los frutos (con el consabido beneficio económico que supone para la industria del sector) y dotándolo de unas características organolépticas únicas, que hacen que las aceitunas de mesa sean mundialmente apreciadas. Con objeto de aumentar nuestro conocimiento acerca del papel determinante de esta bacteria láctica en las fermentaciones de vegetales, es necesario conocer la *sociomicrobiología* de *L. pentosus*, entendiendo como *sociomicrobiología* sus relaciones con el entorno, principalmente con los microorganismos con los que comparte nicho ecológico y con los frutos objeto de la fermentación. Como una primera aproximación a este complejo estudio, el objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la capacidad de *L. pentosus* para formar comunidades polimicrobianas con otros microorganismos en condiciones naturales de fermentación de aceitunas de mesa, las etapas de formación de dichas comunidades y la arquitectura de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron aceitunas variedad Gordal, que se procesaron de acuerdo al método tradicional de elaboración (Garrido Fernández *et al.*, 1995). Una vez lavados, los frutos se colocaron en una salmuera del 11% (p/v), en fermentadores de polietileno (5 kg de frutos + 4 l de salmuera), introduciendo a la vez en dichos fermentadores varios portaobjetos alojados en unos contenedores de plástico que permitían la entrada y salida de las salmueras y, por tanto, de los microorganismos que las poblaban. Después de estar los frutos 48 h en salmuera, se inocularon los fermentadores con cultivos iniciadores de las siguientes cepas: *Lactobacillus pentosus* LPCO10, *L. pentosus* 128/2 y *L. pentosus* LPCO10 + *L. pentosus* 128/2, cada uno de ellos a una concentración final en el fermentador de 10^7 UFC/ml. A diferentes tiempos de fermentación se tomaban muestras de dichas salmueras y se sembraban en medios de cultivo sólido (MRS, MRS-azida al 1%, p/v y YM-gentamicina), haciendo el recuento e identificación de los microorganismos presentes. A la vez, se extraían portaobjetos y frutos de cada fermentador que se procesaban para su observación al microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-6460LV. Para la preparación de las muestras adheridas a los portaobjetos se siguió el protocolo de Kubota *et al.* (2008), mientras que para las de los frutos, se aplicó la metodología de Kroupitski *et al.* (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de desarrollo de los distintos microorganismos presentes en las salmueras a lo largo del tiempo de fermentación siguieron un patrón clásico: los cultivos iniciadores colonizaron rápidamente el medio y dominaron el proceso fermentativo hasta el final (3 meses), acompañados siempre de una población heterogénea de levaduras. Pero los resultados más interesantes y novedosos se derivaron de la observación al microscopio electrónico de barrido de los portaobjetos y la epidermis de los frutos, recogidos a diferentes tiempos del proceso de fermentación.

Los microorganismos comenzaban a adherirse a dichas superficies y empezaban a formar microcolonias, en las que se pueden apreciar la presencia tanto de levaduras como de bacterias. Dichas microcolonias iban creciendo en tamaño y número de microorganismos conforme avanzaba el la fermentación, llegando a formar biofilms que cubrían prácticamente toda la superficie del portaobjetos. Se pudo apreciar, al menos en las observaciones realizadas en los portaobjetos, que los microorganismos que componían los cultivos iniciadores jugarían un papel importante en la formación de los biofilms, ya que éstos se desarrollaron más rápidamente y de forma más completa cuando se utilizaron inóculos mixtos *L. pentosus* LPCO10 + *L. pentosus* 128/2, probablemente debido a fenómenos de coagregación entre cepas. Por otro lado, en la superficie de los frutos obtenidos a distintos tiempos de fermentación se pudieron observar comunidades polimicrobianas complejas, embebidas en una matriz, donde resultaba difícil adivinar la morfología de los microorganismos que las componen.

Una diferencia interesante entre los biofilms generados en los portaobjetos (superficie abiótica) y la superficie externa de la aceituna (superficie biótica) radica en la matriz polimérica que envuelve a los microorganismos. Mientras que en el primer caso ésta es inexistente, en la epidermis del fruto es copiosa y, como queda dicho, envuelve de tal forma a bacterias y levaduras que resulta imposible apreciar la naturaleza de sus componentes. Parece lógico pensar que esta diferencia sería consecuencia de un aporte mayor y más directo de nutrientes para los microorganismos.

En todas las micrografías realizadas se podía apreciar que los diferentes microorganismos que componen los biofilms aparecen unidos entre sí como si parte de sus paredes celulares se hubieran fusionado. Estas estructuras parece ser que son comunes en los biofilms aislados de ambientes naturales, en los que los microorganismos se unen entre sí por pilis para favorecer la aproximación entre ellos y lograr así una posición precisa que les permita realizar intercambios genéticos. En nuestro caso, no sabemos por el momento ni la naturaleza ni el papel que desempeñan tales fusiones en el desarrollo y mantenimiento de estos biofilms.

Por último, es interesante destacar cómo la pared celular de las levaduras que aparecen formando parte de biofilms con *L. pentosus* presentan numerosas protuberancias. Kawarai *et al.* (2007) han descrito una situación similar en cepas de levaduras que forman parte de consorcios mixtos con bacterias lácticas. Su hipótesis es que estas bacterias excretarían una sustancia que provocaría en la levadura una serie de alteraciones de la pared celular, lo que favorecería su anclaje a la superficie donde se va a desarrollar el biofilm. En nuestro caso, hemos comenzado los estudios precisos para dilucidar esta cuestión.

Estos trabajos van a tener continuidad en el futuro con vistas a determinar los factores implicados en la formación de comunidades microbianas complejas en las fermentaciones de aceitunas y su papel en el proceso fermentativo.

CONCLUSIONES

Los microorganismos presentes en la fermentación de aceitunas se encuentran preferentemente asociados en comunidades polimicrobianas complejas (biofilms), cuya estructura compleja se puede apreciar, sobre todo, en la epidermis de los frutos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Garrido Fernández *et al.*, 1995. Olive fermentations. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed. VCH, New York, pp. 593-627.

Kawarai *et al.*, 2007. Mixed-Species Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Rice Wine Yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 73: 4673-4676.

Kubota *et al.*, 2008. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. J. Biosci. Bioeng. 106: 381-386.

Kroupitski *et al.*, 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves Is Induced by Light and Involves Chemotaxis and Penetration through Open Stomata. Appl. Environ. Microbiol. 75: 6076-6086.

AGRADECIMIENTOS

Estas investigaciones se han desarrollado gracias a la concesión por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Proyecto AGL2009-08016, no habiéndose recibido incentivo alguno de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía para tales estudios. Agradecemos a Cristina Vaquero, del CITIUS, su inestimable ayuda en la observación de los biofilms al microscopio electrónico de barrido.

O83 CEPAS DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* Y *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* PROCEDENTES DE QUESOS TRADICIONALES ASTURIANOS

Elena Fernández, Ángel Alegría, Susana Delgado y Baltasar Mayo*

Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Carretera de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias.

ingmaraf@ipla.csic.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Lactococcus lactis es una especie bacteriana mayoritaria en leche y en muchos productos lácteos fermentados. No es casualidad, por tanto, que cepas de esta especie constituyan los componentes mayoritarios de los fermentos industriales. En la actualidad, la especie *L. lactis* se divide en tres subespecies: *lactis, cremoris* y *hordniae* (Schleifer y col., 1985). Esta última es lactosa negativa y se aisla únicamente de productos vegetales y del tracto intestinal de las termitas, y no parece intervenir en la fermentación de la leche. La distinción entre las subespecies *lactis* y *cremoris* es muy importante puesto que para determinados productos las cepas de *cremoris* parecen ser más indicadas, debido a su mayor capacidad acidificadora y por producir unos perfiles sensoriales típicos libres sabores y aromas extraños (Urbach y col., 1997). Sin embargo la diferenciación es difícil porque se basa en unas pocas pruebas fenotípicas para las que las cepas de la subespecie *cremoris* son negativas: hidrólisis de la arginina y crecimiento a 40ºC, en 4% de NaCl y a pH 9.2 (Schleifer y col., 1985; Rademaker y col., 2007). Para complicar más las cosas, algunas cepas con fenotipo *lactis* tienen un genotipo idéntico al de las cepas de la subespecie *cremoris* (Rademaker y col., 2007). Dado que en la actualidad la identificación de las bacterias lácticas de los productos fermentados tradicionales se lleva a cabo en su mayor parte por métodos moleculares, en los últimos tiempos se identifican cepas con genotipo *L. lactis* subsp. *cremoris* entre una mayoría con genotipo *L. lactis* subsp. *lactis*.

En este trabajo se han estudiado diversas propiedades fenotípicas y genotípicas de un grupo de 10 cepas con genotipo *cremoris* y se han comparado con las que presenta un grupo similar de 10 cepas con genotipo *lactis*. El objetivo es profundizar en el reconocimiento y la diferenciación de las subespecies y la evaluación de sus propiedades tecnológicas diferenciales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los aislados se han sometido a la serie de pruebas bioquímicas que se mencionaba anteriormente para determinar si el fenotipo se corresponde o no con su genotipo. Al mismo tiempo, se han estudiado también los perfiles de fermentación de carbohidratos (PhenePlate), los perfiles enzimáticos (API-ZYM) y los perfiles de resistencia/susceptibilidad a antibióticos (VetMic™). Las cepas de las dos subespecies se han tipificado mediante técnicas de RAPD y REP-PCR, y se han sometido a una tipificación más rigurosa por medio de la técnica "multilocus sequence typing" (MLST) con secuencias internas de los genes *atpA, pheS, rpoA, hcaT, pepN, pepXP* y el que codifica el ARNr 16S, tal y como describen Rademaker y col. (2007). Finalmente, se han estudiado las características de utilización de citrato, producción de acetoína, crecimiento en leche y la formación en este medio de compuestos aromáticos volátiles mediante cromatografía de gases.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para mayor seguridad, se verificó la identidad de las cepas bajo estudio mediante técnicas moleculares que incluían ARDRA parcial (Figura 1) y la posterior secuenciación y análisis de las secuencias. Excepto por tres cepas con genotipo *cremoris* que pudieran ser replicados, todas las demás cepas del estudio resultaron ser distintas mediante RAPD y REP-PCR (Figura 2A y 2B, respectivamente). Tanto esta tipificación, como la que se obtuvo mediante la técnica de MLST (Figura 2C), parece indicar que hay una gran diferencia genética entre las cepas de *lactis* y *cremoris,* dado que los grupos que forman las cepas de las dos subespecies presentan poca similitud entre ellos. Esta diferencia se ha cuantificado en otros trabajos entorno al 30% (Godon y col., 1992), Desde el punto de vista fenotípico, los perfiles de las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* resultaron ser muy parecidos a los de las cepas de *L.*

lactis subsp. *cremoris*. En general, las cepas de *cremoris* presentan una mayor capacidad fermentadora y más actividades enzimáticas. Así, seis de las 10 cepas fermentaron la xilosa, mientras que ninguna de las cepas de *lactis* la fermentaba. En cuanto a las actividades enzimáticas, las cepas de *cremoris* presentaron pequeñas actividades esterasa (C4) de la que carecían las cepas de *lactis*. Además, presentaban mayores niveles de actividad esterasa-lipasa (C8), fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y α-glucosidasa. Por el contrario, tres cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* presentaron una elevada actividad β-galactosidasa. Los perfiles de sensibilidad/resistencia a antibióticos no mostraron diferencias entre las cepas de *lactis* y *cremoris*. Las tres cepas similares de *L. lactis* subsp. *lactis* presentaron una elevada resistencia a tetraciclina (64 μg ml^{-1}), compatible con la presencia en esas cepas de un gen de resistencia a este antibiótico. En el póster se presentarán estos resultados y los de la evaluación tecnológica, que están siendo procesados en estos momentos.

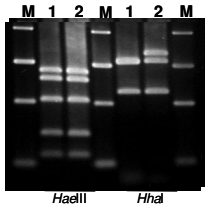


Figura 1. Perfiles de ARDRA de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (1) y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (2) tras digestión con *Hae*III and *Hha*I.

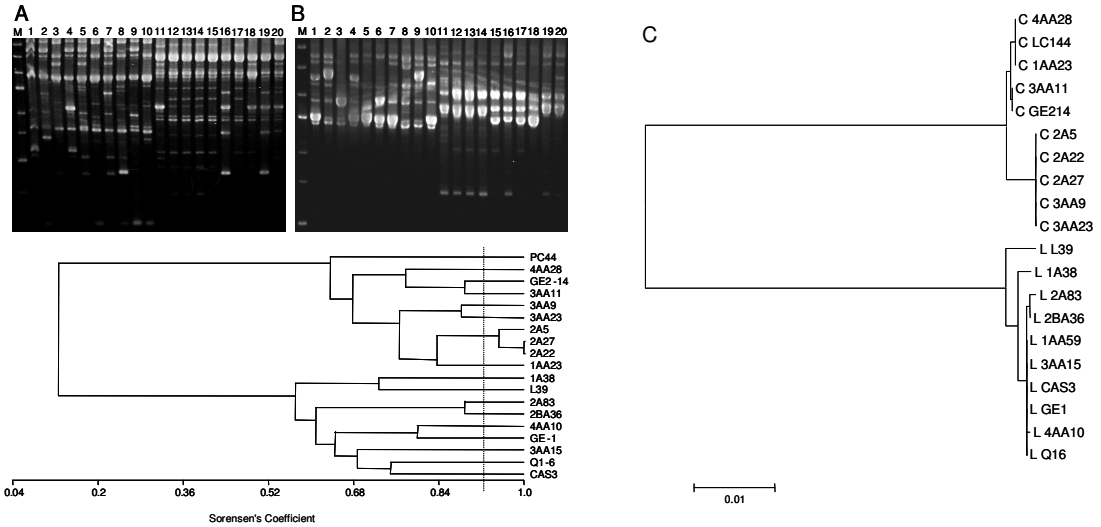


Figura 2. Perfiles de RAPD (A) y REP-PCR (B) y dendograma de similiaridad de las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* (1-10) y *L. lactis* subsp. *cremoris* (11-20). Panel C, dendograma de similaridad de los resultados de MLST; cepas con código L ó C pertenecen a *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, respectivamente.

CONCLUSIONES

1.- Las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y las de *L. lactis* subsp. *cremoris* son parecidas pero presentan notables diferencias fenotípicas y sobre todo genéticas; algunas de éstas pueden aprovecharse para su diferenciación selectiva.

2.- Para evaluar su contribución diferencial a los procesos de elaboración y maduración de quesos, se diseñarán elaboraciones controladas utilizando como fermento cepas de una u otra subespecie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Godon, J.-J., Delorme, C., Ehrlich, S. D., y Renault, P. 1992. Divergence of genomic sequences between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 4045-4047.

Rademaker, J. L. W., Hebert, H., Starrenburg, M. J. C., Naser, S. M., Gevers, D., Kelly, W. J., Hugenholtz, J., Swings, J., y van Hylckama Vlieg. 2007. Diversity analysis of dairy and non-dairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)5-PCR fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. 73: 7128-7137.

Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D., y Fisher, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. Nov. Syst. Appl. Microbiol. 6: 183-195.

Urbach, E., Daniels, B., Salama, M., Sandine, W. E., y Giovannoni, S. J. 1997. The *ldh* phylogeny for environmental isolates of *Lactococcus lactis* is consistent with rRNA genotypes but not with phenotypes. Appl. Environ. Microbiol. 63: 694-702.

O148 DETECCIÓN DE *DEBARYOMYCES HANSENII* POR TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL

Irene de la Casa, Alicia Rodríguez, Librada Jiménez, Rubén Gordillo y Mª Jesús Andrade

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad s/n, 10003, Cáceres.

mjandrad@unex.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Entre los principales grupos microbianos que se desarrollan durante el procesado de los productos cárnicos madurados se encuentran las levaduras, siendo *Debaryomyces hansenii* la especie más frecuentemente aislada tanto en embutidos como en jamón curado (Núñez y col., 1996; Encinas y col., 2000; Andrade y col., 2010). Debido a esto y a sus efectos sobre las características sensoriales de los productos cárnicos madurados, *D. hansenii* es la especie más usada como integrante de los cultivos iniciadores empleados en la industria cárnica, principalmente para la elaboración de embutidos crudos-curados. Tanto para la selección de *D. hansenii* como cultivo iniciador como para el control de su implantación durante la maduración de los productos cárnicos sería necesario disponer de métodos rápidos y precisos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aunque se disponen de métodos de PCR convencional para la detección de esta especie de levadura hasta el momento no se ha descrito ningún protocolo de PCR en tiempo real que se caracteriza por una mayor sensibilidad y rapidez de detección. El objetivo de este trabajo es, por tanto, el diseño de un método de PCR en tiempo real para la detección de *D. hansenii* que posteriormente pueda ser aplicado para controlar su implantación en los productos cárnicos madurados.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se han empleado 14 cepas de levaduras, pertenecientes a *D. hansenii* y a otras especies de interés en alimentos, obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo. Además se utilizaron 7 aislados de levaduras de jamón curado de cerdo ibérico (Tabla 1). La extracción del ADN de estas cepas se realizó usando la metodología descrita por Querol y col. (1992). El producto amplificado en los aislados de jamón curado con los cebadores CO2F1 y CO2R1, basados en los genes que codifican para la región del COX2 (Tsui y col., 2008), se purificó y secuenció (Instituto de Biomedicina, CSIC, Valencia). Las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) y se diseñaron 5 cebadores específicos, utilizando el programa Primer Express® v. 3.0 (Applied Biosystems) (Tabla 2), para el desarrollo de varios protocolos de PCR en tiempo real con metodología SYBR Green. A continuación se ensayaron diferentes combinaciones de los cebadores diseñados (Tabla 2) y se optimizó un método de PCR en tiempo real con los aislados de jamón curado. Las condiciones fueron 95ºC durante 10 min y 40 ciclos de 95ºC durante 15 s y 60ºC durante 1 min, realizándose posteriormente un calentamiento desde 60ºC a 95ºC para obtener la curva de disociación y verificar los productos de amplificación. A continuación se ensayó la especificidad del protocolo con las 14 cepas de referencia.

Tabla 1. Cepas de levaduras empleadas en el presente trabajo y resultado de amplificación por PCR en tiempo real (RTi-PCR) con la pareja de cebadores FCOX1/RCOX1.

Especie	Referencia	RTi-PCR	Especie	Referencia	RTi-PCR
Candida zeylanoides	CECT[a] 10128	-	*Debaryomyces polymorphus*	CECT 10099	-
C. zeylanoides	CECT 10048	-	*D. polymorphus*	CECT 10251	-
C. zeylanoides	AJ[b] 116H	-	*Saccharomyces cerevisiae*	CECT 1414	-
Debaryomyces hansenii	CECT 10026	+	*S. cerevisiae*	CECT 1387	-
D. hansenii	CECT 10360	+	*Yarrowia lipolytica*	CECT 10358	-
D. hansenii	AJ 38P	+	*Y. lipolytica*	CECT 10363	-
D. hansenii	AJ 35P	+	*Rhodotorula mucilaginosa*	CECT 10359	-
D. hansenii	AJ 274G	+	*R. mucilaginosa*	CECT 11016	-
D. hansenii	AJ 260G	+	*Pichia carsonii*	CECT 1129	-
D. hansenii	AJ 296G	+	*P. carsonii*	CECT 10542	-
D. hansenii	AJ 320G	+			

[a]CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España; [b]AJ: Aislados de jamón curado de cerdo ibérico.
Todos los resultados considerados positivos aparecen sombreados.

Tabla 2. Cebadores diseñados para la detección de *D. hansenii* mediante PCR en tiempo real.

Parejas de cebadores	Secuencia de nucleótidos (5´- 3´)	Producto de PCR (pb)
FCOX1/RCOX1	AAACGACCAGGACAAGCATC CTGGTGAAACAGTTGAGTATAATC	201
FCOX2/RCOX2	CGACCAGGACAAGCATC CTGGTGAAACAGTTGAGTATAA	198
FCOX3/RCOX2	CGACCAGGACAAGCATCAACT CTGGTGAAACAGTTGAGTATAA	198
FCOX2/RCOX1	CGACCAGGACAAGCATC CTGGTGAAACAGTTGAGTATAATC	198

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación con la pareja de cebadores CO2F1/CO2R1 generó un producto de aproximadamente 600 pb en todos los aislados de jamón curado. Las secuencias obtenidas fueron empleadas para el diseño de 5 cebadores que se combinaron obteniéndose productos de PCR de diferentes tamaños (Tabla 2). El producto de amplificación más específico se obtuvo con una concentración de 0,3 μM de los cebadores FCOX1 y RCOX1, y 5 ng de ADN. Con el análisis de la curva de disociación se confirmó la amplificación de un solo producto de PCR en todas las cepas pertenecientes a *D. hansenii*, las cuales presentaron un valor de Ct menor de 20 (Figura 1).

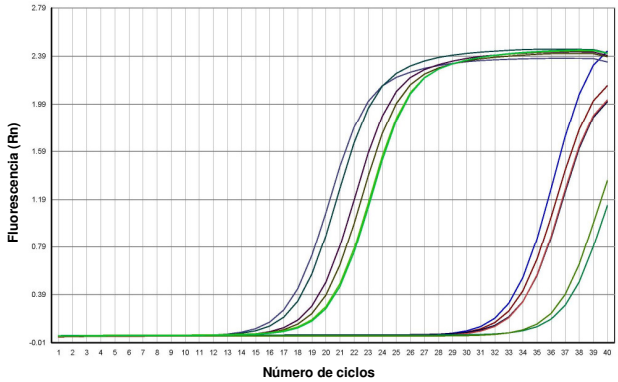


Figura 1. Curvas de amplificación obtenidas mediante PCR en tiempo real con la pareja de cebadores FCOX1/RCOX1.

CONCLUSIONES

El método de PCR en tiempo real desarrollado en el presente trabajo permite la detección específica de la especie *D. hansenii* frente a otras levaduras que se desarrollan habitualmente en los productos cárnicos madurados. Por ello la utilidad de este método debería ser probada en presencia de la población microbiana natural propia de los productos cárnicos madurados para confirmar su interés en el control de la implantación de *D. hansenii* cuando se emplea como cultivo iniciador en la industria cárnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade y col. 2010. *Meat Sci.* 84, 377-383.
Encinas y col. 2000. *Meat Sci.* 54, 203-208.
Núñez y col. 1996. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 271-280.
Querol y col. 1992. *System. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.
Tsui y col. 2008. *FEMS Yeast Res.* 8, 651-659.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2001-0804 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, la ayuda A7-08/09 del Plan de Iniciación a la Investigación de la Universidad de Extremadura, y las subvenciones GRU09158 y GRU10 de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura y FEDER.

POSTERS

P76 FUNCTIONAL PROPERTIES AND SAFETY ASPECTS OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ALOREÑA TABLE OLIVES FERMENTATIONS

Hikmate Abriouel[1], *Nabil Benomar*[1], *Rosario Lucas*[1] *y Antonio Gálvez*[1]
[1]*Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain*
hikmate@ujaen.es

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The manufacturing processes of Aloreña table olives are carried out by small and medium enterprises from Guadalhorce of Malaga, and currently have several unsolved problems derived from the lack of suitable scientific and technological knowledge and starter culture application. The present study has focused on the metabolic and functional properties of a collection of lactic acid bacteria (LAB) isolated during fermentation.

MATERIALS AND METHODS

A collection of lactobacilli (151 strains) and pediococci (11 strains) including species of *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *L. buchneri* and *Pediococcus parvulus* isolated from a traditional fermentation of Aloreña table olives was studied.

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular studies carried out by REP-PCR (Kostinek et al., 2005) and analysis of DNA sequences (Naser et al., 2005) revealed that *L. pentosus* was the predominant species in the fermentation of Aloreña table olives. A high number of strains possessed useful technological properties such as production of bacteriocins active against pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Streptococcus mutans*), utilization of raffinose and stachyose, resistance to freezing and thawing, growth in presence of 6.5% NaCl and at 10ºC, and various metabolic activities like bile salt hydrolase (BSH), phytase, heme-dependent catalase, carboxymethyl-cellulase, amylase, beta-glucosidase and acidifying capacity. A safety investigation revealed that all strains did not produce proteases and biogenic amines.

CONCLUSIONS

Results from this study suggest that some strains exhibited useful technological properties such as production of antimicrobial agents, growth at low temperature and fermentation of indigestible sugars which may be good candidates for future development of commercial starters for industrial table olives fermentation allowing to stabilize and improve the digestibility of the product.

REFERENCES
Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2005a. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. Syst. Appl. Microbiol. 28: 527-540.
Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes. Microbiology 151: 2141-2150.

ACKNOWLEDGEMENTS
This work was supported by project Bioándalus 08/18/I.4.3.

P81 ESTUDIO DE LA POBLACIÓN FÚNGICA RESPONSABLE DE LA MADURACIÓN DEL "QUESO DE CAMEROS"

Susana Sanz, Eva Hontañón y Carmen Olarte
Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios, 51, 26006 Logroño (La Rioja)
susana.sanz@unirioja.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El queso de Cameros es unos de los productos más tradicionales de La Rioja. Este queso ha sido elaborado desde muy antiguo de forma artesanal por los pastores de la zona de la Sierra de Cameros (de la que toma su nombre). Aunque figura ya en los primeros catálogos de Quesos de España elaborados por el MAPA en los años 70, su elaboración y consumo había caído en desuso. Pero desde los años 90 este queso ha vuelto a ser elaborado con criterios y tecnologías modernas siendo ampliamente aceptado por el consumidor, de tal manera que en el 2009, recibe la Denominación de Origen Protegida (DOP).

"Lácteos Martínez" (Haro, La Rioja) es una de las principales industrias impulsoras y elaboradoras del Queso de Cameros. En el 2009 se firma un contrato de colaboración entre dicha empresa y el Área de Tecnología de Alimentos de la Universidad de la Rioja. El acuerdo suscrito ha permitido desarrollar un trabajo de investigación que lleva por título: "Estudio de caracterización de mohos en los quesos *Los Cameros*", con el principal objetivo de analizar la población de mohos presente en las cámaras de maduración y en la superficie de los quesos elaborados por la citada empresa, ya que el estudio de identificación y caracterización de dichos mohos podría suponer un carácter diferenciador de sus productos en el mercado.

MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo de realizó en la empresa "Lácteos Martínez" sita en Haro (La Rioja). Se tomaron muestras de la superficie de los quesos a los 7-10 días, 20 días, 35-40 y 60-70 días después de su elaboración. Todos los quesos maduran en una misma cámara distribuidos en palets. Para todos los quesos, se tomaron muestras en quesos situados en la parte inferior y superior de los palets (lo que supone un total de 8 quesos muestreados). La toma de muestras se repitió 7 veces con una periodicidad quincenal y siempre por duplicado. Para el muestreo se utilizaron hisopos estériles humedecidos en suero salino estéril frotando ligeramente un área delimitada de la superficie de los quesos. Tras la realización de diluciones sucesivas, se transfieren 100 µl de la dilución adecuada a dos placas con medio de cultivo Agar Czapek Dox. Las placas se incuban durante 7 días en oscuridad y temperatura ambiente, y se procede al recuento de los mohos desarrollados en cada placa. Además, las colonias se clasifican en varios grupos, en función de su morfología y se anota el número de colonias de cada tipo.

De cada placa de Petri se aíslan al azar 3 colonias distintas para su posterior identificación. Cada colonia se siembra en una placa de Agar Czapek Dox y se incuba durante 7 días en oscuridad y temperatura ambiente. Una vez que el moho ha crecido se procede a su identificación al microscopio siguiendo criterios morfológicos. El número final de colonias identificadas por cada día de muestreo es de 96 colonias. Los mohos más frecuentemente aislados fueron identificados mediante Biología molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores registrados en los recuentos de superficie varían entre un máximo de 81,5 x 10^2 ufc/cm^2 y un mínimo de 2,0 x 10 ufc/cm^2, siendo el valor medio de 38,2 x 10^2 ufc/cm^2. No se encontraron diferencias significativas en los recuentos de mohos en función de la fecha de muestreo, resultado esperable que demuestra que las condiciones de humedad y temperatura de la cámara en la que se efectúa la maduración no varían a lo largo del año. Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a la posición que ocupan los quesos en los palets. Sí se apreciaron diferencias significativas en los recuentos de mohos en función del estado de maduración de los quesos. Así los niveles de mohos presentes en la superficie del Queso Camerano fueron aumentando progresivamente a medida que avanzaba el grado de maduración.

Los mohos que se desarrollaron en la superficie de los quesos con mayor frecuencia fueron *Penicillium commune* y *Penicillium nordicum* mientras que los mohos del género *Cladosporium, Alternaria* y *Mucor* y de la especie *Epicoccum nigrum* sólo aparecieron de forma esporádica. No se encontraron diferencias significativas en la distribución porcentual de los mohos en función del día de muestreo ni de la localización de los quesos en los palets, pero sí se encontraron diferencias al considerar la distribución de los mohos en función del estado de maduración.

CONCLUSIONES

Los valores obtenidos en el recuento de mohos se mantienen dentro de unos valores compatibles con la correcta maduración de los quesos, sin presentar en ningún momento proliferaciones excesivas que pudieran conducir a defectos. La ausencia de diferencias entre los distintos momentos del muestreo, indica un correcto funcionamiento

de la cámara que mantienen las condiciones de temperatura y humedad relativa constantes. Se ha constatado el predominio del género *Penicillium*, concretamente de las especies *P. commune* y *P. nordicum*. Ambas especies se encuentran perfectamente adaptadas a las condiciones de maduración establecidas en la empresa y se muestran capaces de dirigir correctamente la evolución de los quesos durante el periodo de maduración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Godínez, S. (2003). La maduración fúngica en quesos. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 342, 37-40.

Klich, M.A. and Pitt, J.I. (1988) A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation: North Ryde, Australia.

Pitt, J.I. (1991) A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation: North Ryde, Australia.

Robert, A., Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. (2004) Introduction to food and airbone fungi. Number 7. Centralalbureau voor Schimmelcultures, Utrech.

P93 FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA GORDALES CON DIFERENTES SALES MINERALES

V., Romero-Gil[1]; J., Bautista-Gallego[1]; F., Rodríguez-Gómez[1]; F.N., Arroyo-López[2]; A., Garrido-Fernández[1]*

[1]Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa (C.S.I.C.). Avda\ Padre García Tejero nº 4, 41012, Sevilla, España.

joaquinbg@ig.csic.es

[2]Institut "Cavanilles" de Biodiversitat I Biología Evolutiva. Universitat de València. Edifici d'Instituts, Parc Científic de Paterna. P.O. Box 22085, E-46071 València, España.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El NaCl tiene un papel fundamental en la elaboración de aceitunas de mesa, influyendo tanto sobre las características organolépticas como en la estabilidad microbiológica del producto final. Sin embargo, la creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos con bajo contenido en sodio (Na^+), hace necesario reducir sus niveles en aceitunas. Se ha comprobado que una dieta baja en Na^+ y alta en potasio (K^+) y calcio (Ca^{++}) favorece el control de la presión arterial. En el presente trabajo se estudió el efecto que diferentes mezclas de sales (NaCl, $CaCl_2$ y KCl) tienen sobre el perfil microbiológico y físico-químico de fermentaciones de aceitunas de mesa de la variedad "Gordal".

MATERIAL Y MÉTODOS

Aceitunas frescas de la variedad "Gordal", elaboradas mediante el estilo "Sevillano", fueron obtenidas directamente de la industria y colocadas en fermentadores con capacidad para 2,9 kg de fruto y 2,3 L de salmuera. Nuestro diseño experimental consistió en una serie de tratamientos obtenidos mediante un diseño de mezclas con restricciones, en las que la suma total del porcentaje de sales utilizado fue siempre del 10% (Tabla 1).

Ensayo	Concentración (g/100mL) %			a_w
	NaCl	KCl	$CaCl_2$	
1	10	0	0	0.955
2	5	1	4	0.973
3	4	3	3	0.966
4	7	3	0	0.968
5	8	1	1	0.960
6	6	2	2	0.956
7	5	4	1	0.957
8	4	6	0	0.988
9	10	0	0	0.955
10	4	0	6	0.964
11	4	3	3	0.966
12	4	0	6	0.964
13	7	0	3	0.963
14	4	6	0	0.988
15	6	2	2	0.956

Tabla 1. Diseño experimental para el estudio del efecto de diferentes tipos de sales minerales. Incluye también la actividad de agua inicial obtenida en las salmueras tras la aplicación de las sales (a_w).

El control del proceso se realizó mediante siembras periódicas en diferentes tipos de medios de cultivo y análisis físico-químicos. Además, se llevó a cabo la identificación de las poblaciones de levaduras y bacterias lácticas (BAL) mediante métodos moleculares (PCR región 5.8-ITS y gen recA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia en las salmueras de diferentes sales no influyó excesivamente en la a_w inicial, que osciló en las diferentes muestras entre 0,955 (ensayo 1) y 0,988 (ensayos 8 y14). En términos generales, la evolución del pH fue muy parecida en todos los tratamientos (Figura 1a). Sin embargo, si consideramos solamente los primeros días tras la colocación de los frutos en salmuera (Figura 1b), se observa que en los fermentadores que tuvieron solo NaCl (ensayos 1 y 9) la elevación del pH fue intermedia, hasta aproximadamente 8. En cambio, se obtuvo en pH superior en los ensayos 2, 4, 8 y 14, todos ellos sin $CaCl_2$, en los que se llegó a un valor de ≈9,0. En el resto de

tratamientos, la subida inicial del pH fue inferior, quedándose entre 6,5 y 7,5. Dicho comportamiento ocurrió principalmente en los tratamientos en los que la salmuera incorporaba Ca^{++}. Conviene resaltar que la velocidad de acidificación en los fermentadores que tuvieron un pH inicial superior fue finalmente más rápida (Figura 1b). A pesar de ello, el comportamiento a medida que avanzó el tiempo se fue haciendo más parecido, y las diferencias en pH al final de los procesos fueron limitadas, aunque si lo suficientemente apreciables como para que pudieran relacionarse con las características de los tratamientos.

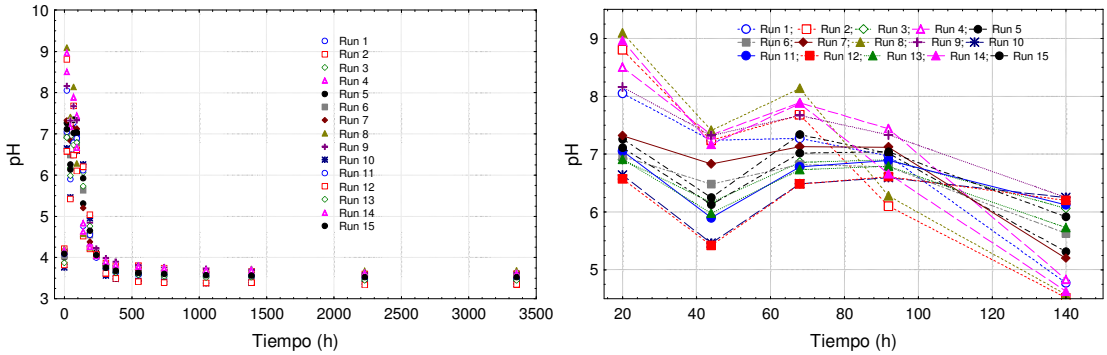


Figura 1. Evolución del pH en los diferentes tratamientos a lo largo del proceso (Fig 1a, izquierda) y en el primer periodo de fermentación, entre las 20 y 140 horas (Fig 1b, derecha).

En cuanto al crecimiento microbiano, en todos ellos se apreció el desarrollo de Enterobacterias, que no alcanzaron nunca niveles poblacionales elevados. La fermentación siempre se llevo a cabo a través de un proceso láctico, con una curva de crecimiento típica para las BAL. Sin embargo, el crecimiento de las levaduras se vio afectado por las condiciones de los tratamientos.

Los mejores resultados, desde el punto de vista microbiológico, se obtuvieron en el ensayo 13 (Tabla 2). En el mismo puede apreciarse que las Enterobacterias tuvieron un desarrollo muy limitado y no significativo, detectándose esporádicamente. El crecimiento de las BAL fue bastante bueno, alcanzando una población bastante elevada indicadora de una buena fermentación. Por el contrario, las levaduras estuvieron ausentes durante una gran parte del proceso de fermentación y aparecieron siempre en niveles poblacionales muy bajos. Por otra parte, el pH final que se alcanzó en esta experiencia fue de los más bajos de todas las realizadas, garantizando la estabilidad del producto fermentado.

Tiempo (h)	Enterobacterias	LAB	Yeasts	pH
0	nd	nd	Nd	3,87
20	Nd	nd	Nd	6,91
44	Nd	5,79	Nd	5,98
68	Nd	6,23	Nd	6,73
92	Nd	6,87	Nd	6,79
140	2,98	7,09	Nd	5,73
188	Nd	7,06	Nd	4,76
236	Nd	6,87	Nd	4,06
308	Nd	6,94	Nd	3,78
380	Nd	7,31	2,38	3,63
548	Nd	6,49	3,67	3,57
740	2,60	5,97	5,21	3,54
1052	Nd	5,56	4,58	3,51
1388	Nd	5,33	5,15	3,52
2228	2,48	5,16	3,82	3,44
3356	Nd	5,17	2,92	3,44

Tabla 2. Evolución de las poblaciones microbianas, expresada en $\log_{10}$ ufc/mL, y pH del ensayo 13 (7% NaCl, 3% $CaCl_2$). nd, no detectable.

La identificación de los microorganismos permitió confirmar que la única especie de BAL que se desarrolló fue *Lactobacillus pentosus*. En cuanto a las levaduras, *Pichia galeiformis* y *Candida boidinii* fueron las especies predominantes.

CONCLUSIONES

La información obtenida mediante este trabajo puede ser empleada para diseñar nuevas condiciones de fermentación en las que sea posible utilizar una menor concentración de NaCl, garantizando al mismo tiempo un producto estable y seguro.

P99 ESTUDIO DEL EFECTO QUE LA ADICIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR AUTÓCTONO TIENE SOBRE CHORIZOS IBÉRICOS DE DOS INDUSTRIAS CON DIFERENTES PROCESADOS

Rocío Casquete, M.J. Benito, F. Pérez, S. Ruiz, M. Fernández, G. Gallardo y M.G. Córdoba

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Área de Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura. Carretera de Cáceres, s/n, Badajoz

rociocp@unex.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En Extremadura se elaboran de forma tradicional embutidos de Cerdo Ibérico, lo que imprime a este tipo de productos unas características peculiares y muy apreciadas por el consumidor. El uso de los cultivos iniciadores constituye un instrumento tecnológico del que dispone la industria para controlar la fermentación, garantizar la calidad higiénico-sanitaria y estandarizar el producto. Los cultivos comerciales presentan muchas veces fallos de implantación y no consiguen dirigir la fermentación dejándola a merced de la flora endógena de la carne con los peligros que ello conlleva (Hugas, 1994). La selección de cepas autóctonas de productos cárnicos tradicionales que se adapten mejor a las condiciones de elaboración y maduración podría suponer la conservación de las características sensoriales propias tan apreciadas del producto tradicional que le imprimen el carácter de alta calidad (Santos y col., 1997a y b). El objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento que tienen cultivos iniciadores autóctonos de bacterias acido lácticas y *Staphylococcus* durante el procesado de Chorizos elaborados en dos industrias diferentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

En ambas industrias, se elaboraron cuatro lotes de chorizos. Tres lotes se inocularon con una cepa de *Staphylococcus vitulus* S34 y tres diferentes cepas de *Pediococcus acidilactici* (P184, P198 y P200) previamente seleccionados (Martín y col. 2007; Benito y col. 2007, 2008a, 2008b) una para cada lote ya inoculado con el *Staphylococcus* (Lotes P184S34, P198S34 y P200S34). El cuarto fue el lote control. Ambas se embutieron en tripa natural y el tiempo de maduración fue diferente, 90 días para una industria y 65 días para la industria 2 (Tabla 1).

Tabla 1. Procesados de la industria 1 y 2.

INDUSTRIA 1			INDUSTRIA 2		
Tiempo de maduración	Temperatura (ºC)	Humedad relativa (%)	Tiempo de maduración	Temperatura (ºC)	Humedad relativa (%)
0-24 horas	2-4ºC	-	0-3 días	8 ºC	75%
1-30 días	7ºC	70-75%	3-63 días	12 ºC	70%
30-90 días	12-15ºC	75-80%			

Para los análisis las muestras fueron tomadas por triplicado a diferentes días de maduración. Se hicieron determinaciones fisico-químicas de pH, actividad de agua, humedad, proteínas totales, nitrógeno no protéico (NNP), nitrógeno aminoacídico (NA). También se realizaron determinaciones microbiológicas, aminas biógenas por electroforesis capilar, textura (TPA), color y se hizo un análisis sensorial descriptivo del producto acabado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos iniciadores mixtos seleccionados (P184S34, P198S34 y P200S34) presentaron una buena implantación y fueron capaces de colonizar los embutidos elaborados en dos industrias con diferentes procesados. Las bacterias acido lácticas se desarrollaron bien en ambas industrias aunque se observó un mejor desarrollo en la industria 1 llegando a recuentos entorno a 9 log ufc/g al final del procesado y entorno a 7 log ufc/g en la industria 2. Además la adicción de los cultivos iniciadores no implica un claro cambio en los parámetros de proteólisis de los chorizos aunque los lotes inoculados con el cultivo iniciador mixto P198S34 mostraron menor contenido de proteínas y mayor cantidad de NNP al final del procesado en ambas industrias. Por otro lado, en cuanto al análisis de las aminas biógenas, se observaron diferencias entre ambas industrias, siendo la industria 1 la que tuvo mayor concentración de algunas, como la cadaverina, histamina y triptamina, observándose una mayor concentración en el lote control de la industria 1. El análisis de la textura mostró que los lotes inoculados con los cultivos presentaban menor dureza y masticabilidad que el lote control. Los datos que se obtuvieron tras la cata descriptiva mostraron que los lotes inoculados con cultivos iniciadores fueron más jugosos que el lote control, aunque todos los lotes tuvieron una buena valoración global por los catadores.

CONCLUSIONES

Los cultivos iniciadores mixtos P184S34, P198S34 y P200S34 fueron capaces de implantarse en ambas industrias. La utilización de los cultivos iniciadores no supuso ningún cambio en las características sensoriales de estos productos y mejoraron la homogeneidad y salubridad de los mismos en cuanto a la producción de aminas biógenas. Ésto confirma que es importante una adecuada selección del cultivo dependiendo del tipo de industria y procesado para la obtención de un producto tradicional de alta calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S. y Córdoba M.G. (2007). Characterization and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iberian Dry-Fermented Salchichón and Chorizo Sausages. M: Food Midrobiology and Safely.

Benito, M.J., Serradilla, M.J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A. y Córdoba M.G. (2008b). Diferentiation of Staphylococci from Iberian dry fermented sausages by protein fingerprinting. Food Microbiology, DOI: 10.1016/j.fm.2008.03.007.

Benito, M.J., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Pérez-Nevado, F. y Córdoba MG. (2008a). Rapid differentation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. Meat Science, DOI: 10.1016/meatsci.2008.03.002.

Hugas, M. (1994). Caracterización bioquímica de lactobacilos aislados de salchichones. Eurocarne, 26, 53–62.

Martín, A., Colín, B., Aranda, E., Benito, M.J. y Córdoba, M.G. (2007). Characterizacion of Micrococaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. Meat Science 75, 696-708.

Santos, E.M., González-Fernández, C., Jaime, I. y Rovira, J. (1997a). Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of "chorizo". International Journal of Food Microbiology, 13, 66-1372.

Santos, E.M., González-Fernández, C., Jaime, I. y Rovira, J. (1997b). Identificatión y caracterización de bacterias ácidolácticas aisladas de chorizos tradicionales elaborados en Castilla y León. Food Science and Technology International 3:21-29.

P118 BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE *LACTOCOCCUS LACTIS* AISLADAS DE QUESOS TRADICIONALES ASTURIANOS

Ángel Alegría[1*], *Susana Delgado*[1], *Beatriz Martínez*[2], *Belén López*[3] *y Baltasar Mayo*[1]
[1]*Departamento de Microbiología y Bioquímica y* [2]*Departamento de Tecnología y Biotecnología, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Carretera de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias.*
[3]*Proquiga S.A., Polígono industrial de Bergondo, C/ Parroquia de Rois, S/N Parcela D-2, 15165-Bergondo, A Coruña.*
alegria@ipla.csic.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las bacteriocinas son compuestos inhibidores del crecimiento microbiano de naturaleza proteica. Algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas inhiben un amplio rango de microorganismos, incluyendo patógenos y alterantes; capacidad por la que podría ser útiles para su empleo como conservantes naturales (Gálvez y col., 2008). En los alimentos, las bacteriocinas pueden incluirse como aditivos o producirse durante la fermentación. *Lactococcus lactis* produce una gran variedad de bacteriocinas, de tipo tanto lantibiótico como no-lantibiótico. La bacteriocina de *L. lactis* más conocida es la nisina, un lantibiótico que se explota como preservativo autorizado (con el código E234) en la manufactura de quesos y otros productos lácteos procesados. *L. lactis* produce otros lantibióticos como la lacticina 3147 y la lacticina 481, que están siendo evaluados entre otras aplicaciones para la maduración acelerada de quesos (Martínez-Cuesta y col., 2001) y como antimicrobianos en el tratamiento de mastitis y otras patologías (Klostermann y col., 2009). Entre los compuestos antibacterianos no lantibióticos producidos por *L. lactis* tenemos lactococinas tipo pediocina (lactococina MMFII), bacteriocinas de dos componentes (lactococina G y M), bacteriocinas tiol-dependientes (lactococina B) y bacteriocinas sensibles al calor (lactococina A y 972) (Venema y col., 1995; Oppegård y col., 2007). En este trabajo examinamos la producción de sustancias antimicrobianas en una colección de cepas de *L. lactis* (306 aislados) procedentes de cinco quesos tradicionales asturianos elaborados con leche cruda y sin la utilización de fermentos. Las cepas productoras se sometieron posteriormente a distintos ensayos fenotípicos y genéticos con el fin de determinar la naturaleza de los inhibidores.

MATERIAL Y MÉTODOS

En un primer momento, la colección de lactococos se tipificó por medio de técnicas de RAPD y REP-PCR para determinar el número de cepas distintas. Representantes de todos los genotipos se ensayaron después de forma consecutiva para la producción de inhibidores en placa y en medio líquido utilizando sobrenadantes neutralizados libres de células. Como cepas indicadoras se utilizaron bacterias Gram-positivas de las especies *L. lactis, Lactobacillus sakei, Lactobacillus plantarum, Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*. Con posterioridad, la actividad inhibidora de las cepas se ensayó también frente a productores de bacteriocinas conocidas, como *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 (productor de nisina), *L. lactis* subsp. *lactis* IPLA 972 (productor de lactococina 972) y *L. plantarum* LL 441 (productor de plantaricina C). Finalmente, se analizó la presencia de los genes estructurales de las bacteriocinas más comunes producidas por *L. lactis* mediante reacciones de PCR específicas y secuenciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los perfiles de tipificación de los aislados mediante RAPD y REP-PCR nos indicó que contábamos, al menos, con 60 cepas distintas. Representantes de todos estos genotipos se analizaron para la producción de sustancias antimicrobianas primero en medio sólido y después en medio líquido. En medio líquido el número de cepas que inhibía a cada indicador fue muy variable; así, 37 cepas (un 61.66%) inhibieron a *L. sakei* CECT 906T (una cepa muy susceptible a bacteriocinas y antibióticos), mientras que *S. aureus* CECT 86T fue inhibido solamente por 11 (un 18.33%). La capacidad inhibidora de las cepas positivas en medio sólido para uno o más de los indicadores se ensayó con sobrenandantes líquidos libres de células y neutralizados (a pH 6.5). De esta forma, confirmamos una producción consistente de sustancias antibacterianas en 17 cepas (Tabla 1); de ellas 16 eran *L. lactis* subsp. *lactis* y tan solo una *L. lactis* subsp. *cremoris*. El ensayo de los sobrenadantes contra las cepas productoras tipo sugirió que 11 de ellas podrían producir nisina y cinco lactococina 972. Todas las cepas se cribaron mediante PCR específica para la presencia de los genes estructurales (y/o adyacentes) de las bacteriocinas más comunes producidas por *L. lactis*: nisina, lacticina 3147, lacticina 481, lactococina 972, lactococina A, lactococina B, lactococina G, lactococina M, and lactococina Q, utilizando cebadores y condiciones de reacción descritos en trabajos previos.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana en medio líquido de cepas de *L. lactis* contra diversos indicadores.

Cepa indicadora	**Cepa de *L. lactis***																
	1A6	1A8	1A16	1A38	1AA16	1AA17	1AA48	2BB9	3AA28	L30	P83A	2A27	Q1-2	Q1-6	Q1-8	T2-26	T2-43
L. lactis MG1363	++	++	++	++	++[b]	++	+	++	++	+	++	+	++	++	++	++	++
L. lactis CDO 497	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
L. lactis IPLA 972	++	++	++	++	++	++	-	++	++	+	++	++	-	-	-	-	-
L. plantarum LL 441	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-	+	-	-	-	-	-	-
L. sakei CECT 906^T	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+	++	++
L. innocua 86/26	++	++	+	++	++	++	-	++	++	+	++	-	-	-	-	-	-
S. aureus CECT 86^T	+	(+)	+	(+)	(+)	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

En 11 de las cepas productoras se detectaron los genes responsables de la producción de nisina (Figura 1A), de las que 9 correspondían a la secuencia de nisina A (*nisA*) y 2 a la de nisina Z (*nisZ*), y en 5 el gen codificador de la lactococina 972 (*lcnA*) (Figura 1B), tal y como ya sospechábamos. En la cepa de *L. lactis* subsp. *cremoris* 2A27 se detectó la presencia de genes codificadores de los dos componentes de las lactococinas G y Q; aunque relacionadas, las secuencias nucleotídicas de la cepa 2A27 presentaba algunas diferencias respecto de las que codifican las dos anteriores.

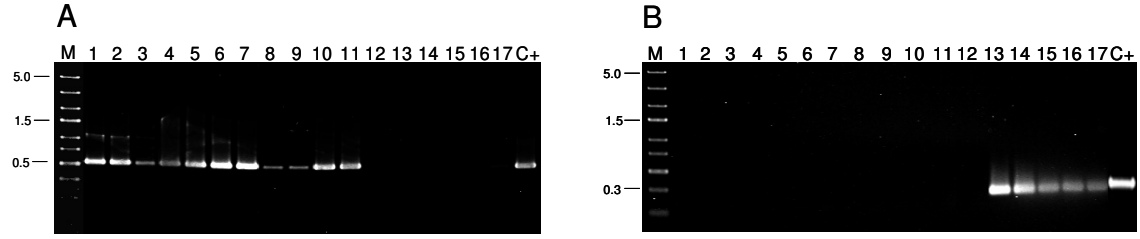


Figura 1. Amplificación específica por PCR del gen estructural de la nisina (Panel A) y el de la lactococina 972 (Panel B), utilizando como molde ADN total de las cepas productoras de bacteriocinas (en el mismo orden que en la Tabla 1).

CONCLUSIONES

1.- Se han detectado 17 cepas de *L. lactis* productoras de bacteriocinas en una colección procedente de quesos tradicionales asturianos elaborados con leche cruda.

2.- De éstas, 11 producen nisina y 5 producen lactococina 972; en la cepa restante, perteneciente a la subespecie *cremoris,* detectamos un gen similar al que codifica las lactococinas G y Q.

3.- Juntas o por separado, estas cepas podrían utilizarse como cultivos protectores o de maduración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gálvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., y Omar, N. B. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. Crit. Rev. Biotechnol. 28, 125-152.

Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W. J., Ross, R. P., y Hill, C. 2009. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. J. Dairy Res. 29, 1-8.

Martínez-Cuesta, M. C., Requena, T., y Peláez, C. 2001. Use of bacteriocing-producing transconjugants as starter in acceleration of cheese ripening. Int. J. Food Microbiol. 70, 79-88.

Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., y Nissen-Meyer, J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13, 210-219.

Venema, K., Venema, G., y Kok, J. 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. Trends Microbiol. 3, 299-304.

P128 EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO DE MEZCLA FABRICADO POR DISTINTOS PROCEDIMIENTOS TECNOLÓGICOS

Gema Campos; Lucia Robles; Rocio Alonso; Manuel Nuñez y Antonia Picon

Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de A Coruña Km 7, 28040 Madrid.

apicon@inia.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las variedades de queso de mezcla (vaca, oveja y / o cabra) constituyen un 40% de la producción nacional de queso (MMAMRM, 2008). Debido a la producción estacional de leche de oveja y cabra resulta difícil mantener una composición uniforme a lo largo del año.

Para tratar de solucionar este problema, se fabricaron quesos de mezcla experimentales incorporando cuajadas de cabra que habían sido mantenidas en congelación durante 2 meses a cuajadas frescas de leche de vaca. Se elaboraron al mismo tiempo quesos control con leche de estas dos especies. El objetivo del trabajo fue comparar la microbiota presente en los quesos experimentales y control utilizando métodos microbiológicos convencionales y técnicas moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fabricación de cuajadas de cabra. Se elaboraron por duplicado cuajadas de leche de cabra pasteurizada y cruda, siguiendo el procedimiento descrito por Picon y col. (2010). Como cultivo iniciador se utilizó el cultivo comercial CHN11 (Chr. Hansen, Madrid, España), que contiene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Las cuajadas de leche cruda fueron sometidas a un tratamiento de 400 MPa durante 5 min en un aparato de altas presiones discontinuo (Modelo ACIP 6000, ACB, Nantes, Francia). Todas las cuajadas de leche de cabra fueron congeladas a -24ºC y mantenidas a esta temperatura durante 2 meses.

Fabricación de queso y toma de muestras. Se elaboraron dos tipos de quesos experimentales en cada fabricación. En uno de ellos se utilizó cuajada congelada de leche pasterizada de cabra, y en el otro se utilizó cuajada de leche cruda presurizada y congelada. Ambas cuajadas de cabra se mezclaron con cuajadas frescas de leche de vaca. Se elaboró queso control por duplicado con una mezcla de leche pasterizada de vaca y de cabra y el mismo cultivo iniciador. Se tomaron muestras de cuajada y de los quesos a los 1, 15, 30 y 60 días.

Análisis microbiológico. Todos los recuentos se determinaron por duplicado en los siguientes medios (Avila y col., 2005): 'Plate count agar' con 0.1% de leche desnatada en polvo (microorganismos totales), M17. (bacterias lácticas), PMK (estafilococos) y VRBA (coliformes).

Métodos moleculares. El ADN de las muestras de queso, extraído a partir de un homogeneizado de queso en tampón citrato trisódico al 2% con el kit 'QIAamp DNA stool' (Qiagen), se utilizó como molde para amplificar por PCR un fragmento de la región V3 del gen rRNA 16S utilizando los cebadores HDA1GC y HDA2 (Ogier y col., 2002). Se realizó un análisis TTGE de las muestras en un sistema de detección de mutaciones DCode (Bio-Rad, Madrid, España) en las condiciones descritas por Ogier y col. (2002).
El ADN de cultivos bacterianos (unas 30 colonias por tipo de queso y tiempo elegidas al azar de placas de PCA y M17), extraído con el kit 'GenElute Bacterial Genomic DNA' (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, EE.UU.), se utilizó para determinar género y especie de los aislados mediante la técnica ARDRA. Se amplificó por PCR un fragmento de 348 pb del gen rRNA 16S con los cebadores Y1 e Y2, que fue posteriormente digerido con las enzimas CfoI, RsaI y MboII (Ward y col., 1998). En patrones diferentes a los descritos por estos autores, los productos de PCR fueron también digeridos con MseI, BfaI y AluI (Rodas y col., 2003) y con BamHI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Se obtuvieron niveles próximos a 10^7 ufc / g para microorganismos totales y bacterias lácticas, tanto en cuajadas experimentales como control. Los niveles durante el primer mes de maduración estaban próximos a 10^9 ufc / g y disminuyeron a 10^8 ufc / g a los 60 d, sin diferencias significativas entre los quesos experimentales y control. No se observó ningún efecto significativo debido a la congelación y descongelación de las cuajadas de leche de cabra en los quesos de 1 día, probablemente debido a que los quesos experimentales sólo contenían un 33% de cuajada de leche de cabra y a que el intervalo de 24 h transcurrido pudo haber favorecido la recuperación de las bacterias lácticas dañadas por la congelación.
Los perfiles TTGE de los fragmentos de la región V3 del gen rRNA 16S de ADN extraído de queso mostraron a *L. lactis* como la población predominante durante toda la maduración. La banda correspondiente a *Leuconostoc mesenteroides* se intensificó paulatinamente en el periodo comprendido entre los 15 y los 60 días.
En quesos de 1 día todos los microorganismos seleccionados fueron *L. lactis*. Sólo un 11,6% de ellos (20 de 172) pertenecían a la subespecie *cremoris*, que prácticamente no se volvió a detectar a lo largo de toda la maduración.
En la primera fabricación se aislaron más *Leuconostoc* a los 15 y 30 días en los quesos experimentales (4-6 de 30 aislados en cada queso) que en el queso control (2 de 30 aislados), aunque a los 60 días 24 de las 32 bacterias aisladas del queso control fueron *Leuconostoc*. En la segunda fabricación sólo se aislaron *Leuconostoc* a los 60 días, en mayor número en los quesos experimentales que en el queso control.
En los quesos experimentales, y especialmente en los fabricados con cuajadas presurizadas, se observó que algunos fragmentos amplificados por PCR tenían un tamaño ligeramente superior al esperado. Los patrones de digestión obtenidos con las enzimas MseI, BfaI y AluI, parecen indicar la presencia de diversas especies del género *Lactobacillus*.

CONCLUSIONES
A pesar de no haberse observado diferencias entre los quesos experimentales y el queso control mediante métodos microbiológicos clásicos, un estudio detallado de la población de bacterias lácticas por técnicas moleculares puso de manifiesto una mayor presencia de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* en los quesos experimentales. Estas diferencias en la microbiota de los quesos estudiados pueden dar lugar a importantes variaciones en la producción de compuestos sápidos y aromáticos durante su maduración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Avila y col. (2005). International Dairy Journal 15: 145-153.
MMAMRM (2008). Anuario de Estadística. Encuesta láctea anual.
Ogier y col. (2002). Applied and Environmental Microbiology 68: 3691-3701.
Picon y col. (2010). International Dairy Journal 20: 344-351.
Rodas y col. (2003). Systematic and Applied Microbiology 26: 412-422.
Ward y col. (1998). FEMS Microbiology Letters 166: 15-20.

P149 MICROBIAL QUALITY OF *CHORIZO VERDE*, A TRADITIONAL SAUSAGE FROM TOLUCA, MÉXICO: A PRELIMINAR STUDY

Octavio Dublán-García[1], Azenet Pérez Valenzuela[1] y Baciliza Quintero-Salazar[2]
[2]*Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México; Paseo Colón y Paseo Tollocan S/N, Toluca México. C.P. 50000*
octavio_dublan@yahoo.com.mx
[1]*Facultad de Turismo y Gastronomía, Universidad Autónoma del Estado de México. Cerro de Coatepec S/N, Ciudad Universitaria Toluca; México. C.P. 50100. México.*

INTRODUCTION AND OBJECTIVES
Traditional meat products are part of the identity and gastronomic heritage from several cultures in the world. "*Chorizo verde"* (green chorizo) is a genuine and traditional sausage which is very important from economical point of view for many artisanal producers in the Valle de Toluca, México (1). However, although it is an emblematic food in the region, there are not previous studies in relation to their microbiological quality. For this reason, the aim of this work was to quantify preliminary indicator microorganisms, as well as the presence of present *Salmonella* in this traditional sausage.

MATERIALS AND METHODS

Samples of raw *"Chorizo verde"* was purchased in 10 establishments (*"gourmet"* shops of meat products (n=3), public markets (n=5) and supermarkets (n=2)) from Toluca city and stored at 4°C for no more than 48 hours before their analysis. In order to quantify microbial groups, appropriate dilutions were surface plated: aerobic total plate count (ATPC) was carried out on plate count agar (PCA) incubated at 32°C for 72h; total coliforms by using violet red bile glucose agar (35°C for 24h); moulds and yeasts, with potato dextrose agar (PDA) acidified with lactic acid 10% (2). *Salmonella* incidence was analyzed according to the *Norma Oficial Mexicana* NOM-114-SSA1-1994 (3). The analysis between the different microbial parameters was performed by using SPSS 8.0 for windows (SPSS 1997).

RESULTS Y DISCUSSION

Normally the high microbial counts in the finished food products could be explained by the use of unhygienic raw materials, substandard handling or by generally unsatisfactory hygienic conditions (4). In the case of "*Chorizo verde"*, this is prepared by mixing fat and meat pork with some green raw vegetables such as Mexican husk tomato, green chillis, lettuce, coriander, etc., which give attractive green coloration; but also, could be the principal reason because it presented high microbial counts (see table 1). Another possibility for the high microbial counts in this food could be their artisanal origin. In this sense, moulds and yeast were the group of microorganisms present in the highest proportion (8.02±0.09 log UFC/g). Mesophilic aerobic (7.03±0.08) was present in a similar proportion than total *coliforms (*7.03±0.08) (see table 2). However not significant differences (P≥0.05) were observed between mesophilic aerobic count in the different analyzed samples (Table 1).

In general, great homogeneity was observed in microbial counts from the different establishments analyzed (see table 2). Also, it is interesting to note that exist a great homogeneity in microbial counts from the different establishments analyzed (see table 2) but the microbial count are high. Customarily, it is considered that microbiological deterioration occurs when total viable counts and or *Enterobateriaceae* reach 7 log UFC/g (5). However in the case of *"Chorizo verde",* although total coliforms and aerobic mesophilic counts were high (>6.9 log UFC), no organoleptic signs of deterioration were observed. Moreover, regarding *Salmonella spp*., although there are studies that report their presence in fresh red chorizo in some tropical places, however, in this case, it is interesting to note *Salmonella* was not present in any samples analyzed (in 25 g of sample), independently of the type establishment. It could be because exists the evidence that ingredients and spices such as garlic, onion, black pepper, cloves, cinnamon etc., commonly used to prepare "*Chorizo verde"*, have showed antimicrobial activity against microorganisms such as *Salmonella spp* (6).

Table 1.Preliminar results of microbiological counts of "*Chorizo verde"* from ten different establishments from Toluca, México

Group of microorganism	Media ±Standard deviation (n=30)	Minimum	Maximum
Mesophilic aerobic	7.02 ±0.04	6.94	7.13
Moulds and yeast	8.02±0.09	7.83	8.23
Total coliforms	7.03±0.08	6.85	7.13
Salmonella	No detected	No detected	No detected

Tabla 2. Levels of indicator microorganisms presents in 10 establishments engaged in selling of "*Chorizo verde"* in Toluca, city, México.

Establishment	Group of microorganisms		
	Mesophilic aerobic (log CFU/g)	*Moulds and yeast(log CFU/g)*	*Total coliforms (log CFU/g)*
1	6.97±0.01	8.12±0.02^{bc}	7.03±0.02^{bc}
2	6.98±0.03	7.99±0.04^{de}	7.1±0.02^{ab}
3	6.99±0.01	8.04±0.03^{cde}	7.08±0.01^{abc}
4	7.00±0.08	8.03±0.04^{bcde}	7.07±0.05^{ab}
5	7.00±0.01	7.89±0.08^{b}	7±0.01^{a}
6	7.03±0.07	8.01±0.1^{e}	7.12±0.00^{ab}
7	7.03±0.04	8.19±0.06^{bcd}	7.04±0.01^{ab}
8	7.05±0.05	8.19±0.04^{bcd}	7.04±0.01^{c}
9	7.06±0.01	7.99±0.04^{a}	6.8±0.02^{ab}
10	7.07±0.01	7.93±0.02^{a}	6.9±'.03^{a}
Significance level establishment factor	No significant	****	***

CONCLUSIONS

"Chorizo verde" is a fresh sausage that due their artisanal nature presents high microbial count, specially molds and yeast. However, the use of several spices in their elaboration could inhibit the presence of pathogens such as *Salmonella*. On the other hand, it is important to evaluate the presence type and quantity of lactic acid bacteria because it could contribute to the food security of this traditional sausage.

REFERENCES

1. Fernández-Zarza M. 2010. *Distribución geográfica, producción y comercialización del chorizo verde en el Valle de Toluca*". *Tesis de Licenciatura*, *Universidad Autónoma del Estado de México.* IN PRESS.
2. Camacho, A., Giles M., Ortegón A., Palao M., Serrano B. y Velázquez O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
3. Norma Oficial Mexicana Nom-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Determinación de Salmonella en Alimentos.
4. Esteves A., Patarata L., Saraiva C. Martins C. 2008. Assessment of the microbiological characteristics of industrially produced *alheira*, with particular in reference to foodborne pathogens. *Journal of Food Safety* 28: 88–102.
5. Esteves A., Patarata L., Saraiva C., Martins C. 2007. Assessment of the microbiological characteristics of industrially produced *alheira*, with particular reference to foodborne pathogens. *Journal of Food Safety* 28**:** 88–102.
6. Nanasombat S., Lohasupthawee P. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonellae* and other enterobacteria. KMITL Sci. Tech. J. 5(3): 527-538.

P150 EFECTO DE LA ENVOLTURA EN PELÍCULA PLÁSTICA SOBRE LOS CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS QUE TIENEN LUGAR DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL QUESO D.O.P. "CEBREIRO"

Aida Cachaldora, Sonia Fonseca, María Gómez, Inmaculada Franco y Javier Carballo
Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus As Lagoas, s/n., 32004, Ourense, aidacachaldora@uvigo.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El queso Cebreiro es una variedad de queso de vaca, fresco, que se elabora en la Comunidad Autónoma de Galicia (Noroeste de España). Cuenta con Denominación de Origen Protegida reconocida por Orden de la Consellería de Política Agroalimentaria e Desenvolvemento Rural de la Xunta de Galicia de 21/12/2004, publicada en el Diario Oficial de Galicia de 29-12-2004.

Durante el almacenamiento y distribución del queso fresco pueden producirse modificaciones indeseables, fundamentalmente deshidratación y alteraciones del sabor y aroma, si las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas. La imposibilidad de controlar estas condiciones por parte de los elaboradores, que son a su vez los máximos responsables de la calidad e imagen del producto, hace que se busquen alternativas de presentación para que el producto sea lo más insensible posible al almacenamiento en condiciones inadecuadas. Una de estas alternativas puede ser la envoltura, inmediatamente después de su elaboración, en una película plástica que resulte relativamente impermeable al oxígeno, al vapor de agua y a las sustancias de naturaleza aromática presentes en otros alimentos que compartan almacén con el queso. Ahora bien, antes de adoptar definitivamente esta alternativa es necesario estudiar el efecto de la envoltura en la película plástica sobre los cambios microbiológicos que tienen lugar en el queso durante el almacenamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se hicieron elaborar en las queserías acogidas a la D.O.P "Cebreiro" tres partidas de queso. Cada partida estuvo formada por 15 unidades. De cada partida se tomó un queso inmediatamente después de salir de la prensa (0 días) y de los 14 restantes, tras 2 días de almacenamiento a refrigeración (2-3 ºC y 85-90% de humedad relativa) para que los quesos adquirieran consistencia y no se deformasen al envasarlos, 7 quesos se envolvieron en una película plástica KREHALON MLF-4 neutro de 60 micras (DANISCO FLEXIBLE ESPAÑA, S.A., Granollers, Barcelona, España) y los 7 quesos restantes se dejaron sin envolver. Los quesos se almacenaron a refrigeración, en las mismas condiciones de humedad y temperatura, durante 18 días más. A los 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 20 días de almacenamiento, de cada partida se tomó un queso sin envolver y uno envuelto.

Los quesos se transportaron hasta el laboratorio en condiciones de refrigeración. A la llegada al laboratorio se retiró en condiciones asépticas la envoltura plástica en las unidades envueltas y en cada queso se hizo recuento de los siguientes grupos microbianos: flora aerobia mesófila total (en agar estándar para recuento en placa -SPCA-, tras incubación a 30 ºC durante 48 horas), flora halotolerante (en agar manitol sal -MSA-, tras incubación a 30 ºC durante 48 horas), flora acidoláctica (en agar MRS acidificado hasta pH 5,6 con ácido acético y con adición de un 0,2% de sorbato potásico, tras incubación a 30 ºC durante 3 días), enterococos (en agar K.A.A., tras incubación a 37 ºC durante 24 horas), *Enterobacteriaceae* (en agar V.R.B.G., tras incubación a 37 ºC durante 18-24 horas) y mohos y levaduras (en agar Sabouraud + cloramfenicol, tras incubación a 22 ºC durante 5 días). En todos los casos los medios de cultivo fueron suministrados por OXOID (Unipath Ltd., Basingstoke, Reino Unido).

En cada queso se determinaron también los parámetros físico-químicos con mayor influencia en el crecimiento microbiano (pH, acidez titulable y a_w), utilizando la metodología descrita por Nhuch y cols. (2008).

Para determinar el efecto del tiempo de almacenamiento y del envasado en película plástica sobre los recuentos de los distintos grupos microbianos se realizó un análisis estadístico de comparación de medias, con un intervalo de confianza del 95%, usando el test LSD y utilizando el programa informático Statistica 5.1 para Windows (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 1 y 2 recogen la evolución de los recuentos de los distintos grupos microbianos a lo largo del almacenamiento de los quesos sin envolver y envueltos, respectivamente.

Como puede observarse (Tabla 1) durante los dos primeros días de almacenamiento (días previos al envasado en película plástica) se observó un descenso de una magnitud de alrededor de una unidad logarítmica en la flora aerobia mesófila total, enterococos y *Enterobacteriaceae*, y un descenso de media unidad logarítmica en la flora halotolerante. A partir de los dos días, los diferentes grupos microbianos experimentaron un descenso suave y paulatino en sus recuentos a medida que transcurría el almacenamiento. La envoltura en película plástica no afectó de modo significativo a los recuentos de ningún grupo microbiano en ninguno de los puntos de muestreo establecidos durante el almacenamiento.

Los valores de pH (entorno a 4,3 a la salida de la prensa) y acidez titulable (hacia 1 g de ácido láctico/100 g de extracto seco a la salida de la prensa) apenas se modificaron durante el almacenamiento, no observándose diferencias significativas entre los quesos sin envolver y los envueltos. Los valores de actividad de agua (alrededor de 0,99 a la salida de la prensa) se mantuvieron inalterados en los quesos envueltos y descendieron paulatinamente en los quesos sin envolver hasta valores finales de hacia 0,97.

Tabla 1. Evolución de los recuentos (log u.f.c./g) de los diferentes grupos microbianos a lo largo del almacenamiento de los quesos del Cebreiro sin envolver (valores medios ± desviación estándar de los tres lotes).

	Días de almacenamiento							
	0	2	4	6	8	12	16	20
S.P.C.A.	9,072±0,281^{a}	7,905±0,610^{b}	7,598±0,422^{bc}	7,278±0,230^{bc}	7,133±0,387^{cc}	7,117±0,615^{cc}	6,341±0,615^{d}	6,469±0,120^{dc}
M.S.A.	2,973±0,776^{a}	2,333±0,338^{ab}	2,303±0,786^{ab}	2,282±0,505^{ab}	2,142±0,665^{ab}	1,757±1,527^{b}	2,198±0,478^{ab}	2,290±0,317^{ab}
M.R.S.	6,434±1,559^{a}	6,667±0,850^{a}	6,596±0,733^{a}	6,424±0,544^{a}	6,271±0,509^{a}	6,548±0,017^{a}	6,439±0,509^{a}	5,813±0,162^{a}
K.A.A.	3,351±0,683^{a}	2,457±0,446^{b}	2,152±0,284^{bc}	2,398±0,487^{bc}	2,102±0,132^{bc}	1,811±0,296^{c}	2,028±0,539^{bc}	1,779±0,682^{bc}
V.R.B.G.A.	4,197±0,434^{a}	3,044±0,241^{b}	3,061±0,060^{b}	2,808±0,346^{b}	2,901±0,192^{b}	2,666±0,517^{bc}	2,625±0,383^{bc}	2,062±0,429^{c}
Sab+Cloram.	3,623±0,872^{a}	3,682±0,435^{a}	3,753±0,369^{ac}	3,778±0,354^{ac}	3,752±0,431^{ac}	4,001±0,872^{abc}	4,772±1,039^{b}	4,596±0,802^{bc}

a-e Valores medios correspondientes al mismo grupo microbiano no seguidos de una letra común resultaron significativamente diferentes (P<0,05)

Tabla 2. Evolución de los recuentos (log u.f.c./g) de los diferentes grupos microbianos a lo largo del almacenamiento de los quesos del Cebreiro envueltos en película plástica (valores medios ± desviación estándar de los tres lotes).

	Días de almacenamiento							
	0	2	4	6	8	12	16	20
S.P.C.A.	9,072±0,281^{a}	7,757±0,579^{b}	7,449±0,376^{bd}	7,371±0,414^{bd}	7,152±0,444^{bd}	7,055±0,488^{bd}	6,211±0,824^{c}	6,690±0,239^{cd}
M.S.A.	2,973±0,776^{a}	2,492±0.345^{ab}	2,362±0,470^{ab}	1,873±0,598^{b}	2,250±0,352^{ab}	2,250±0,294^{ab}	2,100±0,347^{ab}	1,899±0,347^{b}
M.R.S.	6,434±1,559^{a}	6,819±0,822^{a}	6,569±0,646^{a}	6,370±0,544^{a}	6,182±0,388^{a}	6,562±0,066^{a}	6,340±0,357^{a}	6,019±0,426^{a}
K.A.A.	3,351±0,683^{a}	2,269±0,383^{b}	2,262±0,363^{b}	1,654±0,543^{b}	2,172±0,169^{b}	1,686±0,493^{b}	2,002±0,609^{b}	1,856±0,678^{b}
V.R.B.G.A.	4,197±0,434^{a}	3,030±0,123^{b}	3,009±0,425^{b}	2,748±0.337^{b}	2,781±0,413^{b}	2,554±0,505^{bc}	2,460±0,609^{bc}	1,931±1,078^{c}
Sab+Cloram.	3,623±0,872^{a}	3,655±0,387^{a}	3,699±0,425^{a}	3,780±0,445^{a}	3,617±0,527^{a}	3,845±0,326^{a}	4,162±0,589^{a}	4,204±0,535^{a}

a-d Valores medios correspondientes al mismo grupo microbiano no seguidos de una letra común resultaron significativamente diferentes (P<0,05)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Nhuch, E.L., Prieto, B., Franco, I., Bernardo, A., Carballo, J. (2008). Biochemical changes during the ripening of homemade "San Simón da Costa" raw milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 61: 80-89.

P151 ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES POR PARTE DE CEPAS DE *MICROCOCCACEAE* Y *STAPHYLOCOCCACEAE* AISLADAS DE EMBUTIDOS GALLEGOS

Sonia Fonseca, Aida Cachaldora, María Gómez, Inmaculada Franco y Javier Carballo

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

soniafonseca@uvigo.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las proteínas, junto con los lípidos, son los componentes mayoritarios de la materia seca en los productos cárnicos. Durante la maduración de los embutidos crudo-curados las proteínas sufren un proceso degradativo que da lugar a grandes modificaciones de la calidad sensorial de los embutidos, especialmente las relacionadas con la textura y el aroma. Sin negar la intervención de las peptidasas musculares, los microorganismos pertenecientes a las familias *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* son, en mayor o menor medida, responsables de estos procesos proteolíticos que tienen lugar durante la maduración de los embutidos crudo-curados.

El presente estudio tiene como finalidad evaluar la capacidad proteolítica de cepas de *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae*, aisladas de Botillo y Androlla (dos embutidos tradicionales gallegos), frente a actina, miosina y proteínas sarcoplasmáticas mediante técnicas de SDS-PAGE. Esta investigación tiene como fin último la selección de cepas con características idóneas para ser usadas como cultivos iniciadores propios en embutidos crudo-curados tradicionales gallegos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio se partió de 41 cepas aisladas de Androlla (15 de *Staphylococcus xylosus*, 16 de *Micrococcus luteus*, 3 de *Staph. epidermidis*, 2 de *Micrococcus lylae*, 2 de *Staph. equorum*, 1 de *Staph. saprophyticus*, 1 de *Staph. capitis* y 1 de *Kocuria varians)* y 34 cepas aisladas de Botillo (13 de *Staphylococcus saprophyticus*, 7 de *Micrococcus* spp., 6 de *Staph. xylosus*, 3 de *Staph. lentus*, 2 de *Staph. capitis*, 1 de *Staph. epidermidis*, 1 de *Staph. cohnii cohnii* y 1 de *Staph. sciuri*). Las cepas se identificaron por métodos clásicos (García Fontán y col., 2007a y b), confirmando con posterioridad su identidad con ayuda de las Galerías API 32 STAPH.

Para la extracción de las proteínas miofibrilares se siguió el método descrito por Fadda y col. (1999). La extracción de las proteínas sarcoplasmáticas se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Molina y Toldrá (1992). Para la extracción de actina y miosina se siguieron los métodos descritos por Pérez Juan y col. (2007) y Abdel-Mohsen y col. (2003) respectivamente.

En cada cepa se ensayó inicialmente, y de forma cualitativa, la capacidad proteolítica frente a proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas mediante el método con incubación en placa descrito por Mauriello y col. (2002) con algunas modificaciones. Las cepas que resultaron positivas en el análisis cualitativo fueron incubadas durante 72 horas a 37ºC con cada uno de los extractos proteicos (actina, miosina y proteínas sarcoplasmáticas) previamente esterilizados con filtros de tamaño de poro de 0.22 μm.

Tras la incubación, se estudió la capacidad proteolítica que presentaron las cepas ensayadas frente a cada extracto proteico mediante técnicas de SDS-PAGE siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). La identificación de las proteínas y de sus productos de degradación se llevó a cabo por comparación con un marcador de pesos moleculares, y se cuantificaron empleando el programa Quantity One de Bio-Rad. Los resultados de cada banda fueron expresados como porcentaje de la densidad óptica total.

RESULTADOS

El análisis cualitativo de la capacidad proteolítica resultó negativo para 1 cepa de *Staph. xylosus*, 2 de *Micrococcus luteus*, 2 de *Staph. epidermidis*, 1 de *Staph. capitis* y 1 de *Kocuria varians*, de las 41 cepas aisladas de Androlla, mientras que todas las cepas aisladas de Botillo resultaron positivas para este análisis.

Tras la incubación con cada uno de los extractos proteicos de las cepas que resultaron positivas para el análisis cualitativo, se comprobó que, de las cepas aisladas de Androlla, el 64.2% de las cepas de *Staph. xylosus*, el 7.14% de *Micrococcus luteus,* el 50% de *Micrococcus lylae*, el 50% de *Staph. equorum* y el 100% de *Staph. saprophyticus* no reflejaron cambios proteolíticos para ninguno de los tres extractos proteicos, presentando un perfil de bandas proteicas similar a las de una muestra control sin inocular. Para las cepas aisladas de Botillo, el 38.4% de las cepas de *Staph. saprophyticus*, el 14.2% de *Micrococcus* spp., el 50% de *Staph. xylosus*, el 66.6% de *Staph. lentus*, el 50% de *Staph. capitis* y el 100% de *Staph. epidermidis* no reflejaron cambios proteolíticos para ninguno de los tres extractos proteicos.

Dentro de las cepas que presentaron cambios proteolíticos, no se observó un comportamiento homogéneo. Para el extracto proteico de actina, de todas las cepas aisladas de Androlla, solamente 2 de *Staph. xylosus,* 1 de *Micrococcus luteus*, 1 de *Staph. epidermidis* y 1 de *Micrococcus lylae* presentaron degradación completa de la banda de actina (45 kDa). De las cepas aisladas de Botillo, 1 cepa de *Staph. saprophyticus*, 1 de *Micrococcus* spp., 1 de *Staph. xylosus*, 1 de *Staph. lentus*, 1 de *Staph. capitis* y 1 de *Staph. sciuri* presentaron degradación en las bandas proteicas, sin embargo ninguna de ellas degradó por completo la banda de actina.

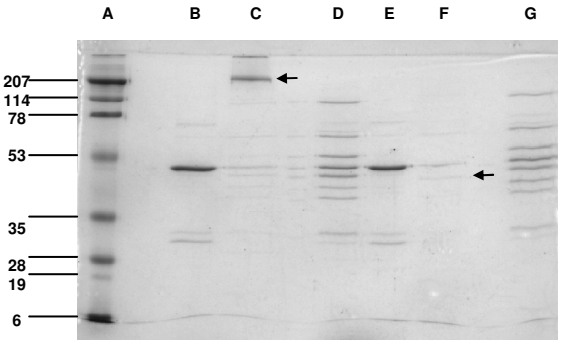


Figura 1. SDS-PAGE de los extractos proteicos tras 72 h de incubación. A: patrón de pesos moleculares. B-D: actina, miosina y prot. sarcoplasmáticas sin inocular. E-G: actina, miosina y prot. sarcoplasmáticas inoculadas con 1 cepa de *Staph. xylosus* aislada de Androlla.

Para el extracto proteico de miosina, de las cepas aisladas de Androlla, 2 cepas de *Staph. xylosus,* 8 de *Micrococcus luteus* y 1 de *Staph. equorum* fueron capaces de degradar por completo la banda correspondiente a la cadena pesada de la miosina (MHC-200 kDa) dando lugar, en algunas cepas, a la aparición de bandas proteicas de aproximadamente 125 kDa, 66 kDa y 42 kDa. En la Fig. 1 se muestra, a modo de ejemplo, esta degradación completa de la banda de MHC y la aparición de una nueva banda de 42 kDa. En cuanto a las cepas aisladas de Botillo, 1 de *Staph. saprophyticus* y 1 de *Staph. capitis* degradaron por completo la banda de MHC generándose bandas de 50 kDa y 46 kDa, y 42 kDa, 19 kDa y 14 kDa, respectivamente; además, 3 cepas de *Micrococcus* spp. también fueron capaces de degradar completamente la banda de MHC, generándose en una de ellas bandas de 50 kDa y 46 kDa.

Para las proteínas sarcoplasmáticas, de las cepas aisladas de Androlla, 1 de *Staph. xylosus*, 4 de *Micrococcus luteus* y 1 de *Staph. equorum* degradaron de forma completa todas las bandas del extracto. De la misma forma, para las cepas aisladas de Botillo, la degradación de estas bandas fue completa para 1 cepa de *Staph. saprophyticus*, 1 de *Micrococcus* spp. y 1 de *Staph. xylosus*.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que las especies de *Staphylococcaceae* y *Micrococcaceae* presentan proteinasas capaces de degradar las proteínas musculares; ocurre, no obstante, que la presencia de estas actividades enzimáticas es muy variable incluso en cepas pertenecientes a la misma especie, dando lugar a diferentes perfiles de bandas proteicas .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Mohsen, H.A., Nakamoto, M., Kim, J., Nogusa, Y., Gekko, K., Ishioroshi, M., Samejima, K., Tanabe, S., Nishimura, T. (2003). Changes in the properties of porcine myosin during postmortem aging. *Food Science and Technology Research*, 9: 297-303.

Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.C., Oliver,G., Toldrá,F. (1999). Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3540-3546.

García-Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J. (2007a). Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LWT*, 40: 1610-1622.

García-Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I., Carballo, J. (2007b). Microbiological characteristics of Androlla, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*, 24: 52-58.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Mauriello, G., Casaburi, A., Villani, F. (2002). Protelytic activity of *Staphylococcus xylosus* strains on pork myofibrillar and sarcoplasmatic proteins and use of selected strains in the production of "Naples type" salami. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 482-490.

Molina, I., Toldrá, F. (1992). Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 57: 1308-1310.

Pérez-Juan, M., Flores, M., Toldrá, F. (2007). Simultaneous process to isolate actomyosin and actin from post-rigor porcine skeletal muscle. *Food Chemistry*, 101: 1005-1011.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la Xunta de Galicia, proyectos PGIDIT05PXIB38303PR y 07TAL021383PR.

SEGURIDAD ALIMENTARIA

COMUNICACIONES ORALES

O79 BACTERIÓFAGOS PORTADORES DEL GEN DE LA TOXINA SHIGA 2 EN ALIMENTOS EVALUADOS POR PCR CUANTITATIVA.

Lejla Imamovic y Maite Muniesa
Departamento de Microbiología, Facultad de biología. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 645. Edificio anexo. 08028 Barcelona. lejla.imamovic@gmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las toxina Shiga (Stx) es uno de los principales factores de patogenicidad de las cepas de *Escherichia coli* productoras de Stx (STEC) y están involucradas en procesos citotóxicos y apoptosis en las células del tracto intestinal del huésped. Muchos brotes causados por STEC se han asociado al consumo de alimentos y aguas contaminadas. A nivel mundial, estos brotes se han asociado a diferentes serotipos, entre los que destacan los serotipos O157, O26, O103 ó O113 (Nataro and Kaper, 1998).

Los genes *stx* forman parte del genoma de profagos del tipo lamboide (Herold et al., 2004). Estos profagos pueden inducirse a partir de cepas lisógenas aplicando agentes inductores que tengan un efecto sobre el ADN. Los fagos Stx inducidos son capaces de infectar nuevas cepas no STEC, lisogenizarlas y transducirles el gen *stx*. La bacteria huésped lisogenizada se convierte en una nueva cepa productora de la toxina Shiga. Este proceso se ha realizado experimentalmente *in vitro* e *in vivo* y también se ha demostrado que puede suceder en matrices de alimentos (Imamovic et al., 2009). Se sugiere que la ingestión de fagos Stx, bien por humanos o por animales, podría causar la transducción de *stx* a cepas de *E. coli* presentes en la flora intestinal.

Los fagos Stx se han detectado en ambientes extraintestinales de diversas áreas geográficas. Aparte de detectarse en heces humanas y animales, también se han detectado en aguas residuales con contaminación fecal humana, en muestras de agua residual con contaminación fecal animal de diversos orígenes (vacas, cerdos, aves, etc) (Imamovic et al., 2010b; Muniesa and Jofre, 1998) y se han detectado en muestras de agua de río que presentan menores niveles de contaminación. Los fagos Stx han resultado ser muy abundantes en estos ambientes, incluso en zonas y momentos sin especial incidencia de infecciones causadas por STEC. La abundancia de estos fagos en el medio ambiente sugiere que hay un reservorio ambiental de fagos Stx que circula entre la población. Su presencia en ambientes contaminados fecalmente sugiere que ha de haber ingestión y posterior excreción de fagos Stx (bien como fagos libres o bien en cepas bacterianas portadoras) por parte de humanos y/o animales. Teniendo todo en cuenta, faltan estudios sobre la posible presencia y abundancia de fagos Stx en muestras de alimentos aptos para el consumo. En este trabajo se pretende dar respuesta a esta pregunta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron para este estudio 31 muestras de ensalada y 36 muestras de carne picada de ternera. Los alimentos se compraron en establecimientos comerciales y se analizaron para la presencia de *E. coli* mediante el medio Chromocult y colifagos somáticos según el método ISO. Los niveles de *E. coli* de las muestras indicaron bajos niveles de contaminación y no se detectaron colifagos somáticos en las muestras. A partir de 25 g de cada muestra, se resuspendieron en 110 ml de PBS, se homogenizaron y se filtraron mediante membranas de 0.22 μm de baja adsorción proteica, a fin de separar la fracción vírica de las muestras. La fracción vírica de las muestras se concentraron 100X y se trataron con ADNasa (100 U/ml) para eliminar restos de ADN no viral libre en la muestra. En este punto se guardó una alícuota para ser utilizada como control. El ADN de la fracción vírica de estas suspensiones se extrajo mediante digestión por proteinasa K y se cuantificó. El ADN de la fracción vírica se utilizó para cuantificar el gen *stx* mediante una PCR cuantitativa (qPCR) utilizando una sonda TaqMan MGB específica que permite la detección de diversas variantes del gen stx_2 (Imamovic et al., 2010a). La técnica de qPCR utilizada permitió cuantificar el número de copias del gen *stx* en la fracción vírica de los bacteriófagos extraídos de cada muestra. Dado que los fagos Stx descritos hasta el momento sólo llevan 1 copia del gen *stx*, se extrapoló el número de copias *stx* detectadas al número de fagos Stx presentes en las muestras. Los controles indicaron que las copias del gen *stx* sólo se detectaron en el ADN extraído de los fagos. Asimismo, los controles descartaron la presencia de inhibidores en las muestras.

En paralelo, la presencia del gen *stx* en las muestras se verificó por PCR convencional. Para ello se utilizó una PCR anidada, correspondiente a la misma zona amplificada por qPCR. Algunos de los amplímeros obtenidos por PCR convencional se secuenciaron para verificar la presencia del gen *stx*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultaron por qPCR indican la presencia de fagos Stx en un 65,6 % de muestras de ensalada (frente a un 50 % de muestras positivas detectadas por PCR convencional). De éstas, los valores de fagos Stx oscilan entre 10^2 a 1.6×10^4 copias de gen *stx* (GC*stx*)/25g de ensalada. Para las muestras de carne picada, el 86,8 % de las muestras fueron positivas por qPCR (tan sólo un 40 % por PCR convencional) y el número de fagos Stx osciló entre 1.01×10^2 a $1,8\times10^5$ GC*stx*)/25g de carne picada de ternera., dependiendo de la muestra.

Estudios previos realizados por nuestro grupo indican que entre un 1/10-1/1000 de los fagos detectados por qPCR son realmente infectivos (Imamovic *et al*., 2010a). Este rango varía, dependiendo del fago y de la cepa huésped utilizada. Estas aproximaciones sugieren la presencia de fagos Stx infecciosos en algunas de las muestras de este estudio.

La presencia y el número relativamente elevado de fagos Stx en los alimentos son un indicativo de que, al igual que ocurre en el medio ambiente, éstos están ampliamente presentes en muchos ambientes. La presencia de estos fagos indica la dispersión de estos genes de virulencia codificados en elementos genéticos horizontales. La inducción *in vivo* de fagos Stx, así como el uso de algunos antibióticos, usados como promotores del crecimiento, y de otros agentes inductores pueden incrementar la cantidad de fagos portadores de genes de virulencia en el ambiente. Éstos pueden ser ingeridos directamente y causar conversión de nuevas bacterias huésped en el tracto intestinal o convertirlas en la propia matriz alimentaria. Todo este movimiento sin duda contribuye a la diseminación de los genes de la toxina Shiga.

CONCLUSIONES

Los fagos Stx están presentes en diversas muestras de carne picada y en ensalada, aunque en cantidades variables. Se asume que no todos los fagos Stx detectados han de ser infectivos y por tanto capaces de transducir el gen *stx*. Sin embargo diversas aproximaciones indican que algunos sí puedan ser infecciosos. La presencia de fagos Stx en alimentos es un factor nuevo a considerar, aunque su implicación en la salud humana está por determinar. Su presencia confirma el papel de los fagos como elementos genéticos móviles y su implicación en la aparición de nuevas cepas virulentas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acheson, D. W. K., J. Reidl, , X. Zahang, G. T. Keusch, J. J. Mekelanos and M. K. Waldor. 1998. In vivo transduction with shiga toxin 1-encoding phage. Infect. Immun. 66: 4496-4498.

Herold, S., H. Karch, and H. Schmidt. 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. Int. J. Med. Microbiol. 294: 115–121.

Imamovic L, Jofre J, Schmidt H, Serra-Moreno R, Muniesa M. 2009. Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. Appl Environ Microbiol. 75(6):1764-8.

Imamovic L, Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. 2010a. Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. J Appl Microbiol. 2010 Mar;108(3):1105-14.

Imamovic, L. E. Ballesté, J. Jofre and M. Muniesa. 2010b. Shiga-toxin converting bacteriophages in wastewater and fecal samples quantified by QPCR. Appl Environ Microbiol. In press.

Nataro, J. P. and, J. B Kaper. Shiga-toxin converting bacteriophages in wastewater and fecal samples quantified by QPCR. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11: 142–201.

Muniesa, M, and J. Jofre. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2443-2448.

O97 ESPONJA VERSUS MINI-RODILLO EN LA DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y EN EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Diego Gómez[1], Agustín Ariño[1], Juan José Carramiñana[1*], Carmina Rota[1*] y Javier Yangüela[1*]*

[1]Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza

dgomez@unizar.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Listeria monocytogenes es el microorganismo patógeno asociado a brotes alimentarios más importante debido a su alta tasa de mortalidad (20-30%) (Ryser and Marth, 1999; Tiwari and Alenrath, 1990), su persistencia (Tompkin, 2001) y distribución en el ambiente del procesado de alimentos (Lunden et al., 2002; Vogel et al., 2001) y su capacidad para crecer, hasta poblaciones de 10^4 a 10^6 UFC/g, en muchos alimentos refrigerados listos para el consumo como salmón ahumado y marinado, quesos de pasta blanda y semiblanda y carne y productos cárnicos fileteados (Gombas et al. 2003; Ryser and Marth, 1999).

Precisamente, debido a la importancia de *L. monocytogenes* y su capacidad para formar biopelículas en superficies en contacto con los alimentos, se ha realizado una primera experiencia de técnicas de muestreo ambientales para el control microbiológico de *L. monocytogenes* en superficies muy comunes en la industria alimentaria, una mesa de acero inoxidable (tiempo de uso 10 años) y una lámina de acero inoxidable (con la superficie intacta). Para ello, se han ensayado el procedimiento más utilizado para el muestreo de superficies, como es la esponja de celulosa (Biotrace) y un nuevo procedimiento de toma de muestra "mini-rodillo" de nailon de 6 cm de longitud (Dexter), ambas superficies se contaminaron con cepas de *L. monocytogenes*. En una segunda experiencia se ha comprobado el resultado de ambos dispositivos para el control de la contaminación en superficies de acero inoxidable de industrias alimentarias (recuento de aerobios mesófilos y de enterobacterias/cm^2).

MATERIAL Y MÉTODOS

En la primera experiencia se han utilizado cuatro cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos (longaniza oreada, carne picada de cerdo, paleta de jamón y chorizo fresco sin nitratos ni nitritos). Las superficies en estudio se dividen en cuadrículas de 100 cm^2 y se contaminan con aproximadamente 10^5 *L. monocytogenes*. Para ello, se prepararon fracciones de ensayo de carne picada de cerdo (15 g) en agua de peptona al 0,1% (Difco) (135 ml)

añadiendo inóculo de *L. monocytogenes* hasta alcanzar una concentración de 10^6/ml. El inóculo se extendió con la ayuda de un asa de Drigalski de vidrio estéril. A continuación, las cuadrículas se dejaron secar durante 10 minutos.
En los procedimientos de toma de muestra (esponja de celulosa y mini-rodillo de nailon) se han seguido las indicaciones de la ISO 18593.
El sistema de homogeneización empleado ha sido el aparato Stomacher. Las siembras (0,25 ml por cuadruplicado) se han efectuado sobre los agares selectivos ALOA y PALCAM (Merck) incubándose a 37ºC/24-48h. Los recuentos obtenidos se han expresado como porcentaje de recuperación. Los procedimientos se han ensayado por quintuplicado sobre cada una de las cuatro cepas de *L. monocytogenes*.
Para la segunda experiencia, los recuentos de aerobios mesófilos y enterobacterias (100 cm^2) en la industria alimentaria, tras homogeneizar en Stomacher los mini-rodillos y las esponjas en 100 ml de agua de peptona al 0,1%, se han realizado siguiendo las normas ISO 4833:2003 y 21528-2.
A los resultados obtenidos se les ha aplicado un análisis de varianza de una vía y de t-student con el programa GraphPad Prism 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha señalado, cada uno de los procedimientos ensayados se comprobó por quintuplicado con las cuatro cepas de *L. monocytogenes* y sobre las dos superficies en estudio. Los resultados recogen las medias de los porcentajes de recuperación.
En la Tabla 1 se comprueba que el porcentaje de recuperación obtenido ha sido mayor con el mini-rodillo que con la esponja en ambas superficies, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Tabla 1. Media de los porcentajes de recuperación de las 5 réplicas con la esponja y el mini-rodillo sobre las dos superficies en estudio.

	Mesa acero inoxidable		Lámina acero inoxidable	
Cepa de *L. monocytogenes*	Esponja	Mini-rodillo	Esponja	Mini-rodillo
Longaniza oreada	1,7	3,5	0,6	2,5
Carne picada de cerdo	0,4	9,1	0,6	1,4
Paleta de cerdo	1,9	1,8	1,9	1,8
Chorizo fresco	1,2	1,5	0,2	0,4
Media	1,3	4,0	0,8	1,5

Teniendo en cuenta los medios de cultivo utilizados y los tiempos de incubación y al no existir diferencias estadísticas, podemos señalar que se puede utilizar cualquier medio selectivo tras 24 horas de incubación (Tabla 2).

Tabla 2. Media de los porcentajes de recuperación para las distintas condiciones de incubación (agar y temperatura).

	Palcam 24 h	Palcam 48 h	ALOA 24 h	ALOA 48 h
Media	1,5	1,6	1,8	1,9

En las industrias alimentarias (Tabla 3), en las superficies de acero inoxidable analizadas, se han obtenido recuentos de aerobios mesófilos alcanzando valores de 4,3 u. log/cm^2, mientras que en enterobacterias sólo en dos muestras se han obtenido recuentos (0,6 y 0,8 u. log/cm^2). No se detectan diferencias entre los procedimientos de toma de muestra lo que confirma que cualquiera de los procedimientos ensayados puede ser utilizado en superficies de acero inoxidable de la industria alimentaria.

Tabla 3. Recuentos obtenidos (log UFC/cm^2) en superficies de acero inoxidable de industrias alimentarias

	Aerobios mesófilos		Enterobacterias	
Muestra	Esponja	Mini-rodillo	Esponja	Mini-rodillo
Multicabezal	4,3	4,3	0,0	0,0
Cutter	0,7	0,7	0,0	0,0
Tolva embutidora salchichas	0,3	0,6	0,0	0,0
Mesa grande matanza	2,8	2,5	0,0	0,0
Mesa pincho morunos	3,7	1,8	0,6	0,8
Mesa despiece	2,9	3,0	0,0	0,0
Fondo embutidora	1,8	1,0	0,0	0,0
Mesa embutir morcilla	0,5	0,0	0,0	0,0
Mesa pulido	3,2	3,2	0,0	0,0
Media	2,2	1,9		

CONCLUSIONES

En las superficies de acero inoxidable contaminadas con *L. monocytogenes* el procedimiento mini-rodillo de nailon se ha mostrado significativamente más eficaz; mientras que para el control de la contaminación en las superficies de la industria alimentaria, el comportamiento de ambos sistemas ha sido similar. Por lo que el procedimiento de toma de muestra de mini-rodillo puede sustituir al procedimiento de la esponja.
Cuando se trate de obtener recuento o detección de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable en la industria alimentaria se pueden obtener resultados convenientes tras 24 h de incubación en cualquiera de los medios selectivos (ALOA y PALCAM).

AGRADECIMIENTOS
Al Ministerio de Educación y Ciencia por el apoyo económico mediante el Proyecto Consolider-Ingenio 2010 - Carnisenusa CSD 2007-00016 y a la Diputación General de Aragón por el Proyecto Grupo Investigación Consolidado A01/2008.

O111 EFICACIA DE LA TECNOLOGÍA DE PULSOS DE LUZ PARA LA INACTIVACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN CAÑA DE LOMO IBÉRICO

Elvira Barroso, Eva Hierro, Xavier F. Hospital, Susana Manzano y Manuela Fernández
Departamento de Nutrición Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n. Ciudad Universitaria. 28040, Madrid.
elvira.barroso@gmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La tecnología de pulsos de luz consiste en la aplicación de destellos intensos de luz blanca caracterizados por su corta duración (10^{-3}-10^{2} milisegundos) y amplio espectro de emisión (200-1000 nm). Dada su naturaleza, se trata de una tecnología no térmica adecuada para la descontaminación de superficies y líquidos en capa fina. Su efecto antimicrobiano se debe principalmente a la radiación UV-C, que induce daños fotoquímicos en los ácidos nucleicos, membranas celulares y sistemas enzimáticos de los microorganismos (Wang y col., 2005). A este efecto hay que unir un daño fototérmico debido al incremento local y momentáneo de la temperatura en la superficie del producto tratado que, por la corta duración del pulso, no se traduce en un aumento significativo de la temperatura global del mismo, pero a nivel local contribuye de forma importante a la inactivación microbiana. En estudios recientes se ha demostrado que esta tecnología puede atravesar diversos polímeros transparentes de los que habitualmente se emplean para el envasado de los alimentos (Fernández y col., 2009). Por todo ello la tecnología de pulsos de luz se podría considerar adecuada, entre otras aplicaciones, para la descontaminación superficial de los alimentos listos para el consumo (RTE). Las operaciones a las que se someten este tipo de productos antes de su comercialización (troceado, loncheado y envasado) implican un riesgo de contaminación por bacterias alterantes y patógenas. El objetivo de este estudio es comprobar la utilidad de la tecnología de pulsos de luz para inactivar dos patógenos de interés en los productos cárnicos RTE, *Staphylococcus aureus y Escherichia coli* O157:H7, empleando como matriz alimentaria lonchas de caña de lomo ibérico envasadas al vacío.

MATERIAL Y MÉTODOS

Staphylococcus aureus (CECT 4013) y *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 4972) se inocularon en la superficie de lonchas de lomo ibérico comercial con una concentración de microorganismos del orden de 10^4 ufc/cm². Una vez inoculadas, las lonchas se dejaron secar durante toda la noche en refrigeración y se envasaron al vacío en un copolímero de poliamida/polietileno/acetato de vinilo, de 48 μm de espesor. A continuación, las muestras se trataron en un equipo de pulsos de luz Steribeam SBS XeMatic-2L-A con diferentes fluencias (0,7, 2,1, 4,2, 8,4 y 11,9 J/cm²). Los resultados obtenidos se compararon con muestras control (inoculadas y sin tratar).

Inmediatamente tras la aplicación del tratamiento, se obtuvo el correspondiente homogeneizado en agua de peptona y las diluciones obtenidas se sembraron en placas de Petri que se incubaron a 37ºC durante 24 horas. Para la siembra se emplearon medios generales (TSA) y selectivos (agar Baird Parker para *S. aureus* y agar sorbitol MacConkey para *E. coli*) y se utilizó también el método "thin agar layer" (TAL), combinando dos capas de medio selectivo y no selectivo para cada uno de los microorganismos (Wu, 2008).

En lonchas de lomo no inoculadas y tratadas con las distintas fluencias se realizó un test sensorial de rango múltiple y una prueba descriptiva. Para ello se utilizó un panel constituido por 12 catadores entrenados. Los análisis se realizaron inmediatamente tras la aplicación del tratamiento y en dos puntos durante 30 días de almacenamiento en refrigeración (4ºC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para ambos microorganismos, la inactivación conseguida por el tratamiento con pulsos de luz osciló desde aproximadamente 1 log ufc/cm² con la fluencia más baja, hasta aproximadamente 1,5-1,7 log ufc/cm² con las fluencias más altas (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre los distintos métodos de recuento ensayados.

El tratamiento sólo afectó a la calidad sensorial del producto cuando se utilizaron fluencias a partir de 8,4 J/cm² y el análisis se realizó inmediatamente después de su aplicación (Tabla 2). No se detectaron diferencias entre las muestras a los 15 y 30 días de almacenamiento, lo que parece indicar que las posibles modificaciones organolépticas provocadas por los pulsos de luz se estabilizaron con el mantenimiento en atmósfera de vacío y en refrigeración.

Tabla 1. Inactivación* (log ufc/cm²) de *Staphylococcus aureus* (recuento inicial = 4,81 ± 0,08 log ufc/cm²) y *Escherichia coli* O157:H7 (recuento inicial = 4,69 ± 0,02 log ufc/cm²) en lonchas de lomo ibérico tratadas con diferentes fluencias de pulsos de luz.

	Fluencia (J/cm²)				
	0,7	2,1	4,2	8,4	11,9
S. aureus (log ufc/cm²)	0,86 ± 0,36	1,21 ± 0,46	1,5 ± 0,27	1,66 ± 0,37	1,39 ± 0,30
E. coli (log ufc/cm²)	0,96 ± 0,09	1,14 ± 0	1,28 ± 0,01	1,23 ± 0,11	1,64 ± 0,52

*Se muestran los resultados obtenidos por el método "thin agar layer" (TAL).

Tabla 2. Evaluación sensorial, en distintos días de almacenamiento a 4ºC, de lonchas de caña de lomo ibérico envasadas al vacío y tratadas con diferentes fluencias de pulsos de luz.

		Suma de categorías*		
		Día 0		
Fluencia J/cm²	Aceptabilidad	Color	Olor	Sabor y Textura
0	49	49AB	42AB	51AB
0,7	56	65A	51A	54A
2,1	51	53AB	49AB	47AB
4,2	32	35AB	50A	38AB
8,4	32	24B	32AB	40AB
11,9	32	26B	19B	22B
		Día 15		
0	59	49	55	55
0,7	43	50	30	43
2,1	47	38	40	44
4,2	46	52	40	50
8,4	44	39	46	45
11,9	47	45	41	39
		Día 30		
0	41	41	63	61
0,7	41	42	37	40
2,1	50	41	40	41
4,2	44	36	45	40
8,4	37	35	34	31
11,9	39	36	33	39

*Suma de categorías: [(N1x6) + (N2x5) + (N3x4) + (N4x3) + (N5x2) + (N6x1)] donde N1, N2, N3, N4, N5 o N6 son el número de catadores que catalogan la muestra en la posición 1 (máxima preferencia), 2, 3, 4, 5 ó 6 en el orden del test de categoría.
A, B: Valores de la misma columna con distinta letra son diferentes significativamente (P<0,05).

CONCLUSIONES

La tecnología de pulsos de luz es razonablemente eficaz para reducir la contaminación por *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 en lomo curado RTE envasado al vacío, a la vez que mantiene intactas las características sensoriales del producto durante el almacenamiento hasta su comercialización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fernández, M., Manzano, S., de la Hoz, L., Ordónez, J.A. y Hierro, E. (2009). Pulsed light inactivation of *Listeria monocytogenes* through different plastic films. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 1265-1267.

Wang, T., MacGregor, S.J., Anderson, J.G. y Woolsey, G.A. (2005). Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research* 39, 2921–2925.

Wu, V.C.H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology* 25, 735–744.

O136 ESTUDIO DE PATOGENICIDAD Y TIPADO DE AISLADOS CLÍNICOS DE LISTERIA MONOCYTOGENES

Jaime Ariza-Miguel[1,2], *Marta Diez-Valcarce*[1], *Katarina Kovac*[1], *María Isabel Fernández-Natal*[3], *Hortensia Rodríguez-Pollán*[3], *David Rodríguez-Lázaro*[1] *y Marta Hernández*[1*]

[1]*Instituto Tecnológico Agrario (ITA), Valladolid, España.*

ita-arimioja@itacyl.es

[2]*Universidad de León, León, España*

[2]*Servicio de Microbiología Clínica, Complejo Asistencial de León (SACYL) e Instituto de Biomedicina (IBIOMED), León, España.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Listeria monocytogenes es el único integrante del género *Listeria* que es patógeno para el ser humano. Se trata de un bacilo Gram positivo, hemolítico, no esporulado, anaerobio facultativo, catalasa positivo, y móvil entre los 10 y los 25ºC. La ingestión de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* puede provocar listeriosis, una enfermedad severa caracterizada por meningoencefalitis, abortos y septicemia, y que presenta un alto porcentaje de mortalidad (30%)[1]. Esta enfermedad afecta preferentemente a ciertos grupos de riesgo que incluyen mujeres embarazadas, bebés, ancianos y pacientes con problemas en el sistema inmunitario[2]. Aproximadamente un tercio de las infecciones causadas por *L. monocytogenes* ocurren en mujeres embarazadas y en el feto o el bebé recién nacido, y el resto en individuos adultos mayores de 40 años debido a que su sistema inmune o bien no está desarrollado o bien no funciona de forma adecuada. Los adultos que cursan listeriosis desarrollan septicemia en un 15-50% de los casos y meningitis en el 55-70%. El objetivo de este trabajo es la identificación y caracterización de *L. monocytogenes* en nueve pacientes con un cuadro de meningitis, y la determinación de su grado de patogenicidad y virulencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los aislados clínicos fueron obtenidos mediante cultivo en placas de agar-chocolate de sangre y/o liquido cefalorraquídeo de nueve pacientes. Para la identificación microbiológica se usaron 3 tipos de medios: Agar cromogénico selectivo para *Listeria* spp. ALOA (Chromogenic *Listeria* Agar Base ref. CM1084; Chromogenic *Listeria* Selective Supplement ref. SR0226E y Brillance *Listeria* Differential Supplement ref. SR0228E, OXOID, Cambridge, Reino Unido), agar cromogénico selectivo "RAPID'*L.mono* in 24 hr" (Bio-Rad, Hércules, California,

EE.UU.), y agar-sangre de cordero (ref. 064-PA0004, SCHARLAB, Barcelona, España). En paralelo se llevó a cabo por duplicado el test de CAMP empleando la cepa *Staphylococcus aureus* CECT 828 y una serie de controles: *Listeria innocua* CECT910 como control negativo, *L. monocytogenes* ITA1315 como control positivo y *Listeria ivanovii* ATCC19119 como cepa hiperhemolítica. Con estos mismos controles también se evaluó la capacidad lecitinasa de los aislados en placas de agar infusión de cerebro corazón (BHIA, Difco ref. 241830) suplementadas en un 5% (v./v.) con una solución de lecitina. Las placas fueron incubadas a 37ºC en condiciones de aerobiosis y se analizó la aparición de un halo de lipólisis a las 24, 48 y 72 horas de su cultivo. La confirmación se realizó tras el cultivo de los aislados en caldo cerebro corazón (BHI, Difco ref. 237500) a 37ºC durante 18 horas y la extracción de ADN utilizando el kit QIAamp DNA Mini Kit (ref. 51306, QIAGEN, Hilden, Alemania) y posterior amplificación por PCR a tiempo real utilizando los sistemas previamente descritos para *Listeria* spp.[3], *L. monocytogenes*[3], *L. innocua*[4] y *L. ivanovii*[5]. Los aislados fueron serotipados por PCR en el Instituto Pasteur, agrupándose en PCR grupos. La electroforesis en campo pulsado (PFGE) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Graves y Swaminathan (2001)[6], utilizando como enzima de restricción primaria *Apa*I y como secundaria *Asc*I. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el software GelCompar II versión 6.0 (Applied Maths NV, Saint-Martins-Latem, Bélgica).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados clínicos fueron confirmados como *L. monocytogenes* tanto mediante cultivo microbiológicos como por PCR a tiempo real. Además, los aislados 1, 4, 7, 8 y 9 se encuadraron dentro del grupo de PCR IVb (serovar 4b, 4d o 4e), el 2 y el 3 en el grupo IIa (serovar 1/2a o 3a), el aislado 5 en el grupo IIc (serovar 1/2c o 3c) y el 6 perteneció al grupo IIb (serovar 1/2b, 3b o 7).

Tanto en el test de CAMP como en la evaluación de la actividad lecitinasa, todos los aislados mostraron una capacidad hemolítica/lecitinasa similar entre si y a su vez similar a la cepa tipo de *L. monocytogenes* ITA1315 utilizada como control en ambos test. Mediante PFGE se obtuvieron, combinando los resultados de las enzimas de restricción *Apa*I y *Asc*I, *7* pulsotipos distintos para los nueve aislados clínicos (Figura 1) con un coeficiente de correlación cofenética de 0,97. Los aislados clínicos 6093060/7026001 y 910005848/9102728 mostraron sus pulsotipos combinados iguales entre sí, mientras que el resto de aislados mostraron diferencias.

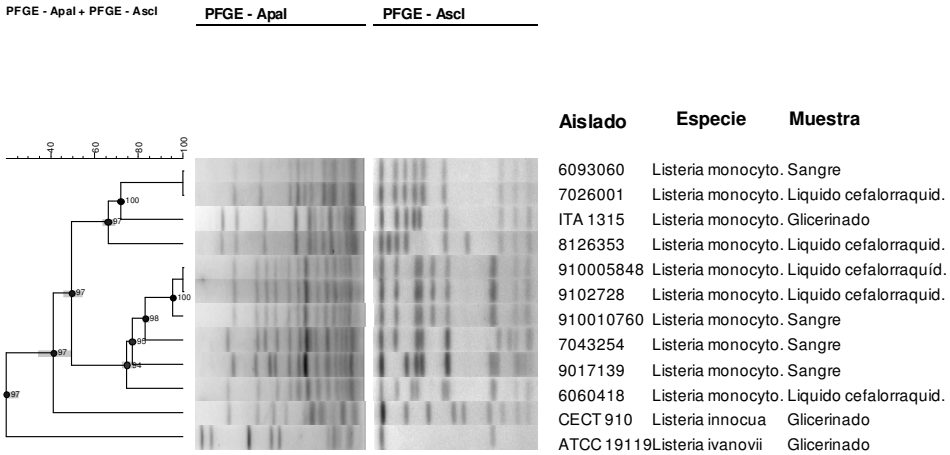


Figura 1. Dendrograma (agrupamiento UPGMA basado en el coeficiente de correlación Dice) de 9 aislados clínicos de *L. monocytogenes* y tres cepas tipo de *L. monocytogenes, L. innocua* y *L. ivanovii* obtenido con los pulsotipos combinados de *Apa*I y *Asc*I. Para la comparación de las bandas se usó el software GelCompar II versión 6.0 con unas posiciones de tolerancia y optimización de 1,50%.

CONCLUSIONES

Los aislados clínicos fueron confirmados como *Listeria monocytogenes* mostrando una capacidad hemolítica similar entre sí y a su vez similar a la cepa control. Además se constató mediante el genotipado por PFGE y por PCR una variabilidad entre las cepas causantes de la enfermedad, ya que en siete de los nueve casos mostraron un patrón diferente. Los aislados están siendo analizados en su patogenicidad y virulencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Schuchat et al. (2001). Epidemiology of Human Listeriosis. Clin Microbiol Rev 4:2, 169-183.

K. Polysoidis et al. (2004). Fatal meningitis due to *Listeria monocytogenes* in elderly patients with underlying malignancy. J.Clin.Pract 58:3, 292-296.

Rodriguez-Lázaro et al. (2004). Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. FEMS Microbiol Lett 233:2, 257-267.

Rodriguez-Lázaro et al. (2004). Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. Appl Environ Microbiol 70:3, 1366-1377.

Rodriguez-Lázaro et al. (in press). *smc*L as a novel diagnostic marker for quantitative detection of *Listeria ivanovii* in biological samples. J Appl Microbiol.

Graves, L. M. & Swaminathan, B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol 65, 55–62.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto Europeo FP7-PEOPLE-2007-2-2-ERG ref. 209050; FoodPath.

O154 EFECTO COMBINADO DE CO_2 Y NISINA EN BIOFILMS DE *L. MONOCYTOGENES* ADAPTADOS Y NO ADAPTADOS AL CLORURO DE BENZALCONIO TRANSFERIDOS A MEJILLÓN.

*Paula Saá Ibusquiza, Juan Herrera, Daniel Vázquez, Sonia Carrera y Marta Cabo**
Instituto Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Marinas (C.S.I.C.). C/ Eduardo cabello 6 Vigo 36208 psaa@iim.csic.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

De acuerdo con las últimas inspecciones realizadas por la EFSA (2009, 2010), uno de los alimentos con mayor incidencia en *L. monocytogenes* son los productos de la pesca listos para el consumo. Y en ocasiones, su presencia en alimentos se asocia a su transferencia por contacto desde las plantas de procesado, donde *L. monocytogenes* persiste formando biopelículas (Porsby et al. 2008, Rodríguez and McLandsborough 2007). Además, se ha demostrado que las cepas de *L. monocytogenes* persistentes son resistentes a QACs como el cloruro de benzalconio (BAC) (Aase et al 2000). Por otro lado, el envasado en atmósferas modificadas (EAM) es una técnica de conservación aplicada con éxito en alimentos de origen marino (Pastoriza et al. 1996a, 1996b, 1998, 2002, 2004; Cabo et al. 2003), pudiendo favorecer el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos como *L. monocytogenes*. En estas situaciones, la aplicación de bacteriocinas constituye una solución útil para incrementar la calidad y seguridad (Cabo et al. 2001, 2005, 2009). De este modo, en una planta de procesado de mejillón puede existir el riesgo de que células de *Listeria monocytogenes* adaptadas al BAC persistan formando biopelículas y se transfieran por contacto al mejillón antes del envasado. Sin embargo, no existen estudios previos acerca de los efectos de la adaptación de *L. monocytogenes* a desinfectantes de amplio uso industrial sobre su resistencia a la aplicación de atmósferas modificadas.

El principal objetivo de este trabajo es comparar la resistencia de biopelículas de *L. monocytogenes* CECT 5873 de 7 días de maduración adaptadas y no adaptadas al BAC a la aplicación de nisina y al envasado en atmósferas modificadas ricas en CO_2 una vez transferidas a mejillón cocido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y medios de cultivo: *Listeria monocytogenes*, CECT 5873 fue suministrada por la CECT (Valencia, España). La cepa 5873 adaptada al BAC (MIC=7.2 mg/l) se obtuvo en experimentos previos mediante 2 exposiciones sucesivas a concentraciones crecientes de inóculo y subletales de BAC de la cepa salvaje correspondiente (MIC=2.7 mg/l). La preparación de los inóculos en los medios residuales se realizó de acuerdo con Saá Ibusquiza et al. 2010.

Formación de biofilms: mediante incubación durante 7 días a 25º C en 9 ml de medio residual inoculado con la cepa salvaje o adaptada de *L. monocytogenes*.

Transferencia: mediante el contacto del cupón y la vianda del mejillón durante 2min., alcanzándose 5.6 log UFC de *L. monocytogenes* por gramo de mejillón.

Nisina DANISCO (A/S Dinamarca)*:* Se aplica en disolución acuosa (210, 115, 21 UI/ml) después de la transferencia. Se dosifica sobre la vianda del mejillón de acuerdo al diseño experimental.

Envasado y almacenamiento: Los mejillones se envasan en bolsas tipo barrera (Cryovac, SL). Las mezclas de gases fueron suministradas por Carburos Metálicos (Barcelona, España). Las muestras se almacenaron en cámara de refrigeración a 2,5ºC hasta el momento de muestreo.

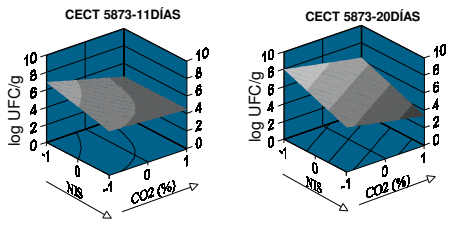
Diseño experimental: Se utilizó un diseño experimental factorial ortogonal (Box & Hunter, 1988)

Determinación de L. monocytogenes: después de 11 y 20 días de almacenamiento, se determinó el nº de células viables de *L. monocytogenes* mediante los métodos tradicionales de siembra en placa y utilizando agar Palcam (Liofilchem, S.L.R., Italia) a pH=9 como medio de cultivo. El pH del agar se ajustó a 9 para asegurar la inactivación de la nisina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

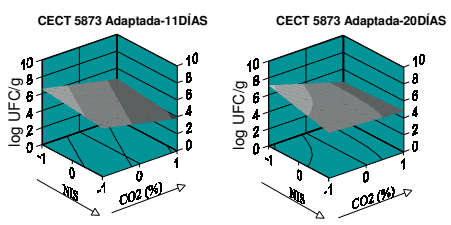
El nº de *L. monocytogenes* viables (LM, en log UFC/g) durante el almacenamiento resultó describible mediante las siguientes ecuaciones:

A. Cepa 5873 salvaje



11D: LM=5.25-0.45C-0.74N+0.46CN
20D: LM=5.65-1.43C-0.86N

B. Cepa 5873 adaptada



11D: LM=5.24-0.45C-0.94N
20D: LM=5.47-0.37C-0.79N+0.54CN

Figura 1. Efecto combinado de CO_2 y nisina sobre la supervivencia de L. monocytogenes CECT 5873 no adaptada (Figura 1A) y adaptada (Figura 1B) al cloruro de benzalconio. Las variables se expresan en valor codificado.

Mientras que a los 11 días de almacenamiento no existen diferencias entre el efecto del CO_2 sobre las biopelículas de *L. monocytogenes* adaptadas y no adaptadas al BAC, después de 20 días de almacenamiento se pone de manifiesto una mayor resistencia al CO_2 en el caso de las adaptadas, con una bajada en el coeficiente que describe su efecto frente a *L. monocytogenes* desde 1.43 a 0.37 (Figura 1B) respecto a las biopelículas no adaptadas transferidas al mejillón (Figura 1A). Lo mismo ocurre en el caso de la nisina, cuyo coeficiente disminuye desde 0.86 en el caso de las biopelículas no adaptadas al BAC hasta 0.79 en las biopelículas adaptadas. Esto último, que se invierte a los 11 días de almacenamiento, coincide con resultados recientes, en los que se demostró una mayor resistencia a la nisina de biopelículas maduras formadas a partir de *L. monocytogenes* adaptadas al BAC respecto a las correspondientes formadas a partir de la cepa salvaje (Saá Ibusquiza et al. 2010). De este modo, después de 20 días, el modelo predice una reducción de 0.75 log y de 2.24 log en *L. monocytogenes* adaptada y no adaptada, respectivamente, una vez transferidas a mejillón cocido y envasado bajo condiciones de 90% de CO_2 y 210 UI/ml de nisina. Aunque no se encontraron estudios previos sobre resistencias cruzadas derivadas de la resistencia a desinfectantes, sí se ha demostrado una respuesta cruzada entre la tolerancia a ácido de *L. monocytogenes* y su mayor resistencia al CO_2 (Francis et al. 2007).

Sin embargo, aunque se detectan diferencias cuantitativas entre los efectos de las variables sobre las biopelículas adaptadas y no adaptadas al BAC, en ambos casos se demuestra un efecto inhibidor tanto del CO_2 como de la nisina, ambos descritos en bibliografía, y una interacción positiva entre ambas (CN) que refleja que a concentraciones excesivamente elevadas de ambas variables disminuye la respuesta. Esto último contrasta con estudios previos en donde se demostró un efecto sinérgico entre CO_2 y nisina sobre la supervivencia de *L. monocytogenes* (López-Mendoza et al. 2007, Nilsson et al. 1997, Nilsson et al 1999, Szabo et al. 1998). Y podría reflejar del aumento de la incompatibilidad entre antimicrobianos con acción a nivel de membrana derivada de la presencia de exopolisacáridos en las biopelículas transferidas al mejillón cocido. De hecho, Fang and Lin (1994) demuestran la inefectividad de la nisina en presencia de CO_2 frente a *P. fragi* productora de exopolisacáridos.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la adaptación de biopelículas de *L. monocytogenes* al BAC implica la adquisición de resistencia a aplicación de atmósferas ricas en CO_2 una vez transferidas al alimento, lo que supone un incremento del riesgo asociado a la supervivencia de este patógeno en plantas de procesado. Y que las modificaciones celulares derivadas de dicha adaptación pueden suponer o no un incremento de la resistencia a la nisina a lo largo del almacenamiento, lo cual pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios cinéticos que permitan identificar los cambios en los efectos de las variables durante el tiempo de almacenamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aase et al., 2000. Int. J. Food Microbiol. 62, 57. / Box et al., 1989. Ed. Reverté (Barcelona). / Cabo et al., 2001, J. Food Protec. 64 (12) 1943. / Cabo et al., 2003. J. Food Scien. 68 (3) 996. / Cabo et al., 2005. J Sci Food Agric 85, 1733./ Cabo et al., 2009. J. Food Prot. 73 (3), 515-523. / Fang and Lin, 1994 J. Food Prot. 54, 58. / EFSA, 2009. The EFSA Journal, 223, 1. / EFSA, 2010. The EFSA Journal, 8 (1) 1496. / Francis et al., 2007. J. Appl. Microbiol. 1364./ López-Mendoza et al., 2007. Int J. Food Scien. and Technol. 42, 562./ Nilsson et al., 1997. Int J Food Microbiol. 38 217. / Nilsson et al., 2000. Appl. Environ. Microb. 769. / Pastoriza et al., 1996. J Sci Food Agric 71, 541. / Pastoriza et al., 1996. J Sci Food Agric 72, 348. / Pastoriza et al., 1998. Food chemistry 61, 23. / Pastoriza et al., 2002. Eur Food Res Technol 215, 189–193. / Pastoriza et al., 2004. Eur Food Technol. 218, 415. / Porsby et al., 2008. Int. J. Food Microbiol. 122, 287. / Rodríguez and McLandsborough, 2007. J. Food Prot. 70 (3), 600. / Saá et al., 2009. J. Food Prot. 72, 1885-1890. / Saá Ibusquiza et al., 2010. F. microbiol. (accepted) / Szabo and Cahill, 1998. Int J Food Microbiol. 18, 43 (1-2), 21.

O156 EFECTIVIDAD DE VARIOS DESINFECTANTES INDUSTRIALES FRENTE A BIOPELÍCULAS Y CÉLULAS PLANCTÓNICAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Daniel Vázquez-Sánchez, Marta Cabo, Paula Saá, Sonia, Carrera y Juan Herrera

Dpto. de Tecnología de Alimentos, Instituto de Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). C/ Eduardo Cabello 6, 36208, Vigo. danielvs@iim.csic.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Staphylococcus aureus forma ocasionalmente biopelículas sobre superficies de plantas de procesado de alimentos (Herrera et al., 2007). Esto le confiere mayor resistencia a condiciones ambientales desfavorables, como la aplicación de biocidas (Costerton et al., 1999), provocando un mayor riesgo de contaminación alimentaria. Además, una inadecuada higienización presenta el riesgo de un aumento en la resistencia a desinfectantes (Langsrud et al., 2003).

Así pues, se planteó el objetivo de examinar la efectividad de tres biocidas de uso industrial (cloruro de benzalconio, ácido peracético e hipoclorito sódico) frente a biopelículas formadas por cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos marinos. Asimismo, también se incluyó el estudio de su efectividad frente a las células planctónicas equivalentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas. Todas las cepas se aislaron en nuestro laboratorio a partir de alimentos de origen marino (Vázquez-Sánchez et al., 2010).

Preparación del inóculo. Un cultivo líquido de cada cepa se ajustó a una Abs_{700} de 0.100 (~10^8 UFC/mL) en PBS e inmediatamente se diluyó 100 veces en TSB (~10^6 UFC/mL).

Formación de biopelículas. Se pipetearon 700 µL de inóculo en cada pocillo de una placa de microtitulación en el que se había introducido un cupón de acero inoxidable (AISI 304) de 10 mm^2. Las placas se incubaron a 25ºC.

Determinación de la concentración mínima para la eliminación de biopelículas (CMEB). Los cupones se extrajeron y se expusieron al desinfectante durante 30 min. El desinfectante se inactivó (Luppens et al, 2002). La CMEB fue la concentración de desinfectante más baja a la que no se detectaron bacterias viables en los cupones tras incubarlos en TSB (24 h, 37ºC).

Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM). 100 µL de cultivo líquido diluido 50 veces se expusieron a 100 µL de desinfectante durante 30 min. Tras inactivarlo con neutralizante, 300 µL de la mezcla se añadieron a 1,7 mL de TSB. La MBC fue la concentración de desinfectante más baja a la que no hubo crecimiento tras 24 h a 37ºC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectividad del Cloruro de Benzalconio (BAC). Las biopelículas formadas por las 26 cepas objeto de estudio después de 48 h a 25°C fueron más resistentes al BAC que las células planctónicas equivalentes (Figura 1). De estas cepas, las más resistentes (54, 1, 42, 71, 91, 72, 66, 38 y 10) se seleccionaron para su uso en estudios posteriores. Para ello también se seleccionaron otras 3 cepas (43, 13 y 16) atendiendo a su incidencia y al riesgo que suponía su presencia en los alimentos de los que se aislaron (Vázquez-Sánchez et al., 2010).

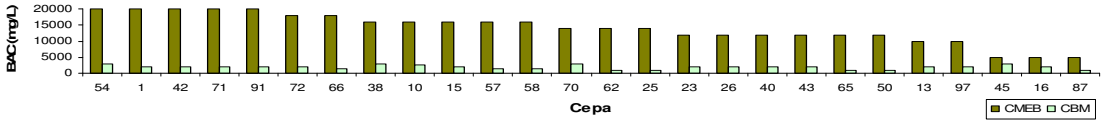


Figura 1. Efectividad del BAC frente a biopelículas (CMEB) formadas después de 48 h a 25°C y las células planctónicas equivalentes (CBM). La CMEB de cinco cepas (54, 1, 42, 71 y 91) excedió la máxima concentración de BAC usada en el ensayo (i.e. > 20.000 mg/L).

Efecto del tiempo de incubación. La resistencia al BAC de las biopelículas formadas por las 12 cepas seleccionadas aumentó progresivamente a lo largo del desarrollo de la biopelícula, llegando a superar 20.000 mg/L en el 50% de las cepas (6) al cabo de 7 días a 25°C (Figura 2). Por otro lado, no se observó correlación entre la CBM y la CMEB. Por tanto, las diferencias en la resistencia entre biopelículas y cultivos líquidos parecen deberse principalmente al distinto grado de estructuración de la matriz extracelular de la biopelícula que desarrolla cada cepa, más que a la resistencia propia de las células.

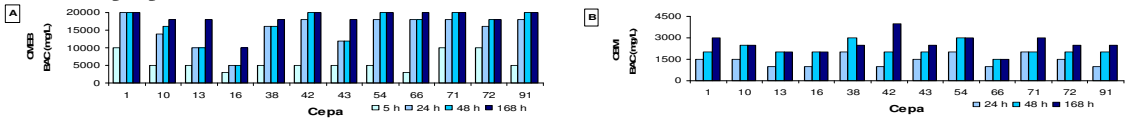


Figura 2. Evolución de la resistencia al BAC de biopelículas (A) y células planctónicas equivalentes (B) durante su incubación a 25°C.

Efecto de la temperatura de incubación. Como se observa en la Figura 3, las biopelículas formadas por las cepas seleccionadas mostraron, en la mayoría de los casos, una resistencia al BAC idéntica (5) o similar (3) a 12°C y a 25°C, y sólo en 4 cepas (10, 13, 54 y 71) fue considerablemente menor a 12°C. En cambio, los valores de CBM fueron mucho menores a 12°C en la mayor parte de las cepas (9). La formación de biopelículas parece pues reducir el efecto de la temperatura sobre la resistencia al BAC en la mayoría de las cepas examinadas.

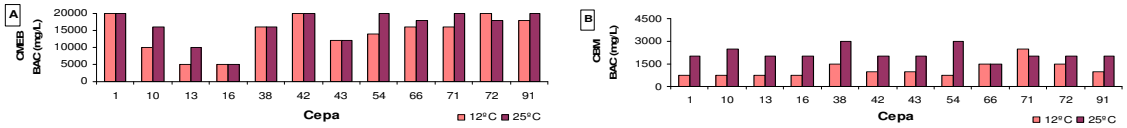


Figura 3. Resistencia al BAC de biopelículas (A) y células planctónicas equivalentes (B) después de 7 días de incubación a 12ºC y a 25ºC.

Efectividad del Ácido Peracético (PAA) y del Hipoclorito Sódico (NaClO). La resistencia de las biopelículas formadas por las cepas seleccionadas a estos dos desinfectantes fue también mucho mayor que la de las células planctónicas equivalentes (Figura 4), alcanzando valores de CMEB de hasta un máximo de 10 veces superiores a los de CBM en el caso del PAA y 21 veces en el caso del NaClO. Las biopelículas formadas por las cepas 1, 13, 42, 66 y 71 mostraron la mayor resistencia al PAA, mientras que las cepas 66, 71 y 72 generaron las biopelículas más resistentes al NaClO.

De los tres desinfectantes utilizados en este estudio, el PAA resultó ser el más efectivo, tanto frente a las biopelículas como a las células planctónicas, probablemente debido a su mayor reactividad y su capacidad de penetración dentro de la biopelícula (Saá et al., 2010).

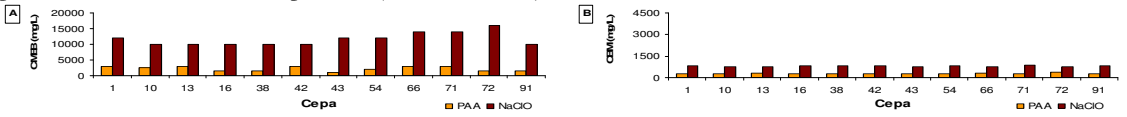


Figura 4. A-B. Resistencia al PAA y al NaClO de biopelículas (A) y células planctónicas (B) después de 48 h de incubación a 25°

CONCLUSIONES

La efectividad de los desinfectantes examinados mostró notable variabilidad frente a las biopelículas formadas por las distintas cepas, pero las biopelículas más resistentes a cada desinfectante no fueron siempre formadas por las mismas cepas. Para eliminar *S. aureus* y prevenir el desarrollo de resistencias a biocidas es preciso combinar dos o más desinfectantes, entre los que podrían estar nuevos compuestos más eficaces o más respetuosos con el medio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Costerton, JW; Steward, PS; Greenberg, EP, (1999). *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 284: 1318–1322.

Herrera, JJR; Cabo, ML; González, A; Pazos, I; Pastoriza, L, (2007). *Adhesion and detachment kinetics of several strains of* Staphylococcus aureus *under three different experimental conditions*. Food Microbiol, 24: 585–591.

Langsrud, S; Sidhu, MS; Heir, E; Holck, AL, (2003). *Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry*. Int Biodeterior Biodegr, 51: 283–290.

Luppens, S.B.I; Reij, M.W.; van der Heijden, R.W.L; Rombouts, FM; Abee, T. (2002). *Development of a standard test to asses the resistance of* Staphylococcus aureus *biofilm cells to disinfectants*. Appl Environ Microb, 68: 4194-4200.

Saá-Ibusquiza, P, López, M, Herrera, JR. (2010). *Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by* Listeria monocytogenes. Food Microbiology (aceptada)

Vázquez-Sánchez, D.; Cabo, M.L.; Saa, P; Rodríguez-Herrera, J.J. (2010). *Incidence and characterization of* Staphylococcus aureus *in seafoods marketed in Galicia (Spain)* (en preparación).

O164 OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN PRODUCTOS LÁCTEOS

Mª del Mar García, Félix Núñez, Elena Rodas, Josué Delgado y Elena Bermúdez

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad, s/n, 10003, Cáceres, fnunez@unex.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La incidencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos y el alto porcentaje de morbilidad y mortalidad que genera está llevando a las autoridades sanitarias a una mayor preocupación en el control sanitario de alimentos. Los procedimientos microbiológicos clásicos precisan un tiempo considerable para las determinaciones, así como la realización de pruebas de confirmación para la identificación del microorganismo que no siempre son totalmente definitivas. Una posible vía para el ahorro del tiempo en el análisis de microorganismos patógenos es la utilización de técnicas basadas en la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Estas técnicas permiten no sólo detectar sino cuantificar el número de microorganismos presentes.

El objetivo de este trabajo es la optimización de un protocolo de PCR en tiempo real (PCR-TR) que permita la detección y cuantificación de *L. monocytogenes*. Una vez puesto a punto, el método será utilizado para la investigación de dicho microorganismo en industrias elaboradoras de productos lácteos en la Comunidad de Extremadura, concretamente de quesos elaborados con leche de oveja y de cabra, muchos de ellos obtenidos a partir de leche sin higienizar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado cepas patrón de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp., así como de otros microorganismos patógenos que pueden encontrarse en quesos, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y de la American Type Culture Collection (ATCC) (tabla 1). Para verificar el crecimiento de las cepas se emplearon medios específicos para cada grupo microbiano.

Tabla 1. Microorganismos empleados en el ensayo.

Nº	Microorganismo	Código
1	*Listeria monocytogenes*	CECT 934
2	*L. monocytogenes*	CECT 4032
3	*L. monocytogenes*	ATCC 7644
4	*L. grayi*	CECT 931
5	*L. innocua*	CECT 910
6	*L. innocua*	CECT 5376
7	*L. ivanovii* sp. *ivanovii*	CECT 5368
8	*L. ivanovii* sp. *londonensis*	CECT 5375
9	*L. seeligeri*	CECT 5340
10	*L. welshimeri*	CECT 5380
11	*Salmonella* spp.	CECT 4374
12	*Staphylococcus aureus*	CECT 4465
13	*Escherichia coli*	CECT 4267

Para obtener ADN de alta pureza y calidad se siguió el método descrito por Lawson y col. (1989). La concentración de ADN fue cuantificada con el BioPhotometer de Eppendorf, así mismo se ha comprobado su pureza y calidad utilizando la proporción A_{260}/A_{280}. Una vez obtenido el ADN se ha optimizado un protocolo de PCR utilizando la metodología SYBR® Green, para ello se han usado los cebadores *hly*QF-*hly*QR descritos por Rodríguez-Lázaro y col. (2004) que amplifican una secuencia de 64 pb del gen *hly* de *L. monocytogenes*.

La PCR-TR se llevó a cabo en un aparato 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Los productos de PCR fueron analizados con el software 7500 Fast System SDS Software. Para optimizar el ensayo de PCR-TR se probaron diversas combinaciones de tiempos, temperaturas y número de ciclos. La curva de disociación fue calculada automáticamente por el equipo.

El ensayo de especificidad se realizó con las cepas descritas en la tabla 1. Para el ensayo de sensibilidad se utilizó un cultivo puro de *L. monocytogenes* CECT 934 crecido a 30º C durante 24 horas hasta obtener una concentración

final aproximada de 10^9 ufc/ml, a partir del cual se prepararon diluciones decimales de las que se extrajo directamente el ADN que se utilizó para llevar a cabo la PCR-TR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se probaron diferentes concentraciones de cebadores y de ADN hasta conseguir la optimización del protocolo. Las condiciones de amplificación elegidas fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95º C durante 10 minutos y 40 ciclos de 95º C durante 30 segundos y 60º C durante 1 minuto, realizándose posteriormente un calentamiento desde 60º C a 95º C para obtener la curva de disociación y verificar los productos de amplificación. El volumen final de mezcla de reacción fue de 25 µl conteniendo 12,5 µl de SYBR® Green, 500 ng de ADN y 5 µM de cada cebador.

Los resultados de especificidad muestran que las 3 cepas de *L. monocytogenes* presentaron valores de Ct inferiores a 24 (figura 1) con valores de Tm de 82,1º C ± 0,3º C. Las cepas de *Listeria* spp., así como de *Salmonella* spp., *S. aureus* y *E. coli* mostraron siempre valores de Ct superiores a 31. Esto demuestra que el método optimizado es específico para detectar *L. monocytogenes* frente a otros microorganismos patógenos e incluso frente a otras especies de su género. En cuanto a las pruebas de sensibilidad, se observó que el método propuesto permite detectar ADN hasta la dilución que corresponde aproximadamente a 1 ufc/ml (dilución 10^{-9}) (figura 2).

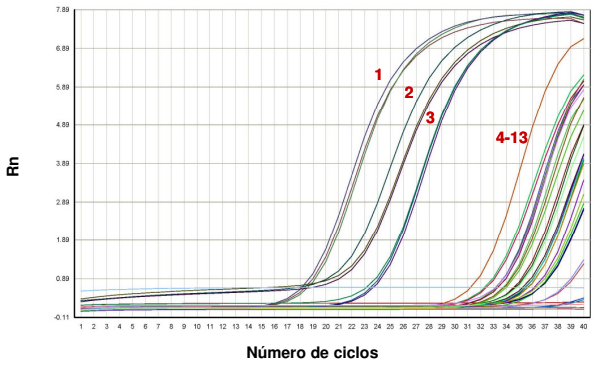


Figura 1. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo de especificidad del método de PCR-TR. Cepas de *Listeria monocytogenes* (curvas 1, 2, 3) y otras cepas de *Listeria* spp., *Salmonella* spp, *S. aureus* y *E. coli* (curvas 4-13)

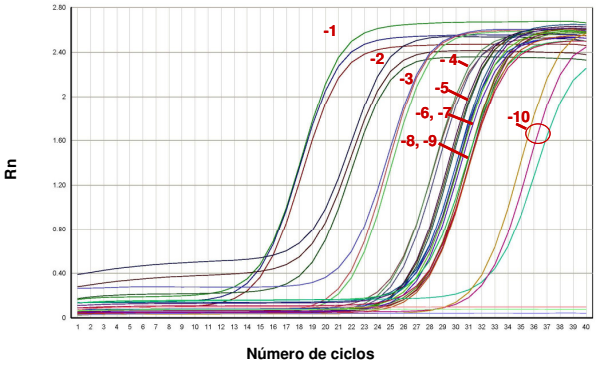


Figura 2. Sensibilidad del método de PCR-TR. (curvas -1 a -10) diluciones de *Listeria monocytogenes* CECT 934 desde 10^{-1} a 10^{-10} que se corresponden con recuentos de 10^8 – 0 ufc/ml.

CONCLUSIONES

El estudio muestra que con las condiciones seleccionadas se detecta de forma específica y sensible el ADN de *L. monocytogenes* frente al de otros patógenos potencialmente presentes en quesos, así como el de otras cepas de *Listeria* spp. pudiéndose proponer este método para su futura aplicación en productos lácteos y en muestras procedentes de industrias lácteas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lawson, P.A., Gharbia, S.E., Shah, H.N. y Clark, D.R. (1989) Recognition of *Fusobacterium nucleatum* subgroups Fn-1, Fn-2 and Fn-3 by ribosomal RNA gene restriction patterns. *FEMS Microbiol. Letters*, **65**: 41-46.

Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scortti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J.A., y Pla, M. (2004) Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* Targets and AmpliFluor Technology. *Appl. Environm. Microbiol.*, **70**: 1366-1377.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto PRI08A054 de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura y cofinanciado por el FEDER.

POSTERS

P73 IDENTIFICATION OF EMERGENT PATHOGENS (*LISTERIA* AND *YERSINIA*) IN FRESH VEGETABLES

Pilar Falomir[1], Pilar Garcés[1], José Miguel Soriano[2], Daniel Gozalbo[1] and Hortensia Rico[1]

[1] Departament of Microbiology and Ecology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain.

Hortensia.rico@uv.es

[2] Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The consumption of fresh vegetables has increased in recent years due to their nutritional value and also because of assumed beneficial health effects. However, it is well known that these produce, including ready-to-eat fourth range vegetables, serve as a vehicle of foodborne pathogens, as generally they are eaten without further processing. These products can carry natural non-pathogenic epiphytic microorganisms, although during growth, harvest and

further handling during stages of processing and operations for preparation, they can be contaminated with pathogens from human and animal sources. Contamination can arise as a consequence of treating soil with organic fertilisers, such as sewage sludge and manure, and from the irrigation water, as well as from the ability of pathogens to persist and proliferate in vegetables [1-5]. In addition, the emerging technologies in food production explain how new pathogens can establish themselves in the food chain and compromise food safety [6]. For this reason, the hygienic quality of these products must be controlled to minimize the microbial population and therefore the foodborne disease risk, and disinfection is one of the methods used to sanitize vegetables.
The objective of this study was to determine the microbiological quality of fresh vegetables that are eaten raw, particulaly we focussed in the detection of species belonging to the genus *Listeria* and *Yersinia*, which include human pathogens widely distributed in nature, such as *L. monocytogenes*, and the enteropathogenic species *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. These species are able to growth a low temperatures, causing infections through contaminated refrigerated food that can be considered as emergent or resurgent foodborne infections [6-8].

MATERIAL AND METHODS

Eight different vegetables were studied: lettuce "iceberg", swiss chard, spinach, carrot, parsley, tomato "cherry", pepper and green bean. Ten samples of each fresh product were analyzed, purchased from supermarkets (ready-to-eat fourth range vegetables, n: 5) and greeengrocers's shops (n:5) of Valencia city (Spain). In this latter case, samples were processed directly or after whasing with drinking water. Bacterial species were isolated and identified by standard microbiologial methods. After homogenization, samples were enriched in *Yersinia* broth (24 h, 28ºC) or *Listeria* Fraser broth (24-48h, 37ºC) and colonies isolated either on *Yersinia* selective agar (24h 28ºC) or *Listeria* Palcam agar (24-48h, 37ºC). Colonies were identified by using commercial microkits: BBL crystal and API *Listeria* strip. As this methods allows the isolation of bacterial species other than *Listeria* and *Yersinia*, all colonies isolated were identified in our study.

RESULTS AND DISCUSSION

Results showed the presence of bacterial contamination in 43% of the total samples analyzed. The number of bacterial species isolated from contaminated samples ranged fom 1 to 5 in the case of fourth range produce and from 1 to 8 in the rest of vegetables. Fourth range vegetables showed a higher proportion of uncontaminated (negative) samples (67%) than the rest (45%). Parsley and pepper samples showed the lower frequency of contamination (80% of samples were negative), lettuce "iceberg" showed the highest frequency of contamination (only 27% of samples were free of the microorganisms), and the other samples showed intermediate levels: spinach and carrot (47% negative), swiss chard (53% negative), tomato "cherry" (60% negative), and green bean (67% negative). Comparison of samples processed directly or after whasing showed no significant differences in the results obtained, indicating that most microorganisms are sufficiently attached to the surface of vegetables to be removed by the washing treatment, and that distribution of bacterial species on the surface is not homogeneous. Nine *Listeria* isolates were identified, although none was *L. monocytogenes*: *L. ivanovii* (6 isolates), *L. grayi* (2) and *L. welshimeri* (1). Three isolates were identified as *Yersinia*: *Y. pseudotuberculosis* (2) and *Yersinia* spp. (1). Most of the isolates were identified as members of the *Enterobacteriaceae* family: *Klebsiella oxytoca* (3), *Klebsiella pneumoniae* (5), *Pantoea agglomerans* (5), *Rhanella aquatillis* (5*), Escherichia vulneris* (3), *Escherichia coli* (1), *Aeromonas hydrophila* (2), Enterobacter *sakazaki* (3), *Enterobacter aerogenes* (1), *Enterobacter cloacae* (3), *Entrerobacter gergoviae* (1), *Kluyvera ascorbata* (3), *Kluyvera cryocrescens* (1), *Shigella spp.* (2), and *Serratia mercescens* (1). Also other Gram-negative species were isolated: *Pseudomonas fluorescens* (3), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Acinetobacter lwofii* (3), and *Vibrio metschikovii* (2). The isolated species may include natural non-pathogenic epiphytic microorganisms as well as contaminant bacterial species from human and animal sources, than can persist and proliferate in vegetables, and cause infection in humans. It should be stressed that ready-to-eat four range vegetables were also significantly contaminated, indicating that their hygienic treatment was not sufficient to ensure their microbial quality.

CONCLUSIONS

The presence of bacterial pathogens as well as opportunistic pathogens in fresh vegetables that are eaten raw, and particularly in ready-to-eat fourth range products which are eaten without further processing, may represent a risk factor for the health of consumers. This risk increases in debilitated or immunocompromised individuals, a population that has significantly increased during the last decades due to medical advances. In addition, these products may also represent an additional source of bacterial food contamination during handling at home. Therefore microbial contamination of these products can be considered as a food safety concern, specially in particular populations subsets (as the elderly, patients receiving immunosuppressive agents, etc.), and for this reason, the hygienic quality of fresh vegetables should be improved and controlled to minimize the foodborne disease risk.

REFERENCES

[1] Brandl MT. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*. 2006; 44:367-392.
[2] Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72:3284-3290.
[3] Tyler HL, Triplett EW. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2008; 46:53-63.

[4] Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 104:613-626.
[5] Leifert C, Ball K, Volakakis N, Cooper JM. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetables crops in organic and "low imput" production systems: a HACCP-based approach. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 105:931-950.
[6] Skovgaard N. New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 2007; 15:217-224.
[7] Palonen E, Lindström M, Koekeala H. Adaptation of enteropathogenic *Yersinia* to low growth temperature. *Critical Reviews in Microbiology*. 2010; 36:54-67.
[8] Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010; 16:16-23.

P74 ISOLATION AND CLINICAL RESISTANCES TO CHEMOTERAPEUTIC AGENTS OF COLIFORMS FROM READY-TO-EAT FOUR RANGE VEGETABLES AND SALADS

Pilar Falomir[1], Carlos Sebastiá[2], Daniel Gozalbo[1] and Hortensia Rico[1]
[1]Departament of Microbiology and Ecology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain.
m.pilar.falomir@uv.es
[2]Laboratorio de Análisis Clínicos, Pasaje Dr. Bartual Moret nº 1, 46010 Valencia, Spain

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

During the last years, the consumption of fresh vegetables has been increasing as consumers strive to eat healthy diets and the availability of these products, up till recently considered as seasonal, has been extended over the whole year. In addition, the consumption of "four range" vegetables, a term that refers to packaged, cleaned, possibly chopped and mixed vegetables ready to be seasoned and eaten, have gained popularity among consumers. Fresh vegetables normally carry natural non-pathogenic epiphytic microorganisms, but during growth, harvest, transportation and further handling the produce can be contaminated with pathogens from animal and human sources [1-5]. As most of these products are eating without further processing, their microbial content may represent a risk factor for the consumer's health and therefore a food safety problem. Since the early 1990s, awareness of the potential of fresh produce to cause foodborne disease has increased, and reported outbreaks associated with consumption of fresh vegetables have grown steadily. Most of the reported outbreaks of gastrointestinal disease linked to the fresh produce have been associated with bacterial contamination, particularly with members of the *Enterobacteriaceae* family [1,3,4]. In addition, the presence of antibiotic resistances both in normal flora and pathogenic microorganisms in fresh vegetables may contribute to horizontal spreading of resistances between different isolates, species and genera. Bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as vegetal surfaces or human colon [6-10]. Therefore, the presence of antibiotic-resistant bacteria in fresh vegetables constitutes an additional concern for consumer safety. In this work we have determined the antibiotic susceptibilities of coliform bacteria isolated from fresh vegetables (including ready-to-eat four range products) used as ingredient for salads, as well from salads served in dinning halls of two Valencia schools a nursery (preschool) and a primary school, in order to assess the microbiological quality of these products and the potential risk for consumer's health.

MATERIAL AND METHODS

Fresh vegetables (n: 8) from the kitchen of a nursery (lettuce, ruccola/arugula, lamb's lettuce, cucumber and tomato) and a primary school (tomato and lettuce) in Valencia city were analyzed; some of these vegetables were from four range products (lettuce, ruccola/arugula and lamb's lettuce). Ready to eat salads (n: 16) served in the dinning halls of the nursery (preschool) and the primary school were also analyzed. Selected samples of each vegetable (2-5 g) were added with nine volumes of Tryptone water (MicroKit, Valdemorillo, Spain) and homogenised in a Classic Masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain). Samples from salads (4-8 g), containing all fresh vegetable products used as ingredients for their preparation, were processed identically. The most probable number of coliforms (MPN) was determined according to standard microbiological methods. Positive cultures in Brilliant Green Bile 2% Lactose Broth (BGBLB) were plated on selective media (EMB Levine agar) to isolate single colonies, which were identified by biochemical reactions using the BBL Crystal E/NF identification system (Becton Dickinson, Loveton Circle Spark, MA, USA).
Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion [11] according to standard microbiological procedures. Disks of eleven antibacterial chemotherapeutic agents (most of them antibiotics) were used in this study (Liofilchem, Roseto, Italy): amoxicillin/clavulanic acid (Augmentine) 30 μg, ampicillin 10 μg, cefotaxime 30 μg, ceftazidime 30 μg, ciprofloxacin 5 μg, chloramphenicol 30μg, co-trimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) 25 μg, streptomycin 10 μg, gentamicin 10 μg, nitrofurantoine 300 μg, and tetracycline 30 μg.

RESULTS AND DISCUSSION

The study included both the served salads and the fresh vegetables used as ingredients for their preparation. Some of these ingredients were from four range vegetable products (lettuce, ruccola/arugula and lamb's lettuce). Results were similar in salads form both the nursery and the primary school dinning halls: bacterial presence was detected in all samples (100%, n:16). Accordingly, bacterial contamination was also detected in most of the individual vegetables used as ingredients for the salads (an average of 57%, 32 out of 56). The species more frequently isolated were *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella oxytoca*, although other species were also detected (*Enterobacter*

cancerogenus, *Citrobacter freundii*, *Kluyvera ascorbata*, *Enterobacter sakazakii*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Serratia marcescens, Enterobacter cancerogenous*, and others), including four *Escherichia coli* isolates that were not further characterized. In some cases (3 out of 16 salad samples; 4 out 16 lettuce samples; 3 out 8 ruccola/arugula samples) the NMP was over 2400 coliforms/g. The most contaminated samples were lettuce iceberg and ruccola, whereas tomato, lamb's lettuce and cucumber were much less contaminated. Interestingly, some of these samples were from four range vegetables indicating that during processing to prepare four range products bacterial contamination is not efficiently eliminated.

We determined the presence of resistances to eleven common antibacterial chemotherapeutic agents in all bacterial strains (n: 61) isolated. Most isolates were resistant to ampicillin (40 isolates), and to amoxicillin/clavulanic acid (50). Resistances to other agents were rare: tetracycline (3 resistant isolates), nitrofurantoine (10 resistant isolates), streptomycin (2 resistant isolates), cefotaxime (2 resistant isolates), chloramphenicol (one resistant isolate) and ceftazidime (one resistant isolate). No resistances were found to gentamicin, co-trimoxazol and ciprofloxacin. Only five bacterial isolates (two *E. cloacae*, one *E. gergoviae*, one *E. coli*, and one *K. oxytoca*) were susceptible to all antibiotics tested, whereas seven isolates (six *E. cloacae*, and one *F. oryzihabitans*) were resistant to three antibiotics, another three isolates (*Citrobacter freundii, K. penumoniae,* and *F. oryzihabitans*) showed multiresistance to four agents, and one isolate (*E. cloacae*) was resistant to five antibiotics.

CONCLUSIONS

The presence of opportunistic bacterial pathogens in ready-to-eat vegetables (fourth range products and seasoned salads) which are eaten without further processing, may represent a risk factor for the health of consumers. This risk increases in debilitated or immunocompromised individuals, a population that has significantly increased during the last decades due to medical advances. In addition, antibiotic resistances can be horizontally disseminated, after ingestion by the consumer, to other gut commensal or pathogenic bacteria. On the other hand, these products may represent an additional source of bacterial food contamination during handling at home. Therefore microbial contamination of these products can be considered as a food safety concern, and for this reason, the hygienic quality of fresh vegetables should be improved and controlled to minimize the foodborne disease risk.

REFERENCES

[1] Brandl MT. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*. 2006; 44:367-392.
[2] Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72:3284-3290.
[3] Tyler HL, Triplett EW. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2008; 46:53-63.
[4] Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 104:613-626.
[5] Leifert C, Ball K, Volakakis N Cooper JM. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetables crops in organic and "low imput" production systems: a HACCP-based approach. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 105:931-950.
[6] Heuer H, Smalla K. Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety*. 2007; 6:3-13.
[7] Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2004; 48:522-531.
[8] Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2008; 6:733-750.
[9] Chee-Sandorf LC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following lad application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*. 2009; 38:1086-10108.
[10] Venglovsky J, Sasakova N, Placha I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*. 2009; 100:5386-5391.
[11] Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966; 445:493-496.

P75 INCIDENCIA DE RESISTENCIA A BIOCIDAS EN ALIMENTOS ECOLOGICOS

Miguel Ángel Fernández Fuentes[1], Elena Ortega[1], Hikmate Abriouel[1] y Antonio Gálvez[1]
[1]Area de Microbiología. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén. Paraje Las Lagunillas s/n. 23071. Jaén. eortega@ujaen.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El empleo intensivo de biocidas en la industria alimentaria, en ambientes clínicos y en el ámbito doméstico, genera múltiples oportunidades para la aparición de cepas adaptadas a diferentes tipos de agentes antimicrobianos. El tratamiento repetido con biocidas en la industria alimentaria puede seleccionar la implantación de cepas tolerantes a los mismos así como a otros tratamientos físicos y químicos, como se ha demostrado para *Listeria monocytogenes* o *Escherichia coli* (Taormina y Beuchat, 2001; Holah et al., 2002). Más preocupante aún es la aparición de cepas con una resistencia incrementada no solo a los propios biocidas, sino también a antibióticos de uso clínico como ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina y otros (Nikaido, 1998; Karatzas et al., 2007; Randall et al., 2004, 2007), como consecuencia del empleo de mecanismos comunes de resistencia frente a ambos tipos de compuestos (Smith et al., 2008). Todo ello genera la necesidad de analizar las consecuencias del uso indiscriminado de biocidas sobre el incremento de resistencias múltiples a agentes antimicrobianos de uso común en clínica. Si bien aún se desconoce qué tipo de alimentos pueden representar un mayor riesgo, los alimentos ecológicos

presentan un especial interés no sólo por su valor añadido sino también por sus diferencias en los métodos de producción con el resto de alimentos.
El objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia de resistencia a biocidas entre cepas de microorganismos aislados a partir de alimentos ecológicos. Se han considerado diferentes tipos de alimentos, así como biocidas con diferentes mecanismos de acción y pertenecientes a distintos grupos químicos.

MATERIAL Y MÉTODOS
Se aislaron un total de 378 cepas a partir de alimentos obtenidos por métodos exclusivamente ecológicos, en 5 medios selectivos, procediendo posteriormente a su identificación y determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) para un total de 7 biocidas pertenecientes a los distintos grupos químicos existentes (sales de amonio cuaternario, bisfenoles, guaninas, así como cloruro de hexadecil-piridinio). La determinación de las MICs se llevó a cabo mediante la incubación a 37ºC durante 24 horas de diluciones seriadas de los biocidas en medio TSB inoculado con 10^5 UFC/ml de un cultivo estacionario de las cepas procedentes de cultivos ecológicos. La MIC se consideró la menor concentración de biocida capaz de inhibir el crecimiento de dichas cepas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Tal como se muestra en la tabla 1, la mayor parte de las cepas procedentes de alimentos ecológicos analizadas en este estudio presentaron una elevada sensibilidad a todos los compuestos, con concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) inferiores a 0.01 mg/l, excepto para la clorhexidina, en que el 58.7% de las cepas estudiadas presentaron una MIC de 0.1mg/l, encontrándose también algunos aislados con MICs de 1, 2 y hasta 5 mg/l para este biocida. También se obtuvieron cepas con una mayor resistencia a cetrimida, cloruro de hexadecil-piridinio y hexachlorofeno, con más de un 20% de las cepas presentando una MIC de 0.1 mg/l para estos compuestos. La mayor sensibilidad entre los microorganismos analizados se detectó para los biocidas cloruro de benzalconio, cloruro de didecildimetilamonio y triclosan, frente a los cuales más del 90% de las cepas analizadas presentaron una MIC inferior a 0.01 mg/l.

Tabla 1. Resistencia de los microorganismos procedentes de alimentos ecológicos frente a los biocidas cetrimida, clorhexidina, cloruro de benzalconio (CB), cloruro de didecildimetilamonio (AB), cloruro de hexadecil-piridinio (HDPC), hexachlorofeno (CF) y triclosan.

Porcentaje de aislados con MIC (mg/l)					
BIOCIDA	< 0.01	0.1	1	2	5
Cetrimida	76.7	23.0	0.3	0	0
Clorhexidina	34.1	58.7	5.3	1.1	0.8
Cloruro de benzalconio	97.9	2.1	0	0	0
Cloruro de didecildimetilamonio	94.4	5.6	0	0	0
Cloruro de hexadecil-piridinio	68.8	28.0	3.2	0	0
Hexachlorofeno	79.6	20.4	0	0	0
Triclosan	93.5	5.5	0.5	0.5	0

CONCLUSIONES
La mayor proporción de las cepas aisladas de alimentos ecológicos presentan una elevada sensibilidad a los biocidas ensayados, especialmente a cloruro de benzalconio, cloruro de didecildimetilamonio y triclosan. Por el contrario, para la clorhexidina, el 58.7% de las cepas estudiadas presentaron una MIC algo superior, de 0.1mg/l, encontrándose también algunos aislados con MICs de 1, 2 y hasta 5 mg/l para este biocida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Holah, J.T., Taylor, J.H., Dawson, D.J., Hall, K.E. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 92. 111S-120S.
Karatzas, K., Webber, M.A., Jorgensen, F., Woodward, M.J., Piddock, L.J.V., Hunphrey, T.J. 2007. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. J. Antimicrob. Chemother. 60: 947-955.
Nikaido, H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr. Opin. Microbiol. 1: 516-523.
Randall, L.P., Cooles, S.W., Coldham, N.G., Penuela, E.G., Mott, A.C., Woodward, M.J., Piddock, L.J.V., Webber, M.A. 2007. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. J. Antimicrob. Chemother. 60: 1273-1280.
Randall, L.P., Cooles, S.W., Piddock, L.J.V., Woodward, M.J. 2004. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. J. Antimicrob. Chemother. 54: 621-627.
Smith, K.; Gemmell, C.G., Hunter, I.S. 2008. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. J. Antimicrob. Chemother. 61: 78-84.
Taormina, P.J., Beuchat, L.R. 2001. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2555-2563.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía).

P86 MICOFLORA DE UVAS DE LAS VARIEDADES MENCIA Y PRIETO PICUDO (VINOS DEL BIERZO Y TIERRAS DE LEÓN, LEÓN).

Medina Pérez, N., López Díaz, T.M., García López, M. L.
Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León,
Campus de Vegazana, s/n, 24071-León.
teresa.lopez@unileon.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Aislar e identificar la micoflora presente en las variedades de uva *mencía* y *prieto picudo*, con las cuales se elaboran los vinos de las denominaciones de origen del Bierzo y Tierras de León, respectivamente, con especial referencia a los *Aspergillus* negros, como principales hongos productores de ocratoxina A en vino, mediante técnicas morfológicas y de biología molecular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron 120 muestras de uva *mencía* y *prieto picudo* procedentes de 12 viñedos de las denominaciones de origen del Bierzo y Tierras de León durante la vendimia del 2009. Se siguió un muestreo de campo en diagonal (Serra y col., 2007), recogiéndose un total de 10 racimos de uvas de cada parcela. De cada racimo se extrajeron 50 uvas con las que se hizo mosto que fue analizado mediante la técnica de siembra en superficie previa dilución empleando placas de Malt Extract Agar (MEA, Oxoid) como medio de recuento y aislamiento, con incubación a 25ºC durante 5 días. Posteriormente se realizó el recuento fúngico y la identificación de las cepas aisladas basada en características macro y microscópicas tras una incubación a 5, 25 y 37ºC en los medios específicos: MEA, CYA y G25N (Pitt y Hocking, 1997).

Las cepas de *Aspergillus* negros aisladas fueron identificadas por un método basado en ITSRFLP, mediante visualización de los resultados en un gel de agarosa al 3% (Martínez-Culebras y Ramón, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han investigado 326 cepas, identificándose como pertenecientes a los siguientes géneros: *Cladosporium* (88), *Aureobasidium* (86), *Fusarium* (80), *Penicillium* (51) y *Aspergillus* (12), siendo 9 cepas no identificadas. Los recuentos de *Cladosporium* y *Fusarium* se encontraron en el orden de 2x106 ufc/ml, mientras que para el resto de los géneros se hallaron en el orden de 4x105 ufc/ml. Tras realizar una identificación de las 12 cepas de *Aspergillus* por ITS-RFLP, se comprobó que 10 de ellas daban patrones similares de restricción que *Aspergillus niger*, mientras que las dos restantes correspondían a *Aspergillus turingensis* y *Aspergillus ochraceus*.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que los géneros mayoritarios encontrados en las uvas analizadas son *Cladosporium* y *Fusarium*, con niveles de recuento más elevados y mayor número de cepas identificadas, aunque los géneros de mayor interés por su capacidad micotoxigénica son *Penicilllium* y *Aspergillus*, sobre todo los *Aspergillus* negros productores de ocratoxina A. La escasez de *Aspergillus* negros hallados respecto a estudios realizados en uvas de otras variedades tanto españolas, como extranjeras, puede ser atribuible a la climatología del año agrícola 2009, desfavorable para el crecimiento fúngico. Nuestros estudios proseguirán con nuevas tomas de muestras durante el presente año. Por otro lado, el uso de la digestión por enzimas de restricción de las regiones ITS es un método de análisis rápido y fiable para la detección de *Aspergillus* sección *Nigri* en uvas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Martínez-Culebras P.V. y Ramón D. 2007. " An ITS-RFLP method to identify Black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine", *International Journal of Food Microbiology* 113, 147-153.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. 1997. "Fungi and food spoilage". 2ª ed. Blackie Academic and Professional, Cambridge, Reino Unido.

Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z. y Venâncio A. 2003, " Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes". *International Journal of Food Microbiology* 88, 63-68.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por la Junta de Castilla y León (GR155 y contrato de formación de la primera autora). Los autores agradecen a todas las bodegas que han participado en la toma de muestras. Asimismo, agradecemos al Dr. Pedro Martínez Culebras (IATA) por su inestimable colaboración en la realización de las técnicas biomoleculares.

P89 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FÍSICO-QUÍMICA DE PRODUCTOS CÁRNICOS ELABORADOS EN CASTILLA Y LEÓN

Rosa Ana Menéndez[1], J. Javier Sanz[1], Eugenia Rendueles[1]* y Mª del Camino García[1]**

[1] ICTAL, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de León, Universidad de León. C/ La serna, 58, 24007, León. rameng@unileon.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La industria alimentaria es un sector clave de la economía en Castilla y León (Gordo, 2003) dentro del cual las empresas cárnicas representan el grupo más importante. El objetivo principal del presente trabajo es hacer una evaluación general de la calidad microbiológica y de algunos parámetros físico-químicos de embutidos crudo-curados y salazones cárnicas producidos y comercializados en Castilla y León.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 100 muestras de distintos productos cárnicos. Estas se corresponden con 25 muestras de chorizo, 18 de salchichón, 18 de lomo, 16 de cecina, 19 de jamón y 4 de otros, repartidas a su vez entre distintas presentaciones comerciales como loncheados en tienda, envasado a vacío o en atmósferas modificadas, o piezas enteras. Los métodos de análisis utilizados están recogidos en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Medios de cultivo, condiciones de incubación y tipos de siembra, y referencias bibliográficas utilizadas para la cuantificación de cada uno de los grupos microbianos estudiados.

Grupo microbiano	Medio de cultivo	Condiciones	Referencias
FAMV[1]	PCA[2]	P[7] 30ºC/72oras,	Jay, 2002
Psicrotrofos aerobios	PCA	P 7ºC/10 días	APHA, 1992
Staphylococcus aureus	Baird Parker	S[8] 37ºC/48 horas	Lancette&Bennett, 2001
Enterobacterias	VRBGA[3]	P 37ºC/24 horas	Mossel&Moreno, 2003
Escherichia coli	CSM[4]	P 37ºC/24 horas	Mossel&Moreno, 2003
Esporulados aerobios	RCM[5]	P 30ºC/48 horas	APHA, 1992
Esporulados anaerobios	RCM	P 30ºC/48 horas AN[9]	APHA, 1992
Clostridium botulinum	PCR (Campbell, 1993) sobre caldo TPGY[6], 30ºC/5 días AN. FDA 2001		
Salmonella spp.	UNE-EN-ISO 6579:2002		
Listeria monocytogenes	UNE –EN-ISO 11290-1 y UNE –EN-ISO 11290-2		

[1] Flora Aerobia Mesófila Viable; [2] Agar para Recuento en Placa; [3] Agar Glucosa Cristal Violeta Rojo Neutro y Sales Biliares; [4] Medios Selectivo Coliformes; [5] Agar Reforzado para Clostridios; [6] Tripticasa Peptona Glucosa Extracto de levadura; [7] Siembra en profundidad; [8]Siembra en superficie; [9]Anaerobiosis.

Tabla 2. Métodos de análisis físicos-químicos utilizados.

Análisis físico-químico	Métodos
pH	pH-metro de punción CRISON, PH 25
Actividad de agua	LabMaster-aw NOVASINA
Sal	Determinación por el método Carpentier-Vohlard
Nitritos y nitratos	Normas ISO/DIS 2918 e ISO/DIS 3091

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes tablas se recogen los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos y físico-químicos realizados.

Tabla 3. Resultados de los análisis físico-químicos.

	pH		Aw		NaCl		Nitratos		Nitritos	
	M[1]	DE[2]	M	DE	M	DE	M	DE	M	DE
Cecina	5,83	0,28	0,90	0,03	1,88	0,93	1,09	1,14	0,43	0,16
Chorizo	5,12	0,28	0,86	0,05	1,51	0,36	2,03	2,93	0,42	0,16
Jamón	5,71	0,24	0,89	0,03	1,64	0,79	1,36	0,90	0,46	0,13
Lomo	5,72	0,37	0,90	0,03	1,33	0,46	2,35	2,75	0,52	0,09
Salchichón	5,13	0,43	0,85	0,05	1,84	0,81	1,89	2,35	0,39	0,18

[1] Media Aritmética, [2] Desviación Estandar

Tabla 4.Resultados de los análisis microbiológicos.

Grupos microbianos	Chorizo		Jamón		Cecina		Salchichón		Lomo	
	M[1]	ND[2]	M	ND	M	ND	M	ND	M	ND
FAMV[3]	8,74		4,47		6,70		8,24		7,61	
FS[4]	8,38		4,58		6,23		8,19		7,35	
ENT[5]	2,35	68%	1,56	24,2%	1,41	68,8%	1,94	72,2%	1,95	83,3%
COLI[6]	2,84	76%	2,28	94,7%	1,85	81,2%	1,92	66,7%	0,70	94,4%
E. coli[7]	2,15	84%		100%		100%	1,45	83,3%		100%
STAPH[8]	4,93	68%	4,05	57,9%	3,87	81,2%	4,42	66,6%	4,57	27,8%
EA[9]	5.07		3,55	26,3%	2,47	50%	1,52	38,9%	4,95	38.9%
EANA[10]	3,49	32%	2,78	94,7%	2	81,2%		100%	3,24	55,6%
List	1		1		1		2		A[11]	
Salmonella	2		A		A		2		A	
C. botulinum	A		A		A		A		A	

Los datos se expresan como la media de los $\log_{10}$ de las ufc/g de muestra. [1] Media de los resultados obtenidos donde hay recuento. [2] Porcentaje de muestras donde no se detecta la presencia del microorganismo. [3] Flora Aerobia Mesófila Viable, [4] Flora Psicrotrofa, [5] Enterobacterias, [6] Coliformes totales, [7] *Escherichia coli*, [8] *Staphylococcus aureus*, [9] Esporulados Aerobios, [10] Esporulados Anaerobios. Para *Listeria monocytogenes* (*List*), *Salmonella* spp. y *C. botuli*num los datos vienen recogidos como el número de muestras donde se detectó la presencia del microorganismo o como [11] ausencia.

Los resultados encontrados en los análisis físico-químicos son semejantes a los recogidos en otros estudios (Molinero et al., 2004) y cumplen con la legislación vigente (RD 1118/2007) en cuanto al contenido en nitratos y nitritos. Estos últimos, junto con los otros factores limitantes como pH, concentración de sal y aw, contribuyen a crear unas buenas condiciones disgenésicas (Sebranck and Bacus, 2007).

Los recuentos conseguidos en flora aerobia mesófila viable y psicrotrofa suponen unos niveles aceptables para cada tipo de producto, con valores similares a los señalados por otros autores (Sanz, 2000). En lo que se refiere a enterobacterias y coliformes también se han obtenido recuentos relativamente bajos y parecidos a los recogidos en la bibliografía existente (Rubio, 2005) que indican, salvo excepciones, una adecuada manipulación higiénica de los productos analizados. Por otro lado, la presencia de *Staphylococcus aureus* en niveles por debajo de las 10^5 ufc/g hace que se consideren productos seguros ya que se ha observado que en la mayoría de los brotes los niveles de contaminación se sitúan entre 10^5 y 10^8 ufc/g (Holmberg, 1984). Relativo a los esporulados, en productos como los embutidos la presencia de especias justifica los elevados recuentos por tratarse de ingredientes muy contaminados (Sagoo et al., 2009). Respecto a *Listeria monocytogenes* su presencia fue detectada sólo en el 5% de las muestras analizadas pero aún así se cumpliría con el criterio de seguridad alimentaria del Reglamento 2073/2005

CE que exige recuentos menores de 100 ufc/g. Sin embargo, la presencia de *Salmonella* spp. en 4 de los productos estudiados además de suponer un peligro, no cumple los criterios del citado Reglamento que exige su ausencia en 25 g. *Clostridium botulinum* no fue detectado mediante la técnica de PCR en ninguna de las muestras analizadas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que la calidad microbiológica y físico-química de los productos analizados es buena, por lo que se concluye que la calidad de los productos cárnicos elaborados en Castilla y León responde a la normativa vigente siendo estos, en general, seguros desde el punto de vista microbiológico y físico-químico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CE. 2005. Comisión Regulation (CE) Nº 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiolgical criteria for foodstuffs. *Oficial Journal of the European Union* L338, 1-26.

Gordo, P. 2003. Informe sobre la situación económica de la Industria Alimentaria en Castilla y León. Dirección General de Industrialización y Modernización Agraria. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León.

Holmberg, S.D. and Blake, P.A. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA* 251:487-489.

Molinero, C. et al. 2004. Influence of anatomical origin of raw meat on the sensory and chemical characteristics of drief beef "Cecina de León". *50th International Congress of Meat Science and Technology*, Helsinki, Finland.

Rubio, B. et al. 2005. Estudio de la vida útil de la Cecina de León envasada con distintas atmósferas modificadas. Ed. Instituto Tecnológico Agrario.

Sagoo, S.K. et al. 2009. Assessment of the microbiogical safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology* 26, 39-43.

Sanz, J.J. 2000. Estudio de las características microbiológicas y físico-químicas del chorizo de Cantimpalos en relación con su proceso de elaboración y maduración. Tesis Doctoral.

Sebranck, J.G. and Bacus, J.N. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues. *Meat Science*, **77**, 136-147.

P94 ENTEROTOXINA ESTAFILOCOCICA EN QUESO CURADO ELABORADO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAIS VASCO. 2002-2009

Dolores Coll Jordá; Carmen Oria Eraso*; Mª Victoria Bravo Vazquez*; Begoña de Pablo Busto*; Belen Moreno Montoya* e Inmaculada Garcia Robles**

**Departamento de Sanidad y Consumo, Gobierno Vasco. C/ Donostia San Sebastián, 1 01010 Vitoria-Gasteiz (Alava)*
dcoll@ej-gv.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La leche y productos lácteos son los alimentos principalmente implicados en los brotes de toxiinfección alimentaria por enterotoxina estafilocócica.

Concretamente en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), durante el periodo 2002-2009, fueron declarados 7 brotes asociados con el consumo de queso curado elaborado a partir de leche cruda de oveja, en los cuales pudo confirmarse la presencia de enterotoxina estafilocócica

Las infecciones estafilocócicas de la glándula mamaria del ganado ovino (mastitis) representan una reserva muy importante de cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus*. En las etapas posteriores a la recepción de la leche contaminada, las condiciones de pH y temperatura necesarias para la elaboración de este tipo de queso, serán apropiadas para el crecimiento de dichos gérmenes y producción de enterotoxina.

El objetivo es conocer la situación de los quesos elaborados con leche cruda en relación a la presencia de enterotoxina estafilocócica y tomar las medidas correctoras en caso necesario

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han recopilado los resultados analíticos de todas las muestras de queso curado recogidas directamente en establecimientos de elaboración, en el periodo 2002-2009.

Para un mayor conocimiento de la situación higiénico-sanitaria del sector de elaboración de queso curado, en el marco del control oficial de establecimientos alimentarios realizado a lo largo del periodo citado, además de los parámetros incluidos en la normativa vigente, se procedió a la investigación de enterotoxina estafilocócica en el producto elaborado.

Las muestras fueron tomadas a partir de producto con una maduración superior a 60 días, listo para su comercialización, siguiendo el procedimiento normalizado de toma de muestras. Se procesaron en el laboratorio de Salud Pública de la CAPV, utilizando el método de detección de Toxina estafilocócica VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2), que permite la detección de 7 toxinas, A, B, C (C_1, C_2, C_3), D y E, por la técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Para la concentración del extracto se utilizó ácido tricloroacético, con el fin de aumentar las concentraciones de las toxinas y suprimir las interferencias ocasionales encontradas con ciertos quesos de leche cruda.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 277 muestras de queso, detectándose enterotoxina estafilocócica en siete, 2,5 %. El mayor porcentaje de detección fue registrado en el 2009, 5 muestras en las que se detecto enterotoxina de un total de 33 analizadas, 15%.

Tabla 1. Distribución de resultados positivos a enterotoxina estafilocócica. Periodo 2002-2009.

AÑO	PLAN DE MUESTREO QUESO CURADO 200-2009	
	Nº MUESTRAS ANALIZADAS	DETECCION ENTEROTOXINA ESTAFILOCOCICA
2002	81 (n=5)	2
2003	15 (n=5)	0
2004	45 (n=1)	0
2005	22 (n=1)	0
2006	81 (n=1)	0
2009	33 (n=1)	5
TOTAL	277	7 (2,5%)

En todos los casos, se procedió a la inmovilización cautelar del producto del lote afectado hasta el esclarecimiento de la causa/s del resultado insatisfactorio y la adopción de las medidas necesarias para garantizar la seguridad de producto a consumir.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen en evidencia la necesidad de introducir mejoras en el manejo de los animales, control de la materia prima y en la aplicación de las correctas prácticas higiénicas tanto en las explotaciones, como en los establecimientos de elaboración.

Así mismo, estos resultados nos han conducido a incluir en el plan de vigilancia microbiológica diseñado para 2010, además de las muestras de seguimiento correspondientes, muestras de producto de las mismas características, elaborado en establecimientos de fuera de la CAPV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ostyn A., De Buyser, M.L., Guillier, F., Groult, J., Felix, B., Salah, S., Delmas, G., Hennekinne, J.A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France 2009. Eurosurveillance 15:13, 1-4. 2010.

EFSA Journal (2009) 271, 1-65, The Community Summmary Report on food-Borne outbreaks in the European Union in 2007.

European Comisión (2003). Opinión of the Scientific Comitee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Sthaphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses.

Balaban, N., Rasooly, A.. Review – Staphylococcal enterotoxins, Int. J. Food Microbiol., 61, 1-10. 2000.

VIDAS Staphylococcal Enterotoxin II (SET2): AOAC Performance Tested Method 070404/Pre-collaborative Study Report.

Intralaboratory validation according to the EN ISO 16740 Standard of the VIDAS SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. J.-A. Hennekinne, F. Guillier, S. Perelle, M.-L. De Buyser, S. Dragacci, S. Krys and B. Lombard. J. Applied Microbiology 102 (2007) 1261-1272.

P98 PRESENCIA DE *LISTERIA* SPP. Y RECUENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y OTRAS BACTERIAS ASOCIADAS A PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA EL CONSUMO

Jacqueline Escobar[1], Diego Gómez[2] y Javier Yangüela[2]*

[1]Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos. Ciudad universitaria, Zona 12, Guatemala. escobarmuoz@yahoo.com

[2]Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Existen factores de riesgo al consumir productos cárnicos con las siguientes características: alimentos crudos, alimentos contaminados posproceso, alimentos con pocos o sin procesos de preservación (como pH neutro o bajos niveles de sal), alimentos con largos periodos de vida útil y alimentos listos para el consumo (LPC) (ACMSF, 2008).

Dentro de este último grupo, alimentos LPC, se incluyen carnes cocinadas, chorizo, fuet, jamón, productos tratados por calor como el jamón cocido, salchichas y mortadelas, patés, harinas, quesos blandos, pescados, dips, sándwiches, etc. (Marcos, 2007; ACMSF,2008). Según la FAO/OMS (2004), este tipo de alimentos (LPC) comprenden cualquier alimento (incluidas las bebidas) que se consume normalmente en crudo y cualquier alimento manipulado, elaborado, mezclado, cocinado o transformado de otro modo en un tipo de alimento que se consume normalmente sin elaboración adicional.

Teniendo en cuenta la gran importancia que presentan los productos cárnicos LPC, su precio moderado, su gran consumo y el importante brote de listeriosis acaecido recientemente en Canadá, nos motivó a realizar análisis de estos productos adquiridos en tiendas y supermercados para evaluar la presencia de *Listeria* spp. y el recuento de *Listeria monocytogenes*, así como de otras bacterias concomitantes en estos productos (bacterias halotolerantes, bacterias psicrotrofas, bacterias ácido-lácticas y *Brochothrix thermosphacta*). También se tuvo en cuenta la temperatura de almacenamiento (4ºC y 10ºC) y el tiempo de consumo preferente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 33 muestras de productos cárnicos LPC (12 cocidos y nitrificados, 9 crudos-curados, 9 madurados con estructura muscular íntegra y 3 adobados) de distintas firmas comerciales y comprobándose que fueran del mismo lote. De cada firma comercial se adquirieron 3 envases analizándose un estuche el día de la compra, y los otros dos se almacenaron a 4ºC y 10ºC hasta alcanzar la fecha de consumo preferente.

Para los recuentos de altos y bajos niveles de *L. monocytogenes* y la investigación de *Listeria* spp.se han seguido las normas UNE-EN-ISO 11290-2 y 11290-1.

El homogenizado de alimento (dilución 10^{-1}) se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora (revivificación). Transcurrido este tiempo, para la estimación de altos recuentos, se sembró 100 µl por duplicado en placas de agar ALOA, PALCAM y RAPID'*L.mono.* y se homogenizaron con asa de Drigalski estéril. Finalmente se llevaron a incubar a 37°C/24-48 h.

Para la estimación de bajos recuentos, se sembró por triplicado 0,333 ml en placas de agar ALOA, PALCAM y RAPID'*L.mono.*, se homogenizaron con asa de Drigalski estéril y se incubaron a 37°C/24-48 horas.

Para el resto de recuentos se ha seguido la sistemática tradicional de diluciones del alimento, siembra por homogeneización en masa para bacterias psicrotrofas (PCA, 10ºC/10 días) y bacterias ácido-lácticas (agar MRS, 30ºC/72 h y atmósfera pobre en O_2) o por extensión en superficie para bacterias halotolerantes (MSA, 37ºC/24-48 h) y *Brochothrix thermosphacta* (STAA, 30ºC/48 h).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los productos cárnicos madurados con estructura muscular íntegra y adobados ninguna muestra presentó recuentos de *L. monocytogenes* (Tabla 1). Mientras que en una muestra de cocidos y nitrificados a 4ºC y a 10ºC se obtuvo recuentos elevados (10^4-10^5 *L. m.*/g) al final de consumo preferente. Igualmente, se alcanzó $1{,}8x10^2$ *L. m.*/g en una muestra de crudo-curado al final de consumo preferente a 10ºC.

En estos mismos productos (Tabla 2) se ha aislado *L. monocytogenes* en 25 g en cocidos y nitrificados al final del periodo de consumo preferente a ambas temperaturas, siendo esta muestra la que presenta los elevados recuentos de *L. monocytogenes*. La especie patógena se aísla también en crudos-curados al final de consumo preferente a 10ºC mostrando igualmente recuentos de 10^2, y en madurados con estructura muscular íntegra el día de la compra. En general, la viabilidad de *L. monocytogenes* es superior a la temperatura abusiva de refrigeración (10ºC).

Tabla 1. Recuento de *L. monocytogenes*/g obtenido en las muestras de productos cárnicos LPC.

			Final consumo preferente			
	Día compra		4ºC		10ºC	
Producto cárnico	Bajos rctos.	Altos rctos.	Bajos rctos.	Altos rctos.	Bajos rctos.	Altos rctos.
Cocidos y nitrificados (4 muestras)	0	0	$8{,}1x10^4$	$8{,}1x10^4$	$5{,}4x10^5$	$5{,}4x10^5$
			cabeza de cerdo			
Crudos-curados (3 muestras)	0	0	0	0	$1{,}8x10^2$ (salchichón)	0
Madurado con estructura muscular íntegra (3 muestras)	0	0	0	0	0	0
Adobados (1 muestra)	0	0	0	0	0	0

Tabla 2. Muestras positivas en la investigación de *Listeria* spp. en 25 g. de alimento.

	Investigación *Listeria* spp.		
	Compra	Fin periodo consumo preferente	
Producto cárnico		4ºC	10ºC
Cocidos y nitrificados	*L. welshimeri* (cabeza de cerdo)	*L. monocytogenes* (cabeza de cerdo)	*L. monocytogenes* (cabeza de cerdo)
Crudos-curados			*L. monocytogenes* (salchichón)
Madurado con estructura muscular íntegra	*L. monocytogenes* *L. innocua* (jamón curado)		
Adobados			*L. welshimeri* (lomo adobado)

Los resultados obtenidos para los cuatro grupos de bacterias alterantes estudiados señalan que los productos madurados con estructura muscular íntegra y los crudo-curados son los que presentan mayores concentraciones de microorganismos/g, tanto en el momento de la compra como al término de la fecha de consumo preferente a ambas temperaturas. La microbiota que va a orientar la flora presente en estos productos, y por lo tanto va a tener mayor responsabilidad, es la flora ácido-láctica. Durante el almacenamiento a 4ºC y a 10ºC no se comprueban diferencias en los recuentos de los productos crudos-curados, madurados con estructura muscular íntegra y adobados que alcanzan valores de 8,1 u. log/g, con una diferencia de 2,5 u. log/g respecto a los recuentos observados el día de la compra. Lo mismo se constata en los productos cocidos y nitrificados pero con recuentos que no superan las 5,3 u. log/g, siendo la diferencia con los recuentos del día de la compra de 1,7 u. log/g.

CONCLUSIONES

Se ha obtenido recuento e investigación de *L. monocytogenes* al final del periodo de consumo preferente en una muestra de productos cárnicos cocidos y nitrificados (cabeza de cerdo) a ambas temperaturas y de crudos-curados (salchichón) a 10ºC; también el día de la compra en madurados con estructura muscular íntegra (jamón curado). Hay que destacar la mayor incidencia de *L. monocytogenes* en las muestras almacenadas a 10ºC frente a 4ºC. Por lo que llamamos la atención a los consumidores para que vigilen la temperatura de sus refrigeradores, y que nunca sea superior a 4ºC. La flora ácido-láctica es el grupo bacteriano que va a orientar la flora presente en los productos crudos-curados y madurados con estructura muscular íntegra.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación y Ciencia por el apoyo económico mediante el Proyecto Consolider-Ingenio 2010 Carnisenusa CSD 2007-00016 y a la Diputación General de Aragón por el Proyecto Grupo Investigación Consolidado A01/2008.

P104 ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL AZAFRÁN SOBRE *SALMONELLA ENTERICA*

Alicia de Miguel[1], Olga Acevedo[2], Leonor Nozal Martinez[2], José Luis Novella[2], Rafael Rotger[1] y Mª Concepción Pintado[1]
[1] Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense e IRYCIS. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. 28040, Madrid
cpintado@farm.ucm.es
[2] Planta Piloto de Química Fina, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33,6. 28871, Alcalá de Henares, Madrid.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El azafrán es la especia más costosa que se comercializa en el mundo. Está formada por los estigmas de las flores de *Crocus sativus* L. y su contenido en carotenoides, ésteres de crocetina, picrocrocina, aldehídos terpénicos (siendo el safranal el más importante) y cetonas es responsable de transmitir al alimento color, sabor y aroma. El principal país productor es Irán (>90%), seguido de Grecia, Marruecos, India, España e Italia y (5).

La adición de especias a los alimentos ya cocinados puede permitir la proliferación de bacterias en el periodo previo al consumo. La pimienta (blanca y negra) y la paprika han estado implicados en brotes de gastroenteritis causados por *Salmonella* (9, 10). La normativa española exige ausencia de *Salmonella* en 25 g de azafrán (3), y existen recomendaciones para cumplir este requisito por parte de la Comisión Europea (204/24/CE; (4)) y de la Asociación Europea para Especias (ESA) (11). Sin embargo, existe una clara desproporción entre el peso de muestra a analizar y la cantidad empleada en alimentación (alrededor de 15 mg por persona), que se ve agravada por el elevado precio de esta especia. En un estudio realizado dentro del Proyecto Europeo SAFFIC (www.saffic.eu) sobre 79 muestras de azafrán en hebra (14 españolas, 15 italianas, 15 griegas, 33 iraníes y 2 marroquíes) no se detectó la presencia de *Salmonella* ni por cultivo (ISO 6579) ni mediante PCR (7). Un ensayo preliminar sugirió que *Salmonella* no puede sobrevivir largo tiempo en azafrán (6), lo que nos llevó a plantearnos un posible efecto antibacteriano de esta especia.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la actividad antibacteriana del azafrán y de dos de sus principales componentes, safranal y crocina, sobre distintos serovares de *Salmonella enterica*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 muestras españolas, 3 iraníes y 2 griegas, mezclando en molino de bolas las de cada país. Un gramo de cada muestra se inoculó con 100 µL de una suspensión conteniendo aproximadamente 10^7 bacterias de cada una de las siguientes especies: *Escherichia coli* (aislado clínico), *Staphylococcus aureus* (aislado clínico), *Salmonella enterica* serovares Typhimurium (cepas LT2 y fagotipo DT104), Enteritidis (FT 1), Hadar (FT 33), Virchow (FT 8) e Infantis. Las cepas de *Salmonella* fueron cedidas por el CNMVIS (Instituto de Salud "Carlos III"; Majadahonda, Madrid). Como control se utilizaron las mismas suspensiones bacterianas inoculadas sobre torundas de poliéster, como soporte inerte sustitutivo del azafrán. Las muestras y controles se mantuvieron en tubos herméticos a 20±4 ºC y se analizaron a los 1, 2, 4, 8, 16 y 32 días mediante recuento en placa.

La actividad antibacteriana de safranal y crocina (Fluka) se ensayó en placas de 96 pocillos con diluciones seriadas de estos compuestos, y los mismos inóculos bacterianos, en caldo Mueller Hinton, midiendo la A_{620} en un lector de placas BioRad Modelo 680 a las 20±2 de incubación a 37 ºC con agitación, y verificando a continuación la viabilidad en placa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los serovares de *Salmonella* ensayados perdieron la viabilidad entre 4 y 32 días, mostrando ligeras variaciones según el origen del azafrán. Todos los controles se mantuvieron estables durante el periodo de estudio. La cepa fagotipo DT104 de Typhimurium sobrepasó los 16 días en todas las muestras, mientras que la cepa de laboratorio LT2 del mismo serovar fue la más sensible, dando recuentos <10 UFC al 2º día. En general, las muestras españolas de azafrán mostraron más actividad antibacteriana, y algo inferior las iraníes. Los controles de *E. coli* y *S. aureus* perdieron su viabilidad en 4-8 y 2-4 días, respectivamente, mientras que la cepa de colección *S. aureus* 6538P fue indetectable el primer día.

Para investigar las bases del efecto antibacteriano detectado, se ensayó la actividad del safranal y la crocina. El safranal es un aldehído terpénico, principal responsable del aroma del azafrán, mientras que los glucosil-ésteres de crocetina (crocinas) confieren el color característico de esta especia. Estos dos componentes se han evaluado en ocasiones como posibles responsables de efectos terapéuticos del azafrán, como el antitumoral, y se ha descrito una inhibición del 50% del crecimiento de células HeLa por 0,12 mg/mL de safranal y 2,9 mg/mL de crocina (8).

Nuestros resultados mostraron una concentración mínima inhibitoria del safranal para *Salmonella* de 4 a 8 mg/mL (excepto para la cepa LT2, de 2 mg/mL), siendo la concentración mínima bactericida de 8 a 32 mg/mL. La crocina se mostró bacteriostática y bactericida a 128 mg/mL (64 mg/mL para la cepa LT2).

Los datos publicados por otros autores indican que la media de concentraciones de safranal en diversas muestras de azafrán es de 0,25±0,07 mg/g ó 4,9±1,8 mg/g según el método de medida (1), y la de crocinas de 243,0±71,5 mg/g (2). Sería difícil establecer la relación entre estos valores y las concentraciones inhibitorias o bactericidas para considerar los efectos sobre bacterias en contacto con azafrán, pero se puede especular que estos compuestos pueden llegar a ejercer una acción bactericida en el periodo de tiempo que hemos observado, en torno a los 16 días. El carácter volátil del safranal puede facilitar su interacción con las bacterias. La menor viabilidad de la cepa Typhimurium LT2 en azafrán se correlaciona bien con su mayor sensibilidad al safranal y crocina.

CONCLUSIONES

El azafrán posee actividad bactericida sobre *Salmonella enterica*, que se manifiesta durante la conservación a temperatura ambiente, y que puede deberse, al menos en parte, a sus componentes esenciales safranal y crocinas. Esta característica reduce el riesgo de infección alimentaria y puede permitir una revisión de la normativa de calidad microbiológica de esta especia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso, G.L., Sanchez-Fernandez, M.A., Garijo, J., 2001. Safranal content in Spanish saffron. *Food Sci. Technol. Int.*, 7, 225-229.
2. Anastasaki, E.G., Kanakis, C.D., Pappas, C., Maggi, L., Zalacain, A., Carmona, M., Alonso, G.L., Polissiou, M.G., 2010. Quantification of crocetin esters in saffron (*Crocus sativus* L.) using Raman spectroscopy and chemometrics. *J Agric. Food Chem.*, 58, 6011-6017.
3. Anónimo, 1984. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias (R.D. 2242/1984 de 26 de septiembre). *BOE*, 36998-37003.
4. Anónimo, 2004. Recomendación de la comisión de 19 de diciembre de 2003 relativa a un programa coordinado de control oficial de productos alimenticios para el año 2004. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L6, 29-37.
5. Anónimo, 2009. Libro blanco: Azafrán en Europa. Proyecto Saffron, http://www.europeansaffron.eu/archivos/Libro_Blanco_espanol.pdf
6. Cosano, I., Pintado, C., Acevedo, O., Novella, J., Carmona, M., de la Rosa, C., Rotger, R., 2009. Calidad microbiológica del azafrán: propuesta de una nueva normativa. *Alimentaria*, 407, 81-84.
7. Cosano, I., Pintado, C., Acevedo, O., Novella, J., Carmona, M., de la Rosa, C., Rotger, R., 2009. Microbiological quality of saffron from the main producer countries. *J. Food Protect.*, 72, 2217-2220.
8. Escribano, J., Alonso, G.L., Coca-Prados, M., Fernández, J.A., 1996. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett.*, 100, 23-30.
9. Gustavsen, S. and Breen, O., 1984. Investigation of an outbreak of *Salmonella oranienburg* infections in Norway, caused by contaminated black pepper. *Am J Epidemiol.*, 119, 806-812.
10. Lehmacher, A., Bockemuhl, J., Aleksic, S., 1995. Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiol. Infect.*, 115, 501-511.
11. Sagoo, S.K., Little, C.L., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K.A., McLauchlin, J., de Pinna, E., Threlfall, E.J., 2009. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiol.*, 26, 39-43.

P108 APLICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS Y PROBIÓTICAS PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA EN MANZANA MÍNIMAMENTE PROCESADA

Alegre, Isabel[1], *Viñas, Inmaculada*[1], *Usall, Josep*[2], *Anguera, Marina*[2], *Costa, Elena*[2] *y Abadias*[2], *Maribel*[2]*
[1]*Universidad de Lleida, Centro UdL-IRTA, XaRTA-Poscosecha, Rovira Roure, 191, 25198 Lleida*
[2]*IRTA, Poscosecha, Centro UdL-IRTA, XaRTA-Poscosecha, Rovira Roure, 191, 25198 Lleida.*
isabel.abadias@irta.cat

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El creciente consumo de frutas y hortalizas mínimamente procesadas (MP) ha provocado un aumento en los casos de intoxicaciones alimentaria asociados a patógenos de transmisión alimentaria (PTA) como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) y/o sus productos antimicrobianos se han utilizado históricamente para conservar carnes, productos lácteos y vegetales fermentados. Recientemente, su aplicación se está estudiando en frutas y hortalizas MP. Actualmente existe una demanda creciente por productos probióticos no lácteos, debido a su contenido en lactosa y colesterol, por lo que el desarrollo de nuevos probióticos, como frutas y hortalizas es de gran interés para los consumidores (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro 2010). La eficacia de un probiótico depende del nivel de inóculo, de su viabilidad a lo largo de la vida útil de producto (superior a 10^6 ufc/mL) y de su capacidad de sobrevivir al proceso digestivo y llegar viable al intestino (Kailasapathy y Chin 2000).

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad antagonista de diferentes cepas de BAL *in vitro* y en manzana MP, así como la posibilidad de aplicar un microorganismo probiótico en manzana MP y ver su efecto en el crecimiento de PTA y en la calidad a lo largo de la conservación a 5 y 10 ºC. La supervivencia al estrés gástrico, tanto de los PTA como del probiótico, fue también evaluada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se aislaron BAL de vegetales MP y productos lácteos, mediante homogeneización en peptona salina y siembra en MRS agar. La capacidad antimicrobiana de 123 aislados se testó *in vitro*, mediante el método del pocillo, frente a *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas marginalis*. Paralelamente, se determinó el efecto de 31 de estos aislados y 3 bacterias probióticas (LA-5, BB-12 y LGG) sobre la población de una mezcla de 5 cepas de *L. monocytogenes* y una mezcla de 4 cepas de *Salmonella* mediante co-inoculación de cilindros de manzana 'Golden Delicious' conservados 2 d a 20 ºC. Adicionalmente, se evaluó la supervivencia de las bacterias probióticas en manzana MP durante la conservación a 20 ºC.

El probiótico con mayor supervivencia se utilizó en ensayos semicomerciales. Las manzanas se cortaron en 10 trozos y se sumergieron durante 2 min en una solución de NatureSeal AS1 al 6 % conteniendo la mezcla de *L. monocytogenes* y la mezcla de *Salmonella* a 10^5 ufc/mL y/o la cepa probiótica a 10^8 ufc/mL. Tras el escurrido, se envasaron en bandejas de 200 g, se sellaron con un film con una permeabilidad de 3500 $cm^3m^{-2}día^{-1}atm^{-1}$ y se conservaron a 5 y 10 ºC durante 28 días.

A lo largo de la conservación se evaluó la población de *L. monocytogenes*, de *Salmonella*, de de microorganismos mesófilos y de mohos y levaduras con y sin probiótico, además de la población de probiótico. Paralelamente se

evaluó la atmósfera gaseosa en el interior de las barquetas, el aspecto visual, el pH, el color, el contenido en sólidos solubles, acidez y textura de la manzana MP.
Adicionalmente, en las muestras de manzana conservadas a 5 ºC se determinó la supervivencia de ambos patógenos y del probiótico a estrés gástrico a lo largo de la conservación. Para ello, 10 g de muestra se homogeneizaron con una solución de saliva artificial, a la que posteriormente se añadió fluido gástrico artificial y se incubó a 37 ºC durante 2 h. La población superviviente se comparó con aquella presente en las muestras antes del proceso digestivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observó inhibición *in vitro* con ninguna de las BAL aisladas. En manzana MP, ninguna de las cepas testadas redujo la población de *L. monocytogenes* y de *Salmonella*.
Únicamente la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) mantuvo su concentración al nivel inoculado en manzana MP conservada 2 d a 20 ºC, mientras que las otras dos redujeron su población más de 1 unidad logarítmica. Por este motivo, LGG se utilizó en ensayos semicomerciales.
La población de *Salmonella* aumentó ligeramente a 10 ºC de 3.9 a 5.4 log ufc/g, mientras que se redujo 0.5 unidades logarítmicas a 5 ºC tras los 28 días de conservación. En el caso de *L. monocytogenes*, la población aumentó más de 2.4 unidades logarítmicas en los primeros 7 días de conservación a 10 ºC y posteriormente la población siguió creciendo pero de forma más moderada. A 5 ºC, la población se mantuvo durante los primeros 7 días al nivel inoculado (3.7 log ufc/mL) a partir de los cuales aumentó hasta 6.4 log ufc/g. Comportamientos similares de ambos patógenos en pulpa de manzana MP han sido descritos anteriormente (Alegre et al. 2010). La co-inoculación de los patógenos con el LGG, no causó ningún efecto en la población de *Salmonella*. En cambio, la población de *L. monocytogenes*, fue, aproximadamente, 1 unidad logarítmica inferior respecto a la población inoculada sin LGG a ambas temperaturas. Esta inhibición podría ser debida a la producción de sustancias inhibitorias (Lee et al. 2008; Silva et al. 1987).
La cepa de probiótica LGG mantuvo su población al nivel inoculado (10^7 ufc/g) a lo largo de la conservación a 5 y 10 ºC. Resultados similares fueron obtenidos en trabajos con manzana y zumos de naranja y piña (Rößle et al. 2010; Sheehan et al. 2007).
La población de mesófilos aumentó exponencialmente en las muestras conservadas a 10 ºC. En cambio, a 5 ºC, no creció durante los primeros 4 días. La población de mohos y levaduras aumentó a lo largo de la conservación a 5 y 10 ºC, sin verse afectados por la presencia del LGG.
En cuanto a los parámetros de calidad evaluados, en ninguno de ellos se observaron diferencias significativas entre manzanas tratadas o no con la cepa probiótica.
En los ensayos de tolerancia al estrés gástrico, no hubo diferencias en la supervivencia de los patógenos ni del LGG inoculados solos o en combinación. La supervivencia inicial de *Salmonella* (tras la inoculación) fue aproximadamente de un 30 %. Sin embargo, esta disminuyó a un 4 % tras 4 días de conservación. En el caso de *L. monocytogenes*, la supervivencia observada fue inferior, de un 15 % inicialmente y alrededor de un 1% tras 4 días. La supervivencia del LGG fue superior a la de ambos patógenos, del 80 % inicialmente, manteniéndose la población tolerante al estrés gástrico por encima de 10^6 ufc/g hasta los 14 días de conservación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que la aplicación de la cepa probiótica LGG ejerció un efecto de protección frente al crecimiento de *L. monocytogenes* en manzana MP. Además, puede ser una cepa apropiada para la producción de manzana probiótica MP ya que mantuvo su concentración al nivel inoculado (10^7 ufc/g) durante 28 días de conservación a 5 y 10 ºC sin causar efectos negativos en la calidad. Ni los patógenos ni el LGG se adaptaron al ácido tras sobrevivir en un medio ácido (pH 3.9-4.3), viéndose su resistencia al estrés gástrico reducida a lo largo de la conservación. En el caso del LGG, la población resistente al estrés gástrico fue superior a 10^6 ufc/g hasta los 14 días de conservación, por lo que la vida útil de la manzana probiótica no debería superar esta fecha para mantener efectos probióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Oliveira, M., y Viñas, I., 2010, Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples, Food Microbiol. 27, 70-76.

Kailasapathy, K., y Chin, J., 2000, Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp, Immunol. Cell Biol. 78, 80-88.

Lee, H. Y., Xu, H., Lee, H. J., Lim, T. I., Choi, Y. B., Ko, J. R., Ahn, J., y Mustapha, A., 2008, Prophylactic uses of probiotics as a potential alternative to antimicrobials in food animals, Food Sci. Biotechnol. 17, 191-194.

Rivera-Espinoza, Y., y Gallardo-Navarro, Y., 2010, Non-dairy probiotic products, Food Microbiol. 27, 1-11.

Rößle, C., Auty, M. A. E., Brunton, N., Gormley, R. T., y Butler, F., 2010, Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria, Innov. Food Sci. Emerg. 11, 203-209.

Sheehan, V. M., Ross, P., y Fitzgerald, G. F., 2007, Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices, Innov. Food Sci. Emerg. 8, 279-284.

Silva, M., Jacobus, N. V., Deneke, C., y Gorbach, S. L., 1987, Antimicrobial substance from human Lactobacillus strain, Antimicrob. Agents Ch. 31, 1231-1233.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL-2008-08506.

P115 VALORACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE COMIDAS PREPARADAS EN FUNCIÓN DE LA LEGISLACIÓN APLICADA

María Díez, Mirian Angulo, Roncesvalles Garayoa, Isabel García-Jalón y Ana Isabel Vitas
Departamento Interfacultativo de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. C/Irunlarrea, s/n, 31008, Pamplona
mdiezlet@alumni.unav.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La tasa de actividad del sector de Restauración colectiva ha aumentado del 14% en 1990 al 31% en 2005 (FERCO, 2006), como consecuencia del cambio de hábitos alimenticios de la sociedad actual. La vigilancia de la seguridad alimentaria es una de las mayores preocupaciones del sector, ya que el 22% de las enfermedades alimentarias en Europa han tenido su origen en los alimentos elaborados y/o distribuidos por establecimientos de restauración (Jones et al., 2008). Con el fin de adaptar la normativa española a la legislación europea, en febrero del 2010 se derogó el anexo del RD 3484/2000 (BOE, 2001), en el que se establecían las normas de higiene para elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas, quedando vigente desde ese momento el Reglamento (CE) 2073/2005 (CE, 2005) y sus posteriores modificaciones 1441/2007 (CE, 2007) y 365/2010 (CE, 2010). Estas directrices europeas no incluyen las comidas preparadas en ningún grupo específico, y únicamente se definen criterios para alimentos listos para el consumo que pueden favorecer o no el desarrollo de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*: ausencia/25 g y/ó 100 UFC/g), así como para alimentos listos para consumo que contengan huevo crudo (*Salmonella* spp.: ausencia/25 g). Aunque algunas comidas elaboradas en el sector Restauración se podrían incluir en estos grupos, existen bastantes dudas sobre qué criterios microbiológicos deberían aplicar al resto. El objetivo de este estudio ha sido evaluar si la vigente legislación europea es suficiente para garantizar la calidad higiénica y la seguridad de las comidas preparadas procedentes de establecimientos de restauración colectiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre 2008 y 2010 se realizó el análisis microbiológico de 596 comidas preparadas elaboradas en hospitales, comedores universitarios y escolares, empresas de catering y residencias de ancianos de la Comunidad Foral de Navarra. Hasta febrero de 2010 (n=534) se realizó el seguimiento de los parámetros microbiológicos establecidos en el RD 3484/2000 (mesófilos, coliformes, *Staphylococcus* coagulasa +, *E. coli, Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*), mientras que a partir de dicha fecha y atendiendo el Reglamento 2073/2005, únicamente se investigó la presencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. (n=62).

Las muestras se recogieron en condiciones de esterilidad y se mantuvieron en refrigeración durante el transporte y hasta el momento de su procesado. Todos los alimentos fueron analizados dentro de las 4 h siguientes a su recepción, empleando la última versión de los siguientes métodos normalizados: ISO 4833 (aerobios mesófilos totales), ISO 4832 (coliformes), ISO 6888-1/A1 (*Staphylococcus* coagulasa positivo), ISO 7251 (*Escherichia coli*), ISO 11290-1/A1 (Investigación de *L. monocytogenes*) e ISO 6579 (Investigación de *Salmonella* spp).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra el listado de platos analizados y el porcentaje de muestras incorrectas según la Legislación aplicada. El 3,9% de las muestras analizadas en el primer periodo (enero 2008-febrero 2010) superaron alguno de los límites microbiológicos establecidos en el RD 3484/2000. Los platos incorrectos incluían frecuentemente moldes de carne y ensaladas, siendo los microorganismos indicadores (aerobios mesófilos y coliformes) y testigos de falta de higiene (*E. coli*) los principales microorganismos aislados (Figura 1). Por otro lado, en ninguno de los dos periodos se detectó la presencia de *L. monocytogenes*, pero en ambos casos se encontró un plato contaminado con *Salmonella* spp (molde de carne en el primer periodo, y lechuga en el segundo). Atendiendo a los criterios del Reglamento CE 2073/2005, el 100% de las muestras analizadasen los dos periodos serían microbiológicamente correctas (*Salmonella* no se investigaría en un plato listo para consumo que no lleva huevo crudo). Por otro lado, si incluimos los 2 patógenos en la valoración higiénica de las muestras, sólo el 0,2% del primer periodo y el 1,6% del segundo serían rechazadas (Figura 2).

Tabla 1. Platos preparados analizados entre enero de 2008 y mayo de 2010 y porcentaje de muestras incorrectas según legislación vigente

Comidas preparadas Legislación	Nº platos analizados	Nº platos incorrectos (%) según legislación vigente
RD 3484/2000	**534**	**21 (3,9)**
Primeros platos	291	6 (2,0)
Pescados	76	1 (1,3)
Carnes	148	10(6,7)
Otros	19	4 (21,0)
CE 2073/2005	**62**	**1 (1,6)**
Primeros platos	36	1 (2,8)
Pescados	11	0 (0)
Carnes	11	0 (0)
Otros	4	0 (0)
Total	**596**	**22 (3,7)**

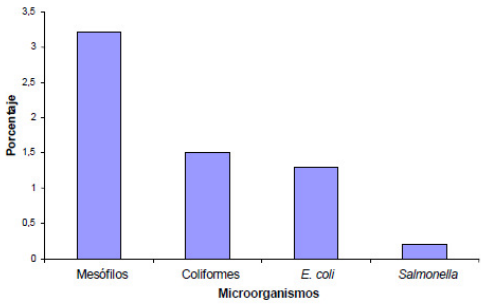


Figura 1. Porcentaje de muestras que superan el límite establecido en el RD 3484/2000 para cada uno de los parámetros microbiológicos (2008-2010, *n*=534)

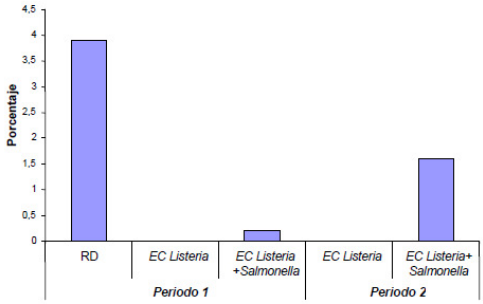


Figura 2. Porcentaje de muestras incorrectas según se aplique el RD 3484/2000 o Reglamento 2073/2005 (incluyendo o no *Salmonella* spp)

CONCLUSIONES

1. Teniendo en cuenta las categorías de alimentos establecidas, el Reglamento 2073/2005 no es suficiente para asegurar la calidad higiénica de las comidas preparadas, ya que no se investiga la presencia de indicadores de falta de higiene que podrían poner en peligro la salud del consumidor si se rompiese la cadena de frío o de calor.
2. Consideramos necesaria la inclusión de la investigación de *Salmonella* spp. en platos preparados, dado el que el porcentaje de muestras incorrectas para este parámetro es superior al obtenido para *L. monocytogenes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOE (Boletín Oficial del Estado). 2001. Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Ley 809.

CE (Comisión Europea). 2005. Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Ley 338.

CE (Comisión Europea). 2007. Reglamento (CE) Nº 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. L 322.

CE (Comisión Europea). 2010. Reglamento (UE) Nº 365/2010 de la Comisión de 28 de abril de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriáceas en la leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina. L 107.

FERCO (Federación Europea de la Restauración Colectiva Contratada). 2006. Definición de restauración colectiva. Disponible en http://www.contract-catering-guide.org/es/la_rcc.html. Último acceso 05/03/10.

Jones, S.L., Parry, S.M., O'Brien, S.J., Palmer, S.R. 2008. Operational practices associated with foodborne disease outbreaks in the catering industry in England and Wales. Journal of food protection 71, 1659-1665.

P116 IMPLANTACIÓN DE APPCC EN EL SECTOR RESTAURACIÓN: VALORACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS Y UTENSILIOS Y TEMPERATURAS DE RETENCIÓN DE PLATOS ELABORADOS

Mirian Angulo, Roncesvalles Garayoa, María Díez, Ana Isabel Vitas e *Isabel García-Jalón*
Departamento Interfacultativo de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. C/Irunlarrea, s/n, 31008, Pamplona. miriangsal@hotmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El sector de la restauración ha experimentado en los últimos años una gran expansión y a la vez constituye uno de los principales núcleos de transmisión de enfermedades alimentarias (Tirado and Schmidt, 2001), por lo que las medidas dirigidas a la prevención se muestran especialmente necesarias. En este sentido, el sistema análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) se considera un pilar básico en los servicios de *catering* para garantizar la inocuidad de las comidas, por lo que tener implantado este sistema de autocontrol es actualmente preceptivo (BOE, 2001).

La puesta en marcha y aplicación continuada del sistema APPCC no resulta fácil en el sector restauración debido a las peculiaridades del mismo. Entre éstas, cabe destacar la variedad de platos que se preparan, los recursos humanos limitados y en su mayoría poco cualificados, las dificultades organizativas, y las inadecuadas y en muchos casos obsoletas instalaciones. Por ello, se estima necesario flexibilizar el sistema de autocontrol, de manera que sin rebajar su acción preventiva se adecue a las características de estas empresas. En ese sentido, el control de temperatura y la limpieza se estiman puntos de control crítico imprescindibles, junto a los programas de prerrequisitos bien establecidos y unas guías de prácticas correctas de higiene introducidas en la rutina de trabajo.
El trabajo que presentamos evalúa el grado de limpieza de utensilios, recipientes y equipos de trabajo, así como las temperaturas de retención y seguridad alimentaria de los platos finales elaborados en diferentes cocinas de Restauración colectiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 20 cocinas, en cada una de las cuales se tomaron muestras de superficies en equipos y utensilios (n=5) y de al menos 2 muestras de platos elaborados ese día y que incluían platos calientes (primeros y segundos platos, triturados en túrmix, etc.) y platos fríos (ensaladas, postres caseros refrigerados, etc.). La toma de muestras de alimentos se realizó en condiciones de esterilidad (cubiertos y envases estériles), y en el momento de la recogida se midió la temperatura en el centro del alimento utilizando un termómetro calibrado (FoodCare, Hanna Instruments). Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta el inicio de los ensayos, que tuvo lugar siempre dentro de las 24 h siguientes a su recogida. Para la toma de muestras de superficies se emplearon placas de contacto Rodac de agar PCA (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia), presionando ligeramente el agar sobre la superficie a estudiar. Las placas se incubaron a 30±1ºC (Heraeus instruments, Hanau, Alemania) durante 72±3 horas. Al cabo de dicho periodo, se contaron todas las UFC que crecieron en el agar y el resultado se expresó en UFC/25 cm².
Se investigó la presencia de *Salmonella* spp y de *Listeria monocytogenes* en 66 muestras de alimentos siguiendo los métodos normalizados NF EN ISO 6579 y NF EN ISO 11290-1/A1, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en las placas Rodac, en la que se puede observar que sólo en 3 cocinas (15%) todas las superficies analizadas estaban por debajo del límite establecido como correcto (≤50 UFC/25 cm2), destacando la cocina número 18 por los altos recuentos encontrados en todas las superficies de equipos y utensilios analizadas. En la actualidad, no existe normativa en restauración que establezca criterios objetivos para considerar limpia una superficie, por lo que para establecer este límite, hemos tenido en cuenta la Decisión de la Comisión Europea 2001/471/EC (CE, 2001), los datos obtenidos en nuestro laboratorio durante más de 10 años de vigilancia de la limpieza en cocinas (> 3000 muestras), así como la opinión de profesionales del sector.
Estos resultados microbiológicos contrastan con los obtenidos en la observación visual, en la que todas las superficies se consideraron limpias. Este hecho, confirma la importancia de realizar periódicamente controles microbiológicos mediante placas de contacto porque aportan datos más precisos y objetivos, validando de esta forma el sistema de limpieza y desinfección empleado en la cocina, o en su caso, proponiendo sistemas más eficaces para determinadas superficies o equipos. En nuestro estudio, las superficies de cortafiambres y batidora (de difícil acceso) han mostrado los mayores recuentos microbiológicos.

Tabla 1. Recuentos de aerobios mesófilos totales (UFC/25 cm^2) en las superficies analizadas

	UFC/25 cm^2				
Cocina	CU	E/P	TC	B/R	CO/BA
1	1	24	17	4	>100
2	1	12	0	2	3
3	4	9	0	0	55
4	>100	4	>100	0	3
5	6	2	0	27	0
6	6	1	48	0	55
7	49	1	18	3	80
8	63	3	27	14	27
9	0	10	>100	27	84
10	35	4	29	6	>100
11	20	0	0	25	45
12	35	1	46	>100	70
13	18	74	18	17	28
14	68	62	>100	0	20
15	53	1	30	0	44
16	39	110	104	20	93
17	20	77	16	3	14
18	>100	68	102	69	111
19	119	9	0	2	4
20	3	5	32	9	93

CU (cuchillo); E/P (espumadera/pala); TC (Tabla corte)
B/R (bandeja/recipiente); CO/BA (cortafiambre/batidora)

Tabla 2. Relación de platos preparados analizados y porcentajes de incumplimiento de temperaturas

Comidas preparadas	Nº platos analizados	Nº platos Tª incorrecta (%)
Consumo caliente	**56**	**18 (32,1)**
Turmix/Purés	13	2 (15,4)
Pescados	12	5 (41,7)
Carnes	11	2 (18,2)
Legumbre/Verduras	10	3 (30,0)
Arroz/Pasta	7	4 (57,1)
Otros	3	2 (66,7)
Consumo frío	**10**	**8 (80,0)**
Lechuga	5	3 (60,0)
Postres lácteos	4	4 (100)
Batidos frutas	1	1 (100)
Total	**66**	**26 (39,4)**

En cuanto a las temperaturas registradas, el 32,1% de los platos servidos y consumidos en caliente se encontraban por debajo del límite establecido por la legislación (≥ 65ºC) y 2 de ellos mostraron valores inferiores a 55ºC. Cabe destacar que en las cocinas nº 7, 11 y 18 los dos alimentos recogidos presentaron una temperatura inferior a 65ºC, coincidiendo esta mala praxis en la cocina Nº 18 con los malos resultados microbiológicos obtenidos en superficies de equipos y utensilios. Por otro lado, el 80% de los platos fríos analizados no estaban correctamente refrigerados, ya que 3 de las 5 ensaladas de lechuga, y los cinco postres dulces analizados superaron los 8ºC establecidos en el RD 3484/2000 para este grupo de alimentos.

Si bien en ninguna de las comidas analizadas se ha detectado la presencia de *Salmonella* spp y/ó *Listeria monocytogenes,* este resultado no exime la necesidad de extremar la vigilancia en las desviaciones encontradas (limpieza y temperatura) para conseguir una prevención adecuada.

CONCLUSIONES

1. La limpieza y desinfección de los equipos y utensilios debe ser verificada regularmente mediante el análisis microbiológico, para evitar contaminaciones cruzadas y diseminación de microorganismos.
2. El sistema APPCC en el sector restauración debe establecer como prioritario el control de las temperaturas de retención de los platos elaborados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOE (Boletín Oficial del Estado). 2001. Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Ley 809.

CE (Comisión Europea). 2001. Decisión de la Comisión (2001/471/EC) de 8 de junio de 2001. *Official Journal of the European Communities*. L 165/48-53.

Tirado, C., Schmidt, K. 2001. WHO Surveillance Programme for control of foodborne infections and intoxications: Preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*, 43: 80.84.

P117 INVESTIGACIÓN DE RESISTENCIAS DE CEPAS DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE β-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Elena Ojer[1], Isabel García-Jalón[1], Ana Isabel Vitas[1], Jean Philippe Monnerville[1], José Leiva[2]

[1]Departamento Interfacultativo de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. C/Irunlarrea, s/n, 31008, Pamplona.

eojeruso@alumni.unav.es

[2]Servicio de Microbiología Clínica. Clínica Universidad de Navarra. C/Irunlarrea, s/n, 31008, Pamplona

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La utilización de antibióticos en producción animal (tratamiento de enfermedades y promoción del crecimiento) tiene como consecuencia el incremento de las resistencias observadas en los últimos años, lo que constituye un punto prioritario de atención y actuación debido a las importantes consecuencias que este hecho tiene en salud pública (Allen et al, 2010). A pesar de que se han descrito numerosos estudios clínicos con aislamientos de cepas de enterobacterias productoras de ßlactamasas de espectro extendido (BLEE) (Salim Máttar et al, 2007), no existe un seguimiento de la presencia de bacterias productoras de BLEE en alimentos, lo que consideramos de especial relevancia dada la directa transmisión al hombre a través de la ingesta de alimentos. Por tanto, el objetivo del presente estudio ha sido investigar la presencia y concentración de cepas de enterobacterias productoras de BLEE y su resistencia a antibióticos de uso clínico en productos cárnicos adquiridos en distintos puntos de venta del mercado navarro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 115 muestras de productos cárnicos procedentes de 41 carnicerías de Pamplona, en las que se adquirieron productos de ternera (*n*=40), pollo (*n*=36) y cerdo (*n*=39) en los formatos de hamburguesas, salchichas o carne picada. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta el inicio de los ensayos, que tuvieron lugar siempre dentro de las 24 h siguientes a su recepción. La homogeneización de los productos se realizó en Stomacher (Lab-Blender 400, Seward Medical), pesando 25 g de muestra en 225 ml de Buffered Peptona Water (BPW, Merck). Por un lado, se realizó el recuento directo sembrando 1 ml de este homogeneizado en 2 placas de agar chromID ESBL (Biomerieux) a razón de 0,5 ml por placa. Por otro, se llevó a cabo la **investigación** con preenriquecimiento del BPW (37ºC, 24 h), posterior enriquecimiento en caldo EE Mossel (1 ml del BPW incubado, 37ºC, 24 h), y aislamiento final en placa chromID ESBL. Las placas chromID ESBL fueron incubadas a 37ºC durante 24 h, aislándose las colonias sospechosas para su posterior identificación mediante las pruebas oxidasa, KIA, API 10 (Biomerieux) y tarjetas VITEK GN (Biomerieux) en los casos en que API 10S no era suficientemente discriminatorio.

La susceptibilidad a los antibióticos de las cepas aisladas se estudió siguiendo el método disco- placa (Bauer A, Kirby W, 1996). La producción de BLEE se estudió mediante el método de aproximación de discos o de doble difusión con discos descrito por Jarlier et al (1988). Para ello, se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro de una placa de Mueller Hinton, disponiendo a una distancia de 20 mm los discos de los antibióticos para observar el efecto sinérgico. De este modo se testaron los siguientes β-lactámicos: Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC, 30 μg), Ceftazidima (CAZ, 30 μg), Ceftriaxona (CRO, 30 μg), Aztreonam (AZT, 30 μg),

Cefpodoxima (CPD, 10 µg). Además, se evaluó la resistencia a grupos de antibióticos de uso habitual en clínica estudiando la susceptibilidad a Gentamicina (GM, 10 µg), Doxiciclina (D, 30 µg), Cotrimoxazol (SXT, 23.75/1.25 µg) Norfloxacino (NOR, 10 µg), Piperacilina/Tazobactam (TZP, 110 µg), Fosfomicina (FOT, 200 µg) y Cefoxitina (FOX, 30 µg). El grado de sensibilidad a cada antibiótico (sensible, resistente o intermedio) se determinó en función del diámetro del halo medido y los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la incidencia de enterobacterias productoras de BLEE por carnicerías y por tipo de producto. En más del 90% de establecimientos se detectaron muestras positivas, siendo la carne de pollo el grupo de alimentos con mayor prevalencia (86,1%). Se han aislado un total de 92 cepas productoras de BLEE correspondientes a 8 especies (Tabla 2). *Escherichia coli* ha sido la especie predominante (75%), con unos recuentos de > 103 UFC/g en siete muestras de los tres tipos de productos. *Serratia fonticola* ha sido la segunda especie más frecuentemente aislada (13%), con unos recuentos superiores a 103 UFC/g en una muestra de pollo y por encima de 102 UFC/g en ocho muestras de ternera y cerdo. A pesar de la baja incidencia de la especie *Proteus vulgaris*, sí se han observado concentraciones superiores a 104 UFC/g en una muestra de cerdo.

Tabla 1. Incidencia de enterobacterias productoras de BLEE por carnicerías y tipos de carne.

	n	n positivas* (%)
Carnicerías	41	38 (92,7)
Carne ternera	40	26 (65,0)
Carne pollo	36	31 (86,1)
Carne cerdo	39	24 (61,5)

**Muestras positivas: 1 o varias cepas*

Tabla 2. Identificación y número de cepas de enterobacterias BLEE aisladas de productos cárnicos.

Cepas	Ternera	Pollo	Cerdo	Total
E. coli	20	30	19	69
P. penneri	1	0	0	1
P. mirabilis	0	0	1	1
P. vulgaris	1	0	2	3
S. fonticola	4	5	3	12
K. pneumoniae	0	2	0	2
H. alvei	1	0	0	1
C. koseri/amalonaticus	1	1	1	3
TOTAL	28	38	26	92

Se han identificado 66 cepas productoras de BLEE resistentes a alguno de los β-lactámicos, lo que supone un 90% del total de cepas analizadas. El estudio de sensibilidad del segundo grupo de antibióticos (Tabla 3) mostró resistencia frente a D, SXT y NOR en más del 30% de las cepas, presentando una elevada tasa de sensibilidad a FOT, TZP y GM, al igual que frente a FOX. Se ha detectado también una cepa de *E.coli* β-lactamasa negativa y ampicilina resistente (BLNAR), y otra no productora de β-lactamasas y con una susceptibilidad intermedia a este antibiótico.

Tabla 3. Tasas de resistencia (R), susceptibilidad intermedia (I) y sensibilidad (S) a antibióticos[a]

Antibióticos	R (%)	I (%)	S (%)
GM	6,9	0	67
D	41	8,2	25
SXT	30	0	44
NOR	32	2,7	40
TZP	1,4	4,1	69
FOT	1,4	1,4	71
FOX	4,9	9,8	66

[a] *Expresada como porcentaje (según criterios de CLSI)*
El número de cepas testadas fue 73 para todos los antibióticos, excepto para FOX que fue 41.

CONCLUSIONES

Se ha encontrado una alta presencia de enterobacterias productoras de BLEE en productos cárnicos, con una alta tasa de resistencias a β-lactámicos (CDP y CRO principalmente) y una baja tasa de cepas productoras de cefalosporinasa AmpC. Sin embargo, la sensibilidad a FOX es elevada, lo que sugiere un bajo nivel de cepas productoras de ß-lactamasas cromosómicas de tipo AmpC desrreprimidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen et al. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nature Reviews. Microbiolgy Volume 8. April 2010.

Salim Máttar et al. 2007. Emergence of antimicrobial resistance to extended-spectrum-β-lactamases (ESBL): detection, clinic impact and epidemiology. *Infectio* 11 (1): 23-35

Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin PAthol* 45: 493-6

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philipon A. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer ß-lactamasas agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10:867-878.

CLSI. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

P122 DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PCR MÚLTIPLE EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

Rubén Gordillo, Juan José Córdoba, Miguel Ángel Asensio, Elena Rodas y Mar Rodríguez

Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad s/n. 10003 Cáceres. rugodu@unex.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Escherichia coli O157:H7 es uno de los microorganismos patógenos más preocupantes relacionados con enfermedades de origen alimentario por consumo de carne y productos cárnicos. Está incluido dentro del grupo de los *E. coli* enterohemorrágicos y se relaciona con enfermedades de considerable gravedad. Su peligrosidad se ve agravada porque presenta una baja dosis infectiva y porque puede sobrevivir en condiciones que son letales para otros microorganismos patógenos.

Por todo esto es necesario disponer de métodos de detección en carne y productos cárnicos que sean sensibles, rápidos y que faciliten el control de materias primas y productos elaborados. Como los métodos microbiológicos clásicos requieren un tiempo considerable para la detección del microorganismo, la utilización de técnicas basadas en la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos como la PCR en tiempo real (RTi-PCR), pueden ofrecer una alternativa para detectar más rápida y sensiblemente a *E. coli* O157:H7. Aunque se han descrito estrategias para investigar a este microorganismo utilizando RTi-PCR para amplificar los genes de β-glucuronidasa o de diversos factores de patogenicidad, en este estudio se desarrolla una RTi-PCR múltiple para detectar los genes que codifican el serotipo O157:H7, es decir el antígeno somático y el flagelar, con lo que se pretende incrementar la especificidad del método desarrollado para la detección de este microorganismo. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido optimizar un protocolo de RTi-PCR que permita la detección rápida, sensible y específica de *E. coli* O157:H7 para su aplicación en la detección y cuantificación de este microorganismo en alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la optimización de la RTi-PCR se han utilizado las cepas de referencia, proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo, *E. coli* CECT 4267 y *E. coli* CECT 4782. Además, para la determinación de la especificidad se utilizaron también 3 cepas de *E. coli* no-O157:H7 y 7 cepas de microorganismos patógenos relacionados con enfermedades de origen alimentario (Tabla 1). El ADN de todos los microorganismos fue extraído siguiendo el método de Lawson y col. (1989), con algunas variaciones. Se diseñaron cuatro cebadores utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystem); la pareja de cebadores RGrfbE-F/ RGrfbE-R se obtuvo a partir de la secuencia descrita del gen *rfbE* que codifica el antígeno O157 (Bilge y col., 1996) y la pareja RGfliC-F/ RGfliC-R fue diseñada a partir de la secuenciación del producto amplificado por PCR convencional con cebadores específicos para el gen que codifica el antígeno flagelar H7 (Gannon y col., 1997). La reacción de RTi-PCR se llevó a cabo con el termociclador de Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR y en un volumen final de 25 µl con 16,5 µl de 2x SYBR Green I PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,4 µM de la pareja de cebadores RGfliC-R/F, 0,8 µM de la pareja de cebadores RGrfbE-R/F y 10 ng de ADN. Las condiciones de la amplificación fueron: 10 min a 95ºC seguidos de 30 ciclos de 15 s a 95ºC y 1 min a 60ºC, a continuación se realizó un calentamiento desde 60ºC a 95ºC para obtener la curva de disociación y verificar los productos de PCR. La sensibilidad de la PCR se determinó realizando diluciones decimales a partir de 10 ng de ADN extraído de las dos cepas patrón de *E. coli* O157:H7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se optimizaron inicialmente las concentraciones de cebadores y de ADN hasta conseguir valores de Ct en las dos cepas de *E. coli* O157:H7 entre 14,7 ± 0,08 y 14,5 ± 0,25. La RTi-PCR múltiple optimizada permitió la detección de dos fragmentos de 198 pb y 88 pb correspondientes a los genes que codificaban cada pareja de cebadores. Los productos amplificados con los cebadores RGrfbE-R/F y RGfliC-R/F presentaban dos curvas de disociación diferentes con Tm de 78,7±0,3ºC y de 83,9±0,3ºC respectivamente, lo que permitió su completa diferenciación (Fig. 1). No se observaron productos amplificados en ninguna de las otras cepas probadas en el ensayo de especificidad presentando todas Ct similares al control negativo. Sólo se detectó, como era esperable, la amplificación con los cebadores RGfliC-R/F en la cepa de *E. coli* O1:H7 (Tab. 1). El método de RTi-PCR múltiple desarrollado para la detección de *E. coli* O157:H7 mostró una gran sensibilidad, estando el límite de detección en 0,001 ng. Se realizaron las curvas estándar entre los valores de Ct y la concentración de ADN entre 10 ng y 0,001 ng, mostrando una alta correlación lineal de 0,99. La pendiente de la curva fue de -3,18 que correspondía a una eficiencia del 106,2% (Fig. 2), lo que indica una buena optimización de la RTi-PCR múltiple diseñada.

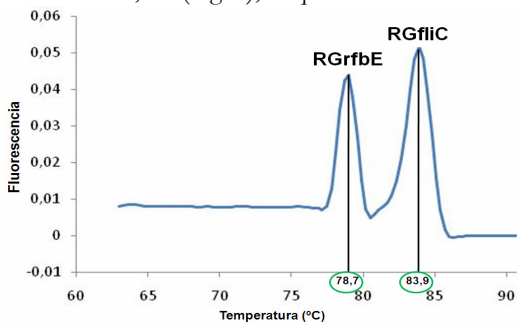


Figura 1. Curvas de disociación correspondientes a los dos amplicones generados por la RTi-PCR múltiple con SYBR Green I mostrando los valores de Tm de *E. coli* O157:H7 generados con los cebadores RGrfbE y RGfliC.

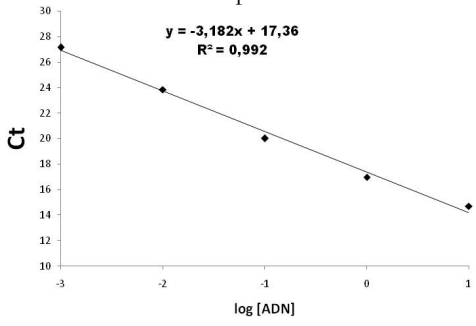


Figura 2. Curva estándar mostrando el $\log_{10}$ de la concentración de ADN vs. el ciclo de amplificación (Ct) de la RTi-PCR múltiple con SYBR Green I.

Tabla 1. Microorganismos utilizados para los ensayos de especificidad con los cebadores RGfliC-F/RGfliC-R y RGrfbE-F/RGrfbE-R y resultados obtenidos con de la RTi-PCR múltiple.

Microorganismos	[a] Ct±DS	[b] Tm±DS RGfliC-F/RGfliC-R	Tm±DS RGrfbE-F/RGrfbE-R
Escherichia coli CECT 4267 O157:H7	14,7±0,08	83,9±0,3	78,7±0,3
E. coli CECT 4782 O157:H7	14,5±0,25	83,9±0,3	78,7±0,3
E. coli CECT 515 O1: H7	16,3±0,13	83,3±0,4	-
E. coli CECT 504 O141:H4	30	-	-
E. coli CECT 744 O158:H23	30	-	-
Listeria monocytogenes CECT 934	30	-	-
L. ivanovii subsp. *londoniensis* CECT 5375	30	-	-
L. ivanovii subsp. *ivanovii* CECT 5368	30	-	-
Salmonella enterica subsp. *enterica* CECT 4374	30	-	-
Staphylococcus aureus CECT 976	30	-	-
Yersinia enterocolitica CECT 4315	30	-	-
Clostridium perfringens CECT 376	30	-	-

[a] Número de ciclos de amplificación (Ct) ± desviación estándar (DS) con triplicados de tres ensayos diferentes.
[b] Temperatura de disociación (Tm) ± desviación estándar (DS) con triplicados de tres ensayos diferentes.

CONCLUSIONES

El método de RTi-PCR múltiple desarrollado para la detección de *E. coli* O157:H7 presenta una gran especificidad y sensibilidad y podría ser de gran utilidad en la detección de este microorganismo en carne y productos cárnicos, para lo que es necesario confirmar este protocolo frente a diferentes matrices alimentarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bilge y col., 1996. *Infect. Immun.* 64, 4795-4801.
Gannon y col., 1997. *J. Clin. Microbiol.* 35, 656-662.
Lawson y col., 1989. *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 41-46.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de CONSOLIDER-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016) de la Comisión Interministerial y Ciencia y Tecnología, GRU09158 y GRU10 de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura y FEDER.

P132 PRESENCE OF SHIGA TOXIN-PRODUCING *E. COLI* AND *SALMONELLA* SPP. IN CARCASSES FROM LARGE GAME ANIMALS INTENDED FOR CONSUMPTION IN SOUTH-CENTRAL SPAIN

Sergio Sánchez[1] *and M. Dolors Vidal*[1]
[1]*Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), CSIC-UCLM-JCCM. Ronda de Toledo, s/n, 13071, Ciudad Real. sergio.sanchezprieto@uclm.es*

INTRODUCTION

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), particularly those belonging to serotype O157:H7, have recently emerged as important food-borne pathogens. Human diseases ranging from mild diarrhoea to haemorrhagic colitis and the life-threatening haemolytic uraemic syndrome can be caused by STEC. Healthy domestic ruminants can harbour STEC in their faeces and are thus recognised as their main natural reservoir. Human transmission mainly occurs through consumption of undercooked meat, unpasteurized dairy products and vegetables, or water contaminated by faeces of carriers. However, STEC strains have also been isolated from wildlife, especially from deer [2, 7, 8], and there are some reports of the isolation of *E. coli* O157:H7 from wild boars [9, 12].

Salmonella species are recognised as major zoonotic pathogens of humans and animals. In many countries, including Spain, *SaImonella* is one of the leading causes of food-borne outbreaks and infections. *Salmonella* has been isolated from a wide variety of wild animals, including wild boars [3, 4]. Although it is known to cause death in some wild species, the relevance of wildlife in the epidemiology of salmonellosis is their role as healthy carriers of a broad range of *Salmonella* serotypes.

The aim of this study was to establish the prevalence and characteristics of *E. coli* O157:H7, non-O157 STEC and *Salmonella* spp. in free-ranging red deer and wild boars killed during the hunting season in an area of south-central Spain, with the objective of determining if meat and meat products obtained from large game animals may represent a potential risk to public health.

MATERIALS AND METHODS

During the 2009–2010 hunting season (from mid-October to mid-February), a total of 155 red deer (*Cervus elaphus*) and 172 wild boars (*Sus scrofa*) were sampled in 17 different game estates in south-central Spain. On each sampling occasion, one sample of rectal faeces and one carcass swab per animal were collected from harvested individuals. Nevertheless, only 133 faecal samples from deer and 165 from wild boar were collected, because faeces collection was not possible on some occasions. Samples were examined for *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC by culture and polymerase chain reaction (PCR) as previously described [9]. For detection of *Salmonella* spp., the International Standard method ISO 6579:2002 was carried out.

RESULTS AND DISCUSSION

Shiga toxin-encoding genes (*stx* genes) were detected and non-O157 STEC were isolated in both deer and wild boar carcasses, while *E. coli* O157:H7 was detected and isolated only from deer faecal samples (Table 1).

Table 1. Prevalence of STEC in carcasses and faecal samples.

	Deer		Wild boar	
	Carcasses (n = 155)	Faeces (n = 133)	Carcasses (n = 172)	Faeces (n = 165)
stx genes	25.8 %	27.1 %	19.2 %	7.9 %
non-O157 STEC	5.2 %	23.3 %	4.1 %	4.2 %
E. coli O157:H7	0 %	1.5 %	0 %	0 %

Prevalence rates of non-O157 STEC obtained in this study are comparable to those previously reported in deer [8] and wild boar [9]. Although prevalence of *E. coli* O157:H7 in deer was similar to that previously reported in Spain [2] and higher than that reported in the United States [1, 7], this serotype could not be detected in wild boar samples, in contrast to previous studies [9, 12]. This common carriage of STEC and presence in deer and wild boar carcasses suggest that contamination of meat and meat products obtained from them with such pathogens should be taken into account and indicate that large game animals could be a potential source of human infection. Among the 57 STEC isolates characterised in this study, an atypical *E. coli* O157:H7 strain (sorbitol-fermenting and β-glucuronidase positive) originating from deer faeces was detected. Such atypical variants may not be identified by routine culture methods or by biochemical tests used to characterise serotype O157:H7 and they have been isolated before from deer in Japan, the United States and Spain [1, 5, 10]. This particular finding highlights a possible role of deer in the emergence of phenotypic variants of *E. coli* O157:H7.
Salmonella spp. were detected and isolated only from 1 (0.6%) of the wild boar faecal samples and 3 (1.7%) of the wild boar carcasses, and 4 *Salmonella* spp. isolates were characterised. The low prevalence rates of *Salmonella* spp. obtained in this study are comparable to those previously reported in samples of faeces and/or carcasses of large game animals in other countries [6, 11, 12]. These results suggest that carriage of *Salmonella* spp. by deer and wild boar is uncommon and contamination of meat and meat products obtained from them with such pathogen is probably infrequent.

CONCLUSIONS

The common carriage of STEC and presence in deer and wild boar carcasses suggest that meat and meat products obtained from large game animals could be a potential source of human infection. In addition, deer may play an important role in the emergence of phenotypic variants of *E. coli* O157:H7. Because of only sporadic finding of *Salmonella* spp. it is assumed that there is a little risk associated with this microorganism. Nevertheless, further data on contamination of meat and meat products is clearly required to further elucidate the degree of zoonotic risk posed.

REFERENCES

[1] Dunn J.R., Keen J.E., Moreland D., Alex T., Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana, J. Wildl. Dis. (2004) 40:361-365.
[2] García-Sánchez A., Sánchez S., Rubio R., Pereira G., Alonso J.M., Hermoso de Mendoza J., Rey J., Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls, Vet. Microbiol. (2007) 121:373-377.
[3] Methner U., Heller M., Bocklisch H., *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis in a wild boar population in Germany, Eur. J. Wildl. Res. (2009), in press.
[4] Millán J., Aduriz G., Moreno B., Juste R.A., Barral M., *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain), Rev. Sci. Tech. (2004) 23:905-911.
[5] Nagano H., Hirochi T., Fujita K., Wakamori Y., Takeshi K., Yano S., Phenotypic and genotypic characterization of β-D-glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer, J. Med. Microbiol. (2004) 53:1037-1043.
[6] Paulsen P., Winkelmayer R., Seasonal variation in the microbial contamination of game carcasses in an Austrian hunting area, Eur. J. Wildl. Res. (2004) 50:157-159.
[7] Renter D.G., Sargeant J.M., Hygnstorm S.E., Hoffman J.D., Gillespie J.R., *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska, J. Wildl. Dis. (2001) 37:755-760.
[8] Sánchez S., García-Sánchez A., Martínez R., Blanco J., Blanco J.E., Blanco M., Dahbi G., Mora A., Hermoso de Mendoza J., Alonso J.M., Rey J., Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants, Vet. J. (2009) 180:384-388.
[9] Sánchez S., Martínez R., García A., Vidal D., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Herrera-León S., Echeita A., Alonso J.M., Rey J., Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars, Vet. Microbiol. (2010) 143:420-423.
[10] Sánchez S., Martínez R., Rey J., García A., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Herrera-León S., Echeita A., Alonso J.M., Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants, Vet. Microbiol. (2010) 142:445-449.
[11] Smith F.C., Field R.A., Adams J.C., Microbiology of Wyoming big game meat, J. Milk Food Technol. (1974) 37:129-131.
[12] Wahlström H., Tysén E., Olsson Engvall E., Brändström B., Eriksson E., Mörner T., Vagsholm I., Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife, Vet. Rec. (2003) 153:74-80.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by INIA-MICINN research grant FAU2008-00021-C03-03.

P133 DESARROLLO DE MÉTODOS DE PCR CONVENCIONAL Y EN TIEMPO REAL PARA DETECTAR MOHOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS MADURADOS

María Isabel Luque, Alicia Rodríguez, María Jesús Andrade, Mar Rodríguez y Juan José Córdoba.
Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura., Avda. de la Universidad s/n, Cáceres, 10003, España
mluque@unex.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios extremadamente tóxicos y las sustancias carcinógenas de origen natural más potentes *(1)*. La producción de estas micotoxinas está mayoritariamente asociada a especies del género *Aspergillus (2)*. En alimentos madurados, como productos cárnicos curados y quesos madurados, se desarrolla una importante población de mohos durante el proceso de elaboración entre los que se han aislado cepas productoras de estas micotoxinas *(3 y 4)*. La detección en este tipo de productos de estas cepas aflatoxigénicas durante el proceso de maduración reduciría el riesgo de la presencia de aflatoxinas en los mismos. Es necesario disponer de métodos rápidos y sensibles que permitan la detección de mohos productores de aflatoxinas. Las técnicas basadas en la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se plantean como herramientas útiles para la detección de este tipo de mohos. Incluso la PCR en tiempo real (RTi-PCR) permitiría cuantificar mohos aflatoxigénicos.

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un protocolo de PCR convencional y de RTi-PCR para detectar cepas de mohos productores de aflatoxinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado 65 cepas de mohos pertenecientes a especies que se desarrollan habitualmente en alimentos madurados, provenientes de diferentes colecciones de cultivo (CECT, CBS, IBT y colección del grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria). Según la información disponible en estas colecciones, sólo 11 cepas, todas del género *Aspergillu*s, son productoras de aflatoxinas. Para confirmar dicha información se determinó la producción de aflatoxinas mediante HPLC-MS en todas las cepas ensayadas. Posteriormente, tras la extracción del ADN *(5)*, se realizó una PCR convencional con los cebadores omt1-F/R basados en el gen *omt* (O-metiltransferasa) implicado en la biosíntesis de aflatoxinas *(6)*. Tras la purificación, secuenciación y análisis de los fragmentos amplificados, se diseñaron 6 parejas de nuevos cebadores utilizando el programa Primer Express® (Applied Biosystems) (Tabla 1) Paralelamente se desarrollaron los correspondientes protocolos de PCR convencional y de RTi-PCR, con metodología SYBR® Green, cuya sensibilidad y especificidad para detectar mohos productores de aflatoxinas fue evaluada. Para evaluar la sensibilidad de los protocolos desarrollados se utilizaron diluciones de ADN, desde 10 ng hasta 0,1 pg, de las cepas productoras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis por HPLC-MS, 31 de las 65 cepas ensayadas produjeron aflatoxinas. Usando los cebadores omt1-F/R se amplificó un producto de PCR de 1.254 pb, sólo en algunas de las especies y cepas productoras ensayadas. Este producto de PCR se utilizó para diseñar cebadores más específicos para PCR convencional y en tiempo real para todas las cepas ensayadas. En el método de PCR convencional, los mejores resultados se obtuvieron con los cebadores AFF1/AFR3 que amplificaban un producto de 394 pb en las 31 cepas aflatoxigénicas, de forma específica (Figura 1). El límite de detección del método de PCR convencional mostró una gran sensibilidad de hasta 25 pg de ADN. Para desarrollar el protocolo de RTi-PCR se probaron las 6 parejas descritas en la tabla 1, detectándose los resultados más específicos con la pareja de cebadores AFFTR5/AFR4, con la que se obtuvo un producto de PCR de 102 pb. El análisis de la curva de disociación, permitió comprobar que sólo se amplifica un único producto (Figura 2) en todas en las cepas de mohos productoras, que no se detectó en ninguna de las no productoras. Con este método se consigue detectar hasta 0,1 pg de ADN de las cepas productoras.

Tabla 1. Cebadores diseñados a partir de la secuenciación de los productos de PCR obtenidos con los cebadores Omt1-F/R.

	Parejas de cebadores	Secuencia de nucleótidos (5´- 3´)	Tamaño producto PCR (pb)
PCR convencional	AFF1/AFR1	CTTCGAGGATGTGCCCAGCGC	437
		CCAGTGGCTTCGTGGCTTCG	
	AFF1/AFR2	CTTCGAGGATGTGCCCAGCGC	405
		GGCTTCGTGGCTTCGGTGCC	
	AFF1/AFR3	CTTCGAGGATGTGCCCAGCGC	394
		CGAACCTCGTCCACAGTGC	
	AFF1/AFR4	CTTCGAGGATGTGCCCAGCGC	500
		ACCACGACCGCCGCC	
	AFF2/AFR3	ATTCATGCCTTGGTTGGATT	300
		CGAACCTCGTCCACAGTGC	
	AFF1/AFR5	CTTCGAGGATGTGCCCAGCGC	438
		CAAACATCTCCTCTACCAGTGGC	
RTi-PCR	AFF1/AFRTR6	CTTCGAGGATGTGCCCAGCGC	265
		CGATCAAATGCCAATGAGAAAGG	
	AFFR3/AFRTR7	GGCAAACCTCCGAGTTGGAATGTG	171
		CCTAGATCAAAGCGGCGGCC	
	AFFR3/AFR2	GGCAAACCTCCGAGTTGGAATGTG	199
		GGCTTCGTGGCTTCGGTGCC	
	AFFTR5/AFR4	GGCCGCCGCTTTGATCTAGG	102
		ACCACGACCGCCGCC	
	AFFTR4/AFR3	CAAACCTCCGAGTTGGAATGTG	130
		CGAACCTCGTCCACAGTGC	
	AFFTR4/AFR5	CAAACCTCCGAGTTGGAATGTG	216
		CAAACATCTCCTCTACCAGTGGC	

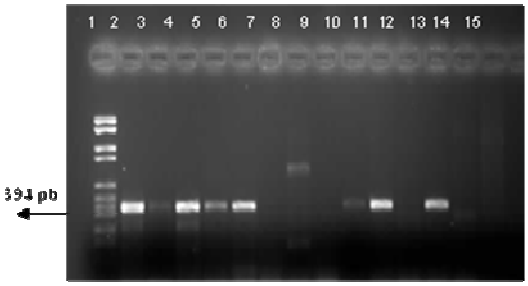


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos de PCR obtenidos con los cebadores AFF1/AFR3. Línea 1: Marcador de peso molecular de 2,1-0,15 kpb; líneas 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11 y 13: cepas aflatoxigénicas mediante HPLC-MS; líneas 7, 8, 9, 12, 14 y 15: cepas no aflatoxigénicas mediante HPLC-MS.

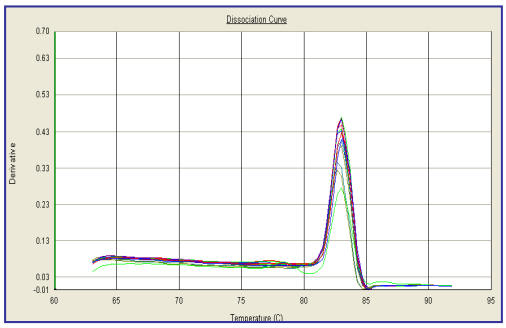


Figura 2. Curva de disociación del producto amplificado con la pareja de cebadores AFFTR5/AFR4 de varias cepas de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. productoras de aflatoxinas mediante HPLC-MS.

CONCLUSIONES

Los métodos de PCR convencional y de RTi-PCR desarrollados en este trabajo para la detección de mohos productores de aflatoxinas son sensibles y específicos, y podrían ser considerados como herramientas apropiadas para detectar mohos aflatoxigénicos en alimentos madurados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Yu y col. (2004). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1253-1262.
(2) Shapira y col. (1996). *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3270-3273.
(3) Núñez y col. (1996). *Int. J. Food Microbiol.* 32, 185-197.
(4) Kokkonen y col. (2004). *Food Addit. Contam.* 22, 449-456.
(5) Sánchez y col. (2008). *J. Food Prot.* 71, 2497-2503.
(6) Richard y col. (2009). *Anim. Feed Sci. Technol.* 148, 309-320

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2007-64639 y CONSOLIDER-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016) de la Comisión Interministerial y Ciencia y Tecnología, GRU09158 y GRU10 de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura y FEDER.

P134 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LECHES INFANTILES. DIFICULTADES EN EL ESTUDIO DE ENTEROBACTERIAS Y *ENTEROBACTER SAKAZAKII*

Gracia Martínez Reina[1], Ana Mª Sánchez Cánovas[1], Ángeles Castaño Garrido[1], Mª Dolores Vilella Martínez[1], Mª José Barnes Campos[1], Trinidad Martínez Martínez[2] y Mª Constanza Soriano Cano[2]

[1]Laboratorio de Microbiología, Consejería de Sanidad y Consumo. Ronda de Levante 11, 30008, Murcia
mgracia.martinez@carm.es
[2]Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis, Consejería de Sanidad y Consumo. Ronda de Levante 11, 30008, Murcia

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Enterobacter sakazakii es un patógeno oportunista que puede ocasionar infecciones graves en neonatos. *E. sakazakii* fue definida por primera vez como una nueva especie en 1980 (Farmer *et al*, 1980). Estudios de hibridación DNA-DNA mostraron que no estaba claramente asignado el género para *Enterobacter sakazakii* ya que existía un 53-54% de relación con 2 géneros diferentes: *Enterobacter* y *Citrobacter*. Se asignó finalmente como *Enterobacter* ya que fenotipica y genotípicamente era más próxima a *E. cloacae* que a *C. freundii*, las dos especies tipo de estos géneros. En el estudio original se describieron 15 biogrupos diferentes. Recientemente, los estudios taxonómicos han determinado que este grupo de organismos consta en realidad de varias especies genómicas, por lo que se ha propuesto que todas estas especies fueran reagrupadas en un nuevo genero: *Cronobacter* spp. (equivalente a lo que anteriormente se conocía como *Enterobacter sakazakii*). El género *Cronobacter* incluiría las siguientes especies: *Cronobacter sakazakii, C. malonaticus, C. turicensis, C.muytjensii, C. dublinensis sp., C. dublinensis subsp. dublinensis, C. dublunensis subsp. lausannensis y C. dublinensis subsp. lactaridi.*

Considerando la susceptibilidad de la población infantil, la normativa europea comunitaria establece los criterios de Seguridad Alimentaria y de Higiene en procesos relativos a los preparados deshidratados para lactantes, alimentos dietéticos deshidratados de usos médicos especiales para menores de 6 meses y para los preparados deshidratados de continuación, indicando ausencia de Enterobacterias y *Salmonella* en todos ellos y ausencia de *Enterobacter sakazakii* en los dos primeros.

Se ha realizado el estudio de 36 muestras de leches infantiles, pertenecientes a los diferentes grupos de alimentos descritos anteriormente, con el fin de evaluar el estado actual de higiene de este tipo de alimento (mediante la determinación de Aerobios y Enterobacterias), verificar la ausencia de los patógenos (*Salmonella*, *E. coli* y *E. sakazakii*) y realizar una puesta a punto las técnicas analíticas correspondientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aeróbios mesófilos, Enterobacterias, E. coli. Se han analizado mediante el sistema TEMPO (Biomerieux), sistema basado en el Número Más Probable (NMP) con una medida de fluorescencia.

Suspensión madre: 10 gr de leche en polvo en 90 ml de disolución de hidrógeno fosfato dipotásico. Condiciones de incubación de las tarjetas TEMPO: Aerobios (30ºC, 48h), Enterobacterias (35ºC, 24h), E. coli (37ºC, 24h).

Las enterobacterias también se han analizado mediante siembra de 1 ml de la suspensión madre en placas de Agar VRBG, en profundidad, e incubación a 37ºC/24h.

E. sakazakii. 10 gr de leche en polvo en 90 ml de solución de Agua de Peptona. Incubación a 37ºC/16-20h. Resiembra de 0,1 ml en 10 ml de caldo mLST e incubación a 44ºC/24h. De ahí, se toman 10 µl y se siembran en superficie, en placas de Agar CromID Sakazakii. Confirmación: API20E e ID32E.

Salmonella: 25 gr de leche en polvo en 225 ml de Agua de Peptona. Incubación a 37ºC/16-20h. Resiembra de 0,1 ml en 10 ml de caldo RVS e incubación a 41,5ºC/6-8h. De ahí se toma 1 ml y se resiembra en 10 ml de caldo M. Incubación a 41,5ºC/16-20h. Se toman 500 µl para analizar por el sistema miniVidas. Confirmación: API20E.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aerobios mesófilos: La legislación no establece ningún límite para este parámetro. Se encontró que en un 47% de las muestras los niveles fueron inferiores a 100 ufc/g (límite de detección de la técnica TEMPO en el caso de Aerobios). En el resto de muestras, 3 de ellas tuvieron valores elevados (superiores a 2000 ufc/g), llegando a alcanzar una de ellas niveles de $3x10^6$ ufc/g.

Salmonella y *E. coli*: Se comprobó la ausencia de ambos patógenos en todas las muestras analizadas.

E. sakazakii: El cultivo de *E. sakazakii* fue negativo para todas las muestras, excepto en una, en la que se produjo crecimiento de las colonias características en el medio ChromID Sakazakii (Biomerieux). La confirmación de estas colonias mediante el sistema API20E e ID32E nos llevó a una identificación con "baja discriminación" bien de *Pantoea* o bien de *Enterobacter cancerogenus*, ambas Enterobacterias muy próximas filogenéticamente a *E. sakazakii*.

E. sakazakii no es en realidad una especie bacteriana sino un género, *Cronobacter* spp., según se propuso en 2007 (Iversen *et al*, 2007) y agrupa, como mínimo 8 especies distintas (Iversen *et al*, 2008). Su descripción bioquímica es muy reciente, lo que nos lleva a plantearnos si los sistemas de identificación bioquímica actuales permiten la identificación de cualquiera de estas especies, o si, por el contrario, se basan en las características bioquímicas de la especie tipo: *Cronobacter sakazakii*.

Enterobacterias: En el análisis de *Enterobacterias* no se detectó, en principio, la presencia de dichos microorganismos en ninguna de las muestras. La determinación de este parámetro por el sistema TEMPO nos permite expresar los resultados en ufc/g, con un límite de detección de <10 ufc/g (similar al que se obtiene por el sistema tradicional, mediante siembra en placa). Sin embargo, la legislación exige comprobar la Ausencia de Enterobacterias en 10 g.

Mediante el sistema de "Asociación de tarjetas" (se asocian 3 tarjetas TEMPO, lo que equivale a un NMP basado en una cantidad de tubos 3 veces mayor), se puede bajar el límite de detección a 3,3 ufc/g. Se realizó esta asociación de tarjetas y se comprobó que los resultados en todas las muestras fue <3,3 ufc/g. Sin embargo, seguíamos sin poder asegurar la ausencia de Enterobacterias en 10 g.

Para salvar esta situación utilizamos el siguiente protocolo, a sugerencia de Biomerieux: 10 g de leche en polvo en 90 ml de solución de hidrógeno fosfato dipotásico. Esta suspensión se incubó a 37ºC/24h. De este modo, si existían Enterobacterias se multiplicarían. A continuación, se realizó el análisis mediante el sistema TEMPO con asociación de tarjetas (3 tarjetas por muestra). Este procedimiento serviría no para cuantificar, sino para determinar: "Ausencia/10g" (cuando los resultados fueran <3,3 ufc) o "Presencia/10g" (cuando se obtuviera algún recuento). El análisis de las muestras de este modo dio como resultado la presencia de Enterobacterias en una de ellas (>4,9E4, aunque su concentración inicial, sin incubación previa, sería muy baja: <3,3 ufc/g).

La determinación de enterobacterias utiliza un sustrato fluorescente que, en presencia de enterobacterias, se transforma en no fluorescente. Las leches infantiles son hidrolizados proteicos, que pueden contener componentes anti-regurgitantes, anti-cólico, etc. Para verificar que no se hubiera producido una inhibición de la reacción (por interacción de algún componente de la leche con el sustrato), se realizó la cuantificación por el sistema tradicional, mediante siembra en Agar VRBG. Las muestras negativas mediante el sistema TEMPO, sin incubación previa, se confirmaron como negativas mediante siembra en Agar, y la muestra positiva nos dio un recuento en Agar VRBG de 50 ufc/g (ha existido por tanto, inhibición en la determinación mediante el TEMPO, para este tipo de alimento).

CONCLUSIONES

La exigencia de la legislación de determinar la ausencia de Enterobacterias en 10 g de muestra obliga a modificar la técnica tal como se ha descrito. Respecto a *E. sakazakii*, pensamos que los sistemas de identificación bioquímicos actuales no son adecuados todavía para el estudio de este patógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Real Decreto 135/2010 (BOE 25/02/2010).
Farmer, J., Asbury, M.A., Hickman, F.". Brenner, D.J. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 569-584.
Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N. et al. (2007). BMC Evol. Biol. 7: 64.
Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B. et al. (2008). IJSEM 58: 1442-1447.
ISO/TS 22964: 2006.
UNE-EN ISO 8261: 2002.

P135 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO PROPIÓNICO PARA REDUCIR LAS POBLACIONES DE *Campylobacter jejuni* PRESENTES EN CARNE DE POLLO

Naiara Maya, Bárbara Herrera y Elena González Fandos
Departamento de Agricultura y Alimentación, Facultad de Ciencias, Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios 51 26006, Logroño, La Rioja
elena.gonzalez@unirioja.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La carne de ave es un vehículo importante de microorganismos patógenos para el hombre entre los que destacan *Salmonella* spp y *Campylobacter jejuni*. El consumo de carne de pollo se considera un importante factor de riesgo para la infección por *Campylobacter*. Por otra parte, el número de infecciones por *Campylobacter* ha ido aumentando en los últimos años, superando en algunos países los casos de salmonelosis.

La aplicación de buenas prácticas de higiene puede reducir la incidencia de *Campylobacter jejuni*. Sin embargo, diversos estudios señalan que la eliminación total de este patógeno en animales vivos y en canales de pollo no es posible con la aplicación de estas medidas higiénicas. Por tanto, parece oportuno abordar estrategias para reducir la incidencia de *Campylobacter jejuni* en canales de aves. Para reducir la presencia de microorganismos patógenos en la carne se recomienda la aplicación del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control en mataderos así como la conveniencia de incluir un tratamiento higienizante de la carne.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del lavado de canales de pollo con ácido propiónico en las poblaciones de *Campylobacter jejuni*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el estudio se inoculó *Campylobacter jejuni* en 45 muslos de pollo y se procedió al lavado con soluciones de ácido propiónico al 1 y al 2%. El lote control fue lavado con agua destilada. Posteriormente, los muslos de pollo se almacenaron a 4ºC durante 8 días. Se tomaron muestras después del tratamiento y los días 1, 3, 6 y 8.

Para el análisis microbiológico se tomaron 10 g de piel en condiciones asépticas, se procedió a homogenizar en un stomacher con 90 ml de agua de peptona al 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemania). A continuación se realizaron las diluciones necesarias en el mismo diluyente y se procedió a determinar los siguientes grupos microbianos: flora mesófila, flora psicrotrofa, pseudomonas, enterobacterias y *Campylobacter jejuni*.

Para la determinación de la flora mesófila se utilizó agar PCA (Merck). Las placas se incubaron durante 48-72 horas a 30ºC (ICMSF, 1978). Para la determinación de la flora psicrotrofa se utilizó agar PCA (Merck). Las placas se incubaron durante 10 días a 7ºC (ICMSF, 1978). El recuento de enterobacterias se realizó en agar VRBG (Merck). Las placas se incubaron a 37ºC durante 24 horas (ICMSF, 1978). Para la determinación de *Pseudomonas* se utilizó agar pseudomonas F base (Merck) al que se añadió glicerina. La incubación se realizó a 25ºC durante 48 horas (King et al, 1954).

Para la determinación de *Campylobacter jejuni* se utilizó el agar CCDA (Oxoid, Basingstoke, UK). Las placas sembradas se incubaron en condiciones de microaerofilia durante 48 horas a una temperatura de 42ºC (Mosel et al 1995).

Mediante la realización del análisis sensorial se pretendió evaluar distintos parámetros organolépticos que tuvieran relación con la conservación y la apariencia general de los muslos de pollo frescos. Las valoraciones sensoriales se realizaron siempre en el mismo lugar, en las mismas condiciones de iluminación, por el mismo grupo de personas. Se evaluaron los siguientes parámetros: olor, color de la piel, color de la carne, textura y aceptabilidad general. Se utilizó una escala de 7 puntos, estableciendo el límite de aceptabilidad en 3 (Anzaldúa-Morales 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el tratamiento con ácido propiónico al 2% se observó una reducción de las poblaciones de *Campylobacter jejuni* de 2,02 unidades logarítmicas. La eficacia del tratamiento con ácido propiónico disminuyó a lo largo del almacenamiento. El lavado con ácido propiónico a concentraciones del 1% también redujo las poblaciones del patógeno en estudio, si bien fue menos eficaz que a concentraciones del 2%. A los 8 días de almacenamiento, el lavado con ácido propiónico al 1 y 2% redujo las poblaciones de *Campylobacter jejuni* 0,76 y 1,52 unidades logarítmicas, respectivamente.

En el día 1 de almacenamiento el lavado con ácido propiónico al 1 y 2% redujo la flora mesófila en 1,0 y 1,28 unidades logarítmicas, respectivamente. En las muestras tratadas con 1 o 2% de ácido propiónico las poblaciones de flora mesófila y psicrotrofa fueron siempre inferiores a 8 log ufc/g.

En cuanto a la poblaciones de *Pseudomonas* se observó una importante reducción en los muslos tratados con ácido propiónico respecto a las muestras control. A los 3 días de almacenamiento el tratamiento con ácido propiónico al 2% redujo las poblaciones de *Pseudomonas* en 2,27 unidades logarítmicas.

El día 0 no se observa ningún efecto negativo del ácido propiónico en la calidad sensorial, observándose una puntuación de 7 en todos los parámetros evaluados. Las puntuaciones fueron disminuyendo a lo largo del almacenamiento, especialmente afectados se vieron los muslos control a partir del día 3 con una importante disminución de la calidad sensorial. El límite de aceptación, establecido en la puntuación 3, fue alcanzado por los muslos control el día 6. Los muslos tratados con ácido propiónico se consideraron aceptables durante los 8 días del ensayo.

El efecto del ácido propiónico en los valores de pH de los muslos tratados fue significativo respecto a los muslos control. Inicialmente los valores de pH de los muslos tratados con 1% y 2% de ácido propiónico (día 0) fueron de 0,92 y 1,36 unidades menos que los muslos control respectivamente, dicha diferencia se redujo a lo largo del almacenamiento.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el ácido propiónico puede reducir las poblaciones de *Campylobacter jejuni* en carne de pollo, sin afectar negativamente a la calidad sensorial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anzaldúa-Morales, A. (1994) *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*. Zaragoza: Acribia.
ICMSF (1978) Microorganisms in foods. 1: Their significance and methods of enumeration. 2nd ed. Toronto: University of Toronto Press.
Mossel, D.A.A. et al. (1995). *Essentials of the microbiology of foods. A textbook for advanced studies*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al Proyecto FOMENTA-2007-11 financiado por el Gobierno de La Rioja.

P137 INCIDENCIA DE *AEROMONAS* SPP. EN CARNES FRESCAS Y EN PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA EL CONSUMO

Elsa Iglesias, Verónica Otero, Patricia González, Jose M. Rodríguez-Calleja y Andrés Otero
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria.
Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071 León.
eiglcl@unileon.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En el género *Aeromonas* se incluyen microorganismos de origen acuático que pueden causar infecciones alimentarias (en España, se sitúan entre los tres principales agentes bacterianos productores de gastroenteritis). Debido a su gran ubicuidad, pueden encontrarse en múltiples alimentos, principalmente aguas, pero también en la carne (Rodríguez-Calleja et al., 2006).

Los objetivos de este trabajo han sido: (a) aportar datos significativos que contribuyan a la realización de una evaluación cuantitativa del riesgo para la salud asociado a la ingesta de bacterias patógenas, en particular de *Aeromonas* spp., con los productos alimenticios de origen cárnico, y (b) establecer posibles correlaciones en función del periodo de muestreo, teniendo en cuenta el espacio temporal de dos años consecutivos y las estaciones de invierno y primavera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo muestreos regulares en dos periodos de tiempo; uno durante la campaña 2008-2009 y otro durante la campaña 2009-2010. En cada estación del año se analizaron un total de seis lotes correspondientes a tres supermercados, distribuidos en dos zonas distintas de la ciudad de León. De cada lote se tomaron muestras de cinco tipos de productos cárnicos listos para el consumo (jamón cocido, pechuga de pavo, mortadela, chorizo, salchichón) y dos tipos de carnes frescas (pechuga de pollo y lomo de cerdo), y en cada uno de ellos se estudió la presencia de *Aeromonas*.

A partir de 25 g del alimento, se realizaron homogeneizados en bolsa de Stomacher con 225 ml de agua de peptona al 0,1% y se realizó una siembra directa en agar almidón ampicilina (SAA).

De cada medio de cultivo se escogieron varias colonias típicas para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas (Harrigan, 1998) y mediante los sistemas miniaturizados de identificación API 10S y API 20E (Biomerieux España, S.A.).

Utilizando métodos basados en la técnica de PCR se investigó, en las cepas previamente identificadas, la presencia de genes asociados a la patogenicidad (*hlyA*, *alt*, *ast* y *laf*) en *Aeromonas* (Pablos et al., 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobre un total de 168 muestras estudiadas, se aislaron 58 presuntas *Aeromonas* en el medio SAA. La realización de las pruebas de identificación citadas permitió adscribir al género *Aeromonas* a 55 de las cepas aisladas. De éstas, 50 presentaron el siguiente perfil fenotípico: tinción de Gram -, oxidasa y catalasa +, resistencia al agente O129, fermentación del manitol pero no del inositol, hidrólisis de esculina +. Además, todas estas cepas presentaban al menos uno de los genes asociados a patogenicidad investigados.

Entre todas las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas, el genotipo *alt*+/*hly*A+/*ast*-/*laf*- fue predominante (60,0%), la combinación *alt*+/*hly*A+/*ast*+/*laf*- fue detectada en otras 13 cepas (23,6%), dos cepas (3,6%) portaban el genotipo *alt*+/*hly*A+/*ast*-/*laf*+ y el resto de cepas fueron portadoras de un solo gen. La presencia de estos genes en cepas de *Aeromonas* ha sido relacionada con su capacidad para producir procesos infecciosos humanos (Isonhood y Drake, 2002).

En la Tabla 1 se presenta la distribución de las cepas de *Aeromonas* en función del producto alimenticio del que fueron aisladas y del periodo del año en que se tomaron las muestras. Las cepas de *Aeromonas* identificadas fueron contaminantes del 18,5% de las muestras, siendo las pechugas de pollo y los lomos de cerdo los principales productos portadores. No se presentaron diferencias significativas en la contaminación de cada tipo de producto por *Aeromonas* en función ni del año ni de la estación astronómica de muestreo.

Tabla 1. Cepas de *Aeromonas* spp. aisladas en diferentes muestras de carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo

Producto	INVIERNO 2008-2009	PRIMAVERA 2009	INVIERNO 2009-2010	PRIMAVERA 2010
Jamón cocido	0	0	0	0
Pechuga de pavo	0	1 (1*)	1 (1*)	0
Mortadela	0	0	1 (1*)	0
Chorizo	0	0	1 (1*)	1 (1*)
Salchichón	0	0	0	0
Pechuga de pollo	20 (4*)	5 (3*)	3 (2*)	5 (4*)
Lomo fresco de cerdo	3 (3*)	5 (3*)	10 (4*)	3 (3*)

* Número de muestras de las que proceden los aislados

CONCLUSIONES

En los productos alimenticios estudiados, la incidencia por *Aeromonas* spp. fue del 18,5%, sin influencia significativa ni de la época del año en que se comercializaban ni del año de muestreo.

Los productos alimenticios investigados, principalmente las pechugas de pollo y los lomos de cerdo, pueden ser un potencial vehículo de *Aeromonas* con capacidad para producir gastroenteritis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harrigan, W. F. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology (3ª edición). Academic Press, London.
2. Isonhood, J. H., and M. Drake. 2002. *Aeromonas* species in foods. J. Food Prot. 65:575-582.
3. Pablos, M., J. M. Rodríguez-Calleja, J. A. Santos, A. Otero, and M. García-López. 2009. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. Int. J. Food Microbiol. 135:158-164.
4. Rodríguez-Calleja, J. M., I. García-López, M. L. Garcia-Lopez, J. A. Santos, and A. Otero. 2006. Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. J. Food Prot. 69:1106-1112.

AGRADECIMIENTOS

Elsa Iglesias Collar es beneficiaria de una beca enmarcada en el programa para la contratación de personal investigador de reciente titulación de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (ORDEN EDU/1933/2008). . Este trabajo se ha financiado con el proyecto CONSOLIDER - Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016).

P139 *ESCHERICHIA COLI* VEROTOXIGÉNICO (ECVT) EN LECHE DE OVEJA DESTINADA A LA FABRICACIÓN DE QUESO

Verónica, Otero[1], Borja, Linage[1], Jesús, Santos[1] y María Luisa García López[1].

[1]Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071, León.

verooavet@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las cepas de *Escherichia coli* capaces de producir gastroenteritis humanas se clasifican en, al menos, seis grupos distintos, siendo uno de ellos el denominado *E. coli* enterohemorrágico (ECEH) o verotoxigénico (ECVT). A este grupo pertenecen cepas que producen una o más verocitotoxinas también conocidas como toxinas Shiga o STX. Entre las cepas ECVT productoras de enfermedad en el hombre predomina el serogrupo O157 pero cepas de otros serogrupos pueden producir también verocitotoxinas y ser patógenas. No todas las cepas que pertenecen a serogrupos considerados verotoxigénicos producen verotoxinas porque este carácter está regulado por genes presentes en un bacteriófago. Por ello, para la identificación definitiva de las cepas verotoxigénicas es preciso demostrar que éstas producen verotoxina(s) o que poseen los genes que regulan su producción aunque hasta el 5% de cepas aisladas de pacientes con síndrome urémico hemolítico (SUH) son *stx*-/*eae*+ (2).

ECVT es un patógeno emergente. Los procesos que originan estas bacterias oscilan entre moderados y graves, pudiendo, especialmente en niños y ancianos, ocasionar secuelas que perduran toda la vida del paciente e incluso la muerte. Su principal reservorio es el tracto intestinal de los rumiantes aunque en éstos no suele producir síntomas clínicos por lo que su presencia no puede ser detectada por los procedimientos habituales de control. La leche contaminada con heces, generalmente en la explotación, puede ser un vehículo de ECVT y es considerada como una vía de transmisión importante (hasta el 5% de los brotes). Por su tolerancia a los valores bajos de pH, el proceso de fabricación del queso no inactiva a ECVT. Por eso, se aísla de algunas variedades de queso y varios brotes de SUH se han asociado al consumo de éste y otros productos lácteos elaborados con leche tanto pasterizada como sin pasterizar (5).

Este trabajo se ha realizado para conocer la importancia de la leche de oveja producida en Castilla y León como vehículo de ECVT con el fin último de mejorar la calidad de esta producción ovina y así minimizar el riesgo asociado a la posible presencia de ECVT en queso de oveja.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. En el transcurso de un año (Junio 2009-Mayo 2010) se analizaron 350 muestras de leche de tanque correspondientes a otras tantas explotaciones localizadas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

Enriquecimiento no selectivo de las muestras. Volúmenes de 50 ml de cada una de las muestras se sembraron en 450 ml de caldo TSB (Tryptone Soy Broth, Oxoid) conteniendo 0,6% de extracto de levadura (TSBYE), incubándose a 42 ºC durante 18 h (3,7).

Detección de los genes stx1 y stx2 en leche. Tras el enriquecimiento y tratamiento de las muestras, se investigó la presencia de los genes *stx*1 y *stx*2 siguiendo el procedimiento descrito por Paton & Paton (6).

Aislamiento de cepas de ECVT. Un asa de cultivo de los enriquecimientos positivos para los genes *stx*1 y/o *stx*2 se sembró en dos medios sólidos diferentes: CT-SMAC (Oxoid) y Enterohaemolysin Agar (4). Las colonias sospechosas se sometieron a pruebas preliminares y en estas cepas se investigó la presencia de los genes *stx*1, *stx*2 y *eae* (6).

Identificación y tipificación de las cepas. Todas las cepas seleccionadas se inocularon en galerias API 20E (BioMerieux) y se sometieron a pruebas con Oxoid Dryspot *E. coli* Seroscreen y *Dryspot E.* coli O157 Latex Kits.

Detección de las toxinas STX1 y STX2 en leche. Inicialmente, se evaluó la utilidad del ProspecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC) assay (Remel Laboratories) para detectar las toxinas Shiga en leche de oveja (1). Se realizaron pruebas en las que se le inocularon distintos niveles de la cepa de colección *E. coli* CECT 4076 en leche pasterizada y sin pasterizar. Posteriormente, se investigó la presencia de las toxinas en las muestras de leche incubadas en las condiciones del enriquecimiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos relativos a la presencia de los genes *stx*1 y/o *stx*2 en muestras de leche de oveja tras el enriquecimiento no selectivo se dan en la Tabla 1.

Tabla 1. Incidencia de los genes *stx1* y *stx2* en muestras de leche de tanque

Nº de muestras	Positivas *stx*s	*stx*1+	*stx*2+	*stx*1+/*stx*2+
350	154 (44%)	31 (8,85%)	38 (10,85%)	85 (24,28%)

De las muestras de leche positivas para los genes *stx*1 y/o *stx*2 se aislaron 455 cepas sospechosas y en 310 se investigó la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae*. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Incidencia de los genes *stx*1, *stx*2 y *eae* en 310 cepas de posibles ECVT aisladas de leche de oveja

Posibles cepas ECVT	Positivas *stx*s	*stx1*+	*stx*2+	*stx*1+/*stx*2+
310	34 (11%)	24 (7,74%)	1 (0,32%)	9 (2,9%)
Genotipos	*stx*-/*eae*+	*stx1*+/*eae*+	*stx*2+/*eae*+	*stx*1+/*stx*2+/*eae*+
	84 (27,1%)	6 (1,93%)	1 (0,32%)	3 (0,96%)

Únicamente el 40,35% de las cepas fue identificado por las galerías API como *E. coli*. Esto no resulta sorprendente por las características fenotípicas de las cepas de ECVT. Siete cepas fueron positivas en el ensayo con el Dryspot *E.coli* O157 test y tres con el Dryspot *E.coli* Seroscreen.

En leche de oveja pasterizada inoculada con niveles bajos de la cepa patrón de ECVT, el test inmunológico dio positivo para las toxinas STXs después del enriquecimiento pero en leche sin tratar térmicamente, las toxinas sólo se detectaron cuando el inóculo era del orden de 10^5 ufc/ml (Tabla 3). En las 130 muestras enriquecidas de leche en las que se investigó la presencia de las toxinas Shiga, éstas no se detectaron. Estos resultados sugieren que los microorganismos de la leche influyen en la producción de toxinas por parte de ECVT.

Tabla 3. Resultados del ProspecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC) assay en leche de oveja cruda inoculada con la cepa patrón *E. coli* CECT 4076.

Muestra	Positivo	Negativo	Control	10^5 ufc/ml	10 ufc/ml	1 ufc/ml
λ = 450nm	2,124	0,065	0,058	1,234	0,063	0,064
λ = 620nm	0,064	0,046	0,044	0,07	0,047	0,047
Relación	2,06	0,019	0,014	1,164	0,016	0,017

CONCLUSIONES

La leche de oveja es una fuente significativa de cepas de *E. coli* portadoras de genes que codifican la producción de toxinas Shiga y/o de intimina.

La flora de la leche parece inhibir la producción de toxinas shiga.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acheson, D.W.K., Lincicome, L.L., De Bruecker, S. & Keusch, G.T. 1996. J. Food Protect., 59: 344-349.
2. Bielaszewska, M., Köck, R., Friedrich, A. W., von Eiff, C., Zimmerhackl,L.B., Karch, H. & Mellmann, A. 2007. PLoS ONE. 2(10): e1024.
3. Baylis, C.L. 2008. J. Appl. Microbiol., 105: 1259-1265.
4. Beutin, L., Montenegro, M.A., Orskov, I.,Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S. & Stephan, R.1989. J. Clin. Microbiol., 27: 2559-2564.
5. Meng, J., Doyle, M.P., Zhao, T & Zhao, S. 2007. Enterohaemorragic *E. coli*. En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 3rd edn. ASM Press-Washington. Pp.249-270.
6. Paton, A. W. & Paton, J.C. 1998. J. Clin. Microbiol., 36:598-602.
7. Vimont, A., Vernozy-Rozand, C. & Delignette-Muller, M.L. 2006. Lett Appl Microbiol., 42: 102-108.

AGRADECIMIENTOS

Verónica Otero es beneficiaria de una beca FPU. Este estudio ha sido financiado por la Junta de Castilla y León Grupo de Investigación GR155. Los autores también agradecen la colaboración del Consorcio Promoción del Ovino.

P144 CONTROL DE *AEROMONAS HYDROPHILA* Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN HAMBURGUESAS DE CARNE DE CONEJO ENVASADAS EN ATMÓSFERA MODIFICADA

Pablo José, López, Elsa, Iglesias-Collar, Andrés, Otero, Jesús A., Santos, Jose M., Rodríguez-Calleja

[1]Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, 24071, León.

j.santos@unileon.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La carne de conejo, respecto a otras carnes más consumidas como las de pollo, porcino y vacuno, presenta valores medios más bajos de ácido úrico, grasa, colesterol y poder calórico, y mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, lo que la hace recomendable para una dieta equilibrada. Desde el punto de vista sanitario, la prevalencia de bacterias patógenas parece ser baja, aunque esta carne podría ser vehículo de aeromonas y listerias (Rodríguez-Calleja et al., 2006).

Habitualmente su comercialización se realiza en forma de canales enteras o en cortes, pudiendo presentarse envasadas en atmósferas modificadas con el objetivo de incrementar su vida útil y mejorar su presentación. Sin embargo, cada vez más los consumidores buscan nuevos productos elaborados y más naturales. Estos productos de mayor valor añadido constituyen un nuevo reto para garantizar su inocuidad y la eficacia de los métodos de conservación.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de control de dos cepas potencialmente patógenas de *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes* mediante el envasado con una mezcla gaseosa comercial optimizada para hamburguesas de carne conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas. Las cepas de estudio fueron *Aeromonas hydrophila* (C118) y *Listeria monocytogenes* (L99), aisladas previamente de carne de conejo (Rodríguez-Calleja et al., 2006), y revitalizadas a 30 ºC en caldo TSB con 0,6% de extracto de levadura (Oxoid, Basingstoke, R.U.).

Preparación de las Muestras. Se adquirió carne de conejo de muslos procedentes de canales comerciales, procesada y picada en una pequeña industria de la provincia de León. La carne picada fue mezclada con un 0,5% de sal y dividida en 3 partes: (a) una parte directamente procesada y constituyó el control; (b) otra parte se inoculó con una suspensión de la cepa C118; (c) una alícuota de la suspensión de la cepa L99 se añadió a la última parte de la carne picada de conejo. Cada suspensión bacteriana fue serialmente diluida para rendir una concentración aproximada de $1x10^3$ ufc/g. Se prepararon hamburguesas de aproximadamente 50 g que fueron colocadas en grupos de dos sobre bandejas de poliestireno e introducidas en bolsas Cryovac© BB4L (Cryovac, Barcelona, España). Se utilizó una atmósfera comercial, previamente estudiada y seleccionada como óptima para este tipo de producto, constituida por CO_2 (29%), O_2 (21%) y N_2 (50%). Todas las bandejas fueron almacenados a 4±1 °C.

Toma de muestras y repeticiones de los experimentos. Cada día de muestreo se retiraron dos bandejas (4 hamburguesas) de cada condición y semanalmente se llevaron a cabo los análisis.

Análisis de gases y determinación de pH. Se determinó la composición de CO_2 y O_2 en cada envase (CheckMate 9900, PBI Dansensor, Dinamarca). El pH se midió en homogeneizados de 10 g. Los resultados se calcularon como el valor promedio de 4 mediciones.

Análisis microbiológico. A partir de un homogeneizado 1/5 se llevaron a cabo diluciones decimales. A continuación, se determinó la microbiota total aerobia psicrotrofa, sobre placas de agar PCA (Oxoid), y la contaminación por *Aeromonas* spp., mediante siembra superficial en placas de agar selectivo m-*Aeromonas* (Merck KGaA, Alemania). Los recuentos de *Listeria monocytogenes* se realizaron a partir de alícuotas de 1 ml distribuidas sobre tres placas de agar cromogénico selectivo y diferencial para listeria (Oxoid). Cada una de estas determinaciones se realizó por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH inicial medido en las hamburguesas control de carne de conejo fue de 6,03±0,02 y aumentó significativamente hasta 6,27±0,08 a los 14 días (Tabla 1). Los resultados obtenidos muestran que el nivel de la microbiota natural aumentó progresivamente durante las dos semanas de estudio, hasta incrementarse en cuatro unidades logarítmicas sobre el recuento inicial (día 0). Durante el almacenamiento, ni *Aeromonas* spp. ni *L. monocytogenes* fueron detectadas.

Tabla 1. Parámetros microbiológicos (log ufc/g), pH y gases de envasado (%) en hamburguesas de carne de conejo en atmósfera modificada y almacenadas a 4±1°C.

Tipo de muestra	Día	RAP(1)	*Aeromonas hydrophila*(1)	*Listeria monocytogenes*(1)	pH	O_2	CO_2
Control	0	5,0±0,2	<0,7	<0,4	6,03±0,02	21,4±0,1	27,7±0,3
	7	6,8±0,1	<0,7	<0,4	5,93±0,02	20,0±0,2	23,4±0,2
	14	9,1±0,1	<0,7	<0,4	6,27±0,08	10,2±2,5	32,7±1,3
(2)Inoculadas *A. h.*	0	5,1±0,1	3,1±0,1	n.d.(3)	n.d.	21,4±0,1	27,7±0,3
	7	6,8±0,1	3,9±0,1	n.d.	n.d.	19,6±0,2	23,6±0,4
	14	9,0±0,1	5,3±0,1	n.d.	n.d.	6,7±1,9	33,9±0,1
(2)Inoculadas *L. m.*	0	5,1±0,1	n.d.	3,4±0,2	n.d.	21,4±0,1	27,7±0,3
	7	6,8±0,1	n.d.	4,4±0,5	n.d.	19,3±0,9	24,0±1,2
	14	8,9±0,2	n.d.	5,3±0,1	n.d.	7,9±0,3	34,2±1,1

(1) RAP, *A.h.* y *L.m.;* recuentos de la microbiota aerobia psicrotrofa, *A.hydrophila* y *L.monocytogenes* (log ufc/g).

(2) Muestras inoculadas con una concentración aproximada de 3 log ufc/g de *Aeromonas hydrophila* (*A.h.*, cepa C118) y *Listeria monocytogenes* (*L.m.*, L99) respectivamente.

(3) n.d., no determinado.

Cada dato de la tabla representa el valor promedio ± la desviación estándar de un conjunto de 8 datos.

Cuando las hamburguesas fueron contaminadas con la cepa C118 de *A. hydrophila* (3,13±0,08 log ufc/g), se observó un pequeño incremento en su recuento durante la primera semana de almacenamiento hasta 3,94 log

ufc/g, que prosiguió en mayor medida en la segunda semana (5,34±0,04 log ufc/g). Estos resultados se corresponden con los presentados en otros trabajos para carnes de pH>6 (Doherty et al. 1996; Mano et al. 2000). La multiplicación de esta bacteria parece inhibirse al incrementar la concentración de CO_2, al reducirse la temperatura de conservación y con pH de la carne <6 (García de Fernando et al, 1995; Doherty et al.,1996; Mano et al.,2000).

El efecto bacteriostático de la mezcla gaseosa de envasado no fue suficiente para inhibir la multiplicación de la cepa L99 de *L. monocytogenes*. El incremento semanal de esta bacteria patógena en las hamburguesas inoculadas fue constante, aproximadamente de 1 log ufc/g y semana. Los trabajos sobre la capacidad de multiplicación de *L. monocytogenes* sobre diferentes matrices alimentarias en atmósferas ricas en CO_2 han presentado conclusiones contradictorias. Mientras que algunos investigadores observaron un importante efecto inhibidor cuando la mezcla gaseosa no contenía prácticamente oxígeno (Nissen et al., 2000), otros resultados muestran que esta bacteria era controlada en carne de vacuno, de ovino y de cerdo (García de Fernando et al., 1995). En las hamburguesas de carne de conejo estudiadas, de pH>6 y almacenadas a 4 ºC, la multiplicación de la cepa L99 no fue inhibida. Tanto el pH alto de la carne como la presencia de oxígeno parecen ser factores que pueden explicar esta divergencia.

CONCLUSIONES

El envasado de hamburguesas de carne de conejo en una mezcla gaseosa comercial 29:21:50 (CO_2 /O_2 /N_2), previamente optimizada para aumentar la vida útil conservando sus características organolépticas, no produjo un efecto inhibidor sobre cepas de *A. hydrophila* y *L. monocytogenes*.

La utilización de mezclas de gases de envasado para productos de carne de conejo, con concentraciones similares a la estudiada en este trabajo, implicaría el adecuado control de las condiciones ambientales para evitar o reducir la potencial contaminación inicial por estas bacterias patógenas, impidiendo su multiplicación hasta niveles peligrosos durante su conservación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Doherty, A., Sheridan, J.J., Allen, P., Mcdowell, D.A., Blair, I.S. And Harrington, D. 1996. Survival and growth of *A. hydrophila* on M.A.P. normal and high pH lamb. Int. J. Food Microbiol., 28, 379-392.

García de Fernando, G. D., G. J. E. Nychas, M. W. Peck, and J. A. Ordóñez. 1995. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under M. A. Int. J. Food Microbiol. 28:221-231.

Mano, S. B., J. A. Ordóñez, and G. D. García de Fernando. 2000. Growth/survival of natural flora and *A. hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in M. A. Food Microbiol. 17:657-669.

Nissen, H., O. Alvseike, S. Bredholt, A. Holck, and T. Nesbakken. 2000. Comparison between the growth of *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. Int. J. Food Microbiol. 59:211-220.

Rodríguez-Calleja, J. M., I. García-López, M. L. Garcia-Lopez, J. A. Santos, and A. Otero. 2006. Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. J. Food Prot. 69:1106-1112.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con ayuda de la Junta de Castilla y León (proyecto LE004A08 y contrato de E. I.-C.). Los autores también agradecen la colaboración de la empresa Manga-Martínez S.L.

P145 INCIDENCIA, AISLAMIENTO Y VARIACION DEL GEN *COA* EN ESTAFILOCOCOS EN OVINO LECHERO EN CASTILLA Y LEÓN.

Borja Linage[1], Maria Luisa de Garnica García[1], Verónica Otero Álvarez[1], Jesús Santos[1], Maria Luisa García López[1]

[1]Departamento de higiene y tecnología de los alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071 León.

blina@unileon.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

S. aureus es un microorganismo que produce cuantiosas pérdidas económicas en el mundo de la producción láctea de manera directa e indirecta. En primer lugar por las mamitis clínicas y subclínicas que produce y en segundo lugar por la contaminación en alimentos, que puede dar lugar a la aparición de enfermedades en humanos. Por estos motivos es de gran importancia el evaluar su presencia en la leche y los productos lácteos y controlar su proliferación en los mismos. Nuestro objetivo es estudiar la incidencia y la diversidad genética de *S. aureus*, en muestras de leche de oveja tomadas en explotaciones de ovino lechero de la zona de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de un total de 384 tanques de explotaciones de ovino de aprovechamiento lechero en Castilla y León, así como de 6 silos de recogida de leche.

El recuento y aislamiento de colonias sospechosas se realizó en los medios sólidos agar columbia con 5% de sangre de cordero (1) y medio selectivo BP-RPF, (1)

Los microorganismos aislados se caracterizaron fenotípicamente mediante la realización de las siguientes pruebas:

- Tipo de hemólisis (alfa, beta, delta y combinaciones de ellas) (1, 4)
- Diferentes pruebas relacionadas con la producción de coagulasa: Presencia o ausencia de halo de coagulación en un medio específico de crecimiento (BP- RPF) (1), capacidad de coagulación de plasma (1), capacidad de aglutinación de látex (1)
- Producción de DNAsa termostable (2)

- Metabolización de la maltosa (1)
- Producción de catalasa (1 y 3)

Asimismo, a un número seleccionado de cepas se les realizó la prueba de la ß-galactosidasa y la oxidasa.
Para la identificación se utilizaron galerías ID32 Staph, específicas del género *Staphylococcus*.
La amplificación del gen *coa* se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la bibliografía (5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 384 explotaciones, 60 (15,63 %) fueron positivas para la presencia de estafilococos, aislándose 109 cepas de presuntos *S. aureus*. Por otra parte, todos los silos fueron positivos, aislándose 44 cepas más.
Tras la caracterización fenotípica y la identificación mediante galerías de las 153 cepas analizadas, 145 se identificaron positivamente como *S.aureus* (94.77%), de las cuales, 2 obtuvieron un porcentaje inferior al 90% (1.31%), 4 se identificaron como *S. hominis* con un porcentaje superior al 70% (2.61%), 1 se identificó como *S. epidermidis* con un porcentaje del 99.1% (0.65%) y 3 de ellas (1.96%) no pudieron ser adscritas a especie de forma satisfactoria, ya que mostraban características intermedias. Solamente dos cepas eran negativas para la producción de coagulasa. Es también destacable que todas las cepas a las que se les realizó la prueba de la β-galactosidasa dieron un resultado negativo, mientras que en las galerías ID32 Staph el resultado para esta misma prueba fue positivo.
A un total de 88 cepas, incluyendo todas las de identificación dudosa, se les realizó la amplificación del gen de la coagulasa. Este gen presenta polimorfismo en la región 3´ por lo que se pueden obtener diferentes tamaños en los productos de la PCR (875 ±10 pb, n=2), (660 ±20 pb, n=10), (603 ± 20 pb, n= 10), (547 ± 15 pb, n=10) (5). El resultado fue positivo en todos los casos, incluso en aquellos aislamientos que no presentaban actividad coagulasa en las pruebas fenotípicas. Los productos amplificados procedentes de los diferentes grupos obtenidos se digirieron con *Cfo*I y se analizaron por electroforesis. El análisis de restricción indicó que existía variación en los polimorfismos ya que que algunas cepas con similar tamaño de amplicón, mostraban patrones de digestión diferentes.

CONCLUSIONES

La prevalencia de estafilococos coagulasa positivos en las explotaciones estudiadas es más baja que la obtenida en otros estudios similares, que está en torno al 30% (6). La especie más frecuente es *S. aureus* y la identificación mediante galerías comerciales ofrece, en general, resultados satisfactorios.
Los aislamientos estudiados presentan polimorfismos en el gen *coa*, que sugieren un grado elevado de diversidad genética; para comprobar este dato, se están llevando a cabo estudios adicionales de tipificación genética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) P. J. Quinn, M. E. Carter, B. Markey, G. R. Carter. Clinical Veterinary Microbiology. Ed Mosby. 1994.
(2) R. V. Lachica, C. Genigeorgis y P. D. Hoeprich. Metachromatic agar-diffusion method for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol. , 21:585-587. 1971.
(3)B. Lanyi. Classical and Rapid Identification Methods for Medically Important Bacteria. Tomado del Methods in Microbiology, B. Eds R. R. Colwell and R. Grigova. Vol 19 Academic Press. 1987.
(4)S. O. Elek, y E. Levy. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. J. Pathol. Bact., 62, 541-554. 1950.
(5)J. V. Hookey, et al. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Based on PCR Restriction Fragment Length Polymorfism and DNA Sequence Analysis of the Coagulse Gene. Journal of Clinical Microbiology, Apr. p. 1083-1089. 1997.
(6)J. E. Muehlherr, C. Zweifel, S. Corti, J. E. Blanco, R. Stephan. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. J Dairy Sci. Dec;86(12):3849-56. 2003

P146 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *AEROMONAS* SPP. DE MUESTRAS DE PESCADO DE VENTA PARA EL CONSUMO

Patricia González-Huerta, Elsa Iglesias-Collar, Mª Luisa García-López, Jesús Santos*
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 47777, León.
** pgonh@unileon.es*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El genero *Aeromonas* comprende bacterias Gram-negativas, ubicuas en ambientes acuáticos y aisladas frecuentemente de alimentos y agua, tanto continental como salada. Está implicado como agente causante de diarrea y puede dar lugar a septicemias.
Aunque originalmente se incluyó en la familia *Vibrionaceae*, se determinó que no estaba íntimamente relacionado, y se formo una nueva familia, *Aeromonadaceae*. Actualmente se reconoce la existencia de, al menos 24 especies diferentes del genero *Aeromonas*. Una de las mayores dificultades para su identificación es la escasez de datos fenotípicos coherentes para distinguir unos grupos de otros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 69 cepas fueron estudiadas, procedentes de muestras de pescados de acuicultura o producción en régimen cerrado, de venta directa al consumidor, de las especies *Dicentrarchus labrax* (Lubina) y *Sparus aurata* (Dorada), presentados como ejemplares enteros, y *Pangasius hypophthalmus* (Panga) y *Lates niloticus* (Perca del Nilo), como fileteados. El aislamiento se llevo a cabo en el medio SAA (Starch Ampicillin Agar).

A las colonias resistentes a la ampicilina y amilolíticas, se les realizaron las siguientes pruebas: tinción por el método de Gram, reacción de la oxidasa y la catalasa, producción de ácido y gas a partir de la glucosa, producción de H_2S, producción de indol a partir del triptofano y movilidad de la cepa en el medio SIM, licuefacción de la gelatina y fermentación del manitol en el medio IGD, resistencia al O/129 y actividad sobre los aminoácidos arginina, lisina y ornitina, además de la capacidad hemolítica de las cepas. Todas las pruebas se llevaron a cabo a 30°C, y los resultados fueron observados entre 24 horas y 7 días dependiendo del análisis.

Respecto a los factores de virulencia, se llevo a cabo la amplificación por PCR de 5 genes que codifican dos toxinas hemolíticas: aerolisina (*AerA*) y hemolisina (*HlyA*), dos enterotoxinas: termolabil (*alt*) y termoestable (*ast*), y el flagelo lateral (*laf*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación del género *Aeromonas*, así como aquellas para la identificación de especie se agrupan en la Tabla 1.

Mediante los resultados obtenidos en la descarboxilación de Møeller y utilizando los esquemas de Abbot y col. (1), respecto al total de las cepas, se ha encontrado que un 57,9% de las cepas pertenecen al grupo 2 (donde se encuadra *Aeromonas hydrophila*), un 31,9% al grupo 4 (grupo de *A. bestiarum*/*A. caviae*) y un 10,2% al grupo 2 con ODC+ (*A. veronii veronii* y *A. allosaccharophila*).

Respecto a los genes estudiados, se ha determinado que un 4,3% de las cepas presentan el gen *AerA*, un 79,7% el *HlyA*, un 84,1% el *alt,* un 5,8% el *ast* y solo 1 de las 69 cepas estudiadas el *laf*.

Tabla 1. Porcentaje de las cepas que presentan el rasgo esperado para el género *Aeromonas*, indicado entre paréntesis tras el nombre de cada prueba bioquímica (en el caso de que sea variable, se indica el porcentaje de positivos)

Prueba		% de las cepas que presentan el rasgo			
		Dorada (n=15)	Lubina (n=15)	Panga (n=23)	Perca (n=16)
Tincion de Gram (-)		100	100	100	100
M/O (bacilos cortos)		93,3	100	100	100
Resistencia a la ampicilina		100	100	100	100
Degradación del almidón (+)		93,3	93,3	88,0	87,5
Oxidasa (+)		100	100	100	100
Catalasa (+)		100	100	100	100
Glucosa	Producción de acido (+)	100	100	100	100
	Oxidación (+)	100	100	100	100
	Fermentación (+)	100	100	100	100
	Producción de gas (V)	66,7	60,0	73,9	81,3
Producción de sulfurico (-)		100	100	100	75,0
Producción de indol (V)		73,3	40,0	52,2	37,5
Movilidad (+)		86,7	93,3	91,3	100
Amino-ácidos	Arginina (+)	100	100	100	100
	Lisina (V)	73,3	86,7	73,9	100
	Ornitina (V)	13,3	6,7	4,3	18,6
Licuefacción de la gelatina (+)		100	100	95,7	93,8
Fermentación Inositol (-)		0	0	0	0
Fermentación Manitol (+)		100	100	100	100
Resistencia O/129 (+)		100	100	100	100
Hemólisis (V)		80,0	73,3	78,3	81,3

CONCLUSIONES

El aislamiento de especies del genero *Aeromonas*, mediante la utilización de medios selectivos y diferenciales, es sencillo, así como su adscripción a grupos fenotípicos. Sin embargo, la determinación de la especie es más compleja. Con las pruebas realizadas se puede concluir que las cepas estudiadas se encuadran en grupos frecuentemente aislados de alimentos y que también participan en la producción de enfermedades en humanos.

La mayoría de las cepas presenta algún gen relacionado con la patogenicidad de este microorganismo, aunque la sola presencia de estos genes no implica que sea capaz de producir enfermedad en humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J Clin Microbiol 41(6):2348-2357

(2) Aguilera-Arreola MG, Hernandez-Rodriguez C, Zuñiga G, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G (2005) *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. FEMS Microbiol Lett 245: 231-240

(3) Heuzenroeder MW, Wong CYF, Flower RLP (1999) Distribution of two haemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. Microbiol Lett 174:131-136

(4) Pablos M, Rodriguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez M-L (2009) Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. Int J. Food Technol 135: 158-164

(5) Sen K, Rodgers M (2004) Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. J Appl Microbiol 97: 1077-1086

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Junta de Castilla y León la financiación recibida a través de contratos de formación de investigadores (P. G-H y E. I-C) y ayudas a los grupos de excelencia (GR155).

P152 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN FÚNGICA DE JAMONES IBÉRICOS DE LA D.O.P. "VALLE DE LOS PEDROCHES"

Josué Delgado, Miguel Ángel Asensio, María Isabel Luque, Elena Bermúdez y Félix Núñez
Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda. Universidad, s/n, 10003, Cáceres
jdelgadogd@alumnos.unex.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Durante el procesado tradicional del jamón curado D.O.P. Valle de los Pedroches se desarrolla una población fúngica que puede tener una influencia positiva sobre la maduración por su efecto en el desarrollo del aroma. Sin embargo, estos mohos pueden producir micotoxinas. Como consecuencia, debe controlarse el proceso para evitar el desarrollo de los mohos indeseables, favoreciendo la actividad de aquellos con efectos positivos. Una solución es la utilización de cultivos iniciadores que desplacen a los mohos indeseables. No obstante, la implantación de cepas no toxigénicas puede verse limitada por la evolución de las condiciones ambientales durante la maduración, por lo que deben seleccionarse cepas adaptadas al procesado. Además, para conservar las características de calidad distintivas de la D.O.P. es necesario seleccionar mohos procedentes de esta indicación protegida. Tanto para evaluar la contribución de los mohos presentes en los jamones como para obtener cultivos protectores debe caracterizarse la población fúngica presente en industrias de esa D.O.P.

El objetivo del trabajo es estudiar la implantación y composición de la población fúngica de jamones ibéricos de la D.O.P. Valle de los Pedroches durante su maduración en diferentes industrias.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en cuatro industrias de jamón ibérico de la D.O.P. Valle de los Pedroches. En cada secadero se tomaron muestras de la superficie de 20 jamones en la etapa de maduración en bodega. Para ello, en cada jamón se delimitó un área de 100 cm^2, de la que se obtuvo un raspado. Tras realizar diluciones decimales, las muestras se inocularon en Diclorán Glicerol al 18% (DG18) y Agar Extracto de Carne con 5% de Na Cl (AECS) y se incubaron durante 5 días a 25ºC. Tras el recuento de las colonias se aislaron e identificaron 5 colonias por placa siguiendo la metodología descrita por Pitt y Hocking (1987). Los aislados clasificados como *Penicillium* se cultivaron en Agar Creatina Sacarosa (CSN, Pitt, 1993) para su diferenciación a nivel de especie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los recuentos de mohos y de levaduras fueron más elevados en la industria B (Figura 1). Los valores menores se encontraron en el secadero A para los mohos y en el D para las levaduras. No hubo diferencias entre los recuentos de ambos grupos excepto en la D, donde los mohos fueron el grupo mayoritario. Por otra parte, puede observarse que en general la recuperación de mohos es mejor en el medio DG18, especialmente cuando los recuentos son menores. Por el contrario el medio AEC permite una mejor recuperación de levaduras.

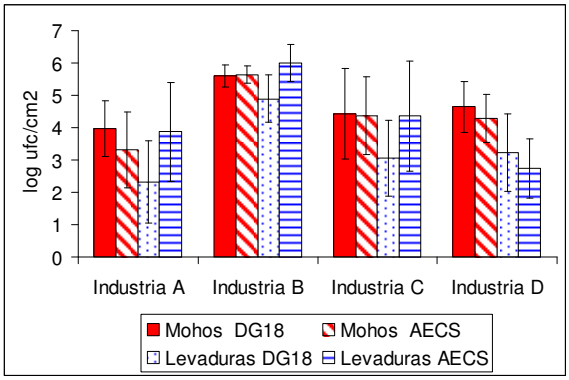


Figura 1. Recuentos de mohos y levaduras de cuatro industrias elaboradoras de jamón ibérico D.O.P. Valle de los Pedroches.

Se obtuvo gran diversidad de especies, especialmente del género *Penicillium* (Tabla 1). La mayoría de ellas se aislaron en las cuatro industrias, aunque en cada una el perfil de la población fue distinto y se observó una especie mayoritaria diferente, *P. griseofulvum* en A, *P. nalgiovense* en B, *P. nalgiovense* y *P. verrucosum* en C y *P. commune* en D. Además, en los secaderos con menores recuentos medios (A y C) la dispersión fue mayor, sin un predominio claro de ninguna especie, y detectándose *Aspergillus* y *Eurotium*. En cambio, en las otras dos factorías hubo mayor diferencia entre la frecuencia de las mayoritarias y el resto: *P. nalgiovense* en B representó más del 30% de los aislados y *P. commune* en D casi la cuarta parte. Dado que la mayor parte de las especies se aíslan en todos los secaderos, pero que su abundancia relativa es heterogénea, es probable que las diferencias observadas sean debidas a las condiciones ambientales que se alcanzan en cada uno de ellos.

Las especies detectadas forman parte de la población habitual del jamón, y algunas de ellas pueden contribuir positivamente a la maduración de este producto (Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2006), ayudando a prevenir la colonización por parte de mohos toxigénicos. En estudios posteriores para la selección como cultivos iniciadores se debe descartar la producción de micotoxinas y evaluar las actividades enzimáticas de interés.

Tabla 1. Frecuencia (% sobre el total de aislados) de los mohos identificados en jamones de las cuatro industrias. El dato correspondiente a la frecuencia de la especie más abundante en cada secadero aparece sombreado.

	Industria			
Especie	A	B	C	D
Penicillium aurantiogriseum	4,3	-	5,6	17,2
P. brevicompactum	2,2	2,5	7,0	3,4
P. chrysogenum	8,7	-	1,4	-
P. citrinum	2,2	2,5	-	6,9
P. commune	10,9	18,5	8,5	24,1
P. echinulatum	-	1,2	-	-
P. griseofulvum	15,2	3,7	2,8	-
P. nalgiovense	8,7	30,9	15,5	20,7
P. olsonii	-	4,9	-	-
P. solitum	4,3	2,5	5,6	3,4
P. verrucosum	13,0	16,0	15,5	17,2
P. viridicatum	6,5	4,9	2,8	3,4
Penicillium sp.	6,5	11,1	18,3	3,4
Aspergillus spp.	13,0	-	2,8	-
Eurotium spp.	4,3	-	14,1	-
Aureobasidium pullulans	-	1,2	-	-

CONCLUSIONES

Los mohos que colonizan la superficie de los jamones ibéricos de la D.O.P. Valle de los Pedroches pertenecen mayoritariamente al género *Penicillium*.

Las especies detectadas se relacionan positivamente con el desarrollo de características sensoriales deseables en este tipo de productos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Martín A, J.J. Córdoba, E. Aranda, M.G. Córdoba, M.A. Asensio (2006). Int. J. Food Microbiol. 110, 8–18.
Rodríguez, M., F. Núñez, J.J. Córdoba, M.E. Bermúdez, M.A. Asensio (1998) J. Appl. Microbiol. 85, 905-912.
Pitt, J.I. (1993). J. Appl. Microbiol. 75: 559-563.
Pitt, J.I. y A.D Hocking (1997). Fungi and food spoilage. Blackie Academic and Professional. Londres.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el CDTI (Ref. IDI-20091171, IDI-20091172, IDI-20091174, IDI-20091176) y se ha realizado con la colaboración del CICAP y las empresas COVAP, Embutidos Camilo Ríos S.L., Hermanos Rodríguez Barbancho S.L, e IBESA.

P155 ANALISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA FASE DE LATENCIA TRAS DIFERENTES TRATAMIENTOS CONSERVANTES

Aguirre J., Rodríguez M. y García de Fernando G.
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense.
juaguirr@vet.ucm.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fase de latencia se define como el tiempo que tarda una célula o una población en iniciar la multiplicación. Este periodo no es idéntico para cada célula de una población, incluso aunque sean de la misma especie o cepa. Estas diferencias se magnifican en el caso de células estresadas, supervivientes a algún tratamiento conservante[1]. Además, está demostrado que la inactivación de una población no es constante, está sujeta a una cierta variabilidad, proporcional al grado de la inactivación. Cuanto mayor grado de inactivación se alcanza, ésta resulta más variable[2]. Por otra parte, unas células se reparan antes y otras después, probablemente porque unas estarán más dañadas que otras, por lo que unas inician su multiplicación antes y otras después[3,4]. La variabilidad inherente a la inactivación y a la fase de latencia de las células supervivientes a cualquier proceso nos obligan a considerar que el resultado de un tratamiento conservante y el tiempo que pueden tardar los microorganismos supervivientes en alcanzar una tasa concreta van a ser variables[5,6], y que, claro está, tal variabilidad va a afectar a la vida útil del producto en cuestión. Tal variabilidad toma especial relevancia en los alimentos mínimamente procesados, donde el riesgo de supervivencia microbiana es mayor que en los tratados de forma más convencional.

Objetivo: Analizar la variabilidad de las fases de latencia de células individualizadas tras dos tratamientos conservantes, calor e irradiación mediante electrones acelerados, y compararlas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con *S. enterica* serovar Enteritidis (CECT 4300).

Se aplicaron diferentes tratamientos térmicos y de irradiación con el fin de inactivar una proporción determinada de la población (entre 0 y 5 reducciones decimales). A continuación, la muestra tratada se diluyó en caldo de soja tripticasa hasta lograr (teóricamente) 1 célula en 300 µl, cantidad que se depositó en cada uno de los 100 pocillos de la primera microplaca del equipo Bioscreen C (Thermolabsystems). En los pocillos de la segunda microplaca se depositaron 300 µl de una dilución decimal de la muestra empleada para la primera para tener más garantías de que en una de las placas hubiera un porcentaje significativo de pocillos sin células y otro que contuviera sólo una célula.

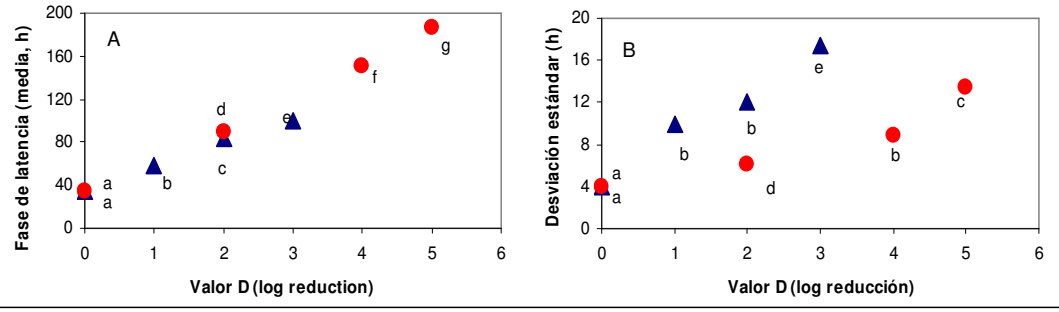


Figura 1. Efecto del tratamiento conservante en la media (A) y la desviación estándar de las distribuciones de las fases de latencia de las células individualizadas de *Salmonella* Enteritidis en TSB a 16ºC tras diferentes tratamientos térmicos (triángulos) y de irradiación (círculos). Diferentes letras en los puntos indican diferencias significativas

El Bioscreen C mide la absorbancia desarrollada en cada pocillo durante un tiempo preestablecido a una temperatura controlada, en este caso 16ºC, lo que permite obtener 200 curvas de crecimiento a la vez. Se midió el tiempo necesario para que la multiplicación de una única célula genere una población cuya turbidez alcance un nivel arbitrario (0,2 UA). Sabiendo el tiempo de duplicación de la cepa en las condiciones experimentales, se calculó la fase de latencia de la célula que generó la población. Los resultados (fases de latencia) se analizaron estadísticamente con el programa VariFit, donado por el Computational Microbiology Group of the Institute of Foof Research (Norwich, Reino Unido), mediante un ajuste de los datos a distribuciones gamma. La variabilidad se cuantificó en términos de la desviación estándar de las distribuciones y estas desviaciones se compararon con el test de Bartlett.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras no tratadas (0D) siempre mostraron una menor variabilidad que las tratadas. Cuanto más severo fue el tratamiento, más largas fueron las fases de latencia y más variables (figura 1).

El test de Bartlett (figura 2) mostró que la variabilidad de la fase de latencia fue significativamente menor en las muestras control que en todas las tratadas. En todos los casos, la desviación estándar de la fase de latencia fue significativamente diferente para todos los tratamientos estudiados. Los resultados mostraron que la distribución de las fases de latencia de las células supervivientes dependía de la severidad del tratamiento aplicado, siendo las fases de latencia de las células irradiadas un poco más largas que las de las tratadas por calor, pero sin diferencias notables. No obstante, las desviaciones estándar de las primeras siempre fueron menores que las de las distribuciones de las fases de latencia de las células tratadas térmicamente, para un nivel de destrucción microbiana similar. Esto parece indicar la existencia de diferentes subpoblaciones caracterizadas por resistencias diferentes, que irían inactivándose conforme se incrementa la intensidad de los procesos microbicidas, de acuerdo con lo sugerido por Aguirre y col. (2009)[2].

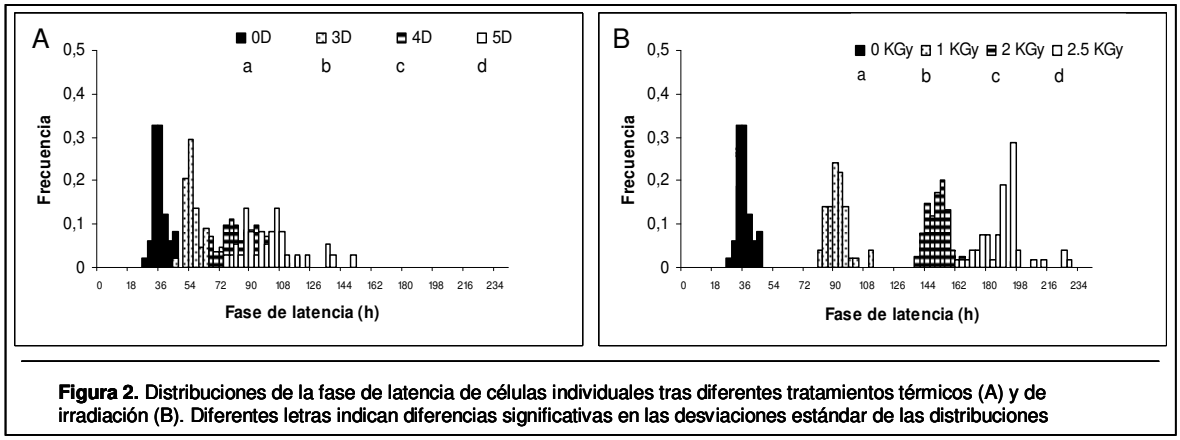


Figura 2. Distribuciones de la fase de latencia de células individuales tras diferentes tratamientos térmicos (A) y de irradiación (B). Diferentes letras indican diferencias significativas en las desviaciones estándar de las distribuciones

CONCLUSIONES.

Las fases de latencia de las células supervivientes a tratamientos conservantes se alargan de forma proporcional al efecto microbicida del proceso de conservación aplicado. Por lo que, cuantos menos supervivientes queden en un alimento, más larga será su fase de latencia. La variabilidad de la fase de latencia de las células supervivientes aumenta conforme el tratamiento conservante aplicado se hace más severo. Este aumento de la variabilidad es más notable en el caso de tratamientos térmicos, a pesar de que las fases de latencia (medias) de las células irradiadas sean similares o incluso algo más prolongadas que las de las células tratadas térmicamente, lo que indica que la

irradiación provoca más daños en las células que se mantienen viables que los tratamientos térmicos, pero que los daños térmicos son más variables que los provocados por la irradiación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.
1. Pin C, Baranyi J. (2008). Single-cell and population lag times as a function of cell age. Appl. Environ. Microbiol., *74*: 2534-6.
2. Aguirre JS, Pin C, Rodríguez MR García de Fernando GD. (2009). Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. Appl. Environ. Microbiol, *75*: 6992-7
3. Baranyi J. (1998) Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. J. Theor. Biol., *192*: 403-8.
4. D'Arrigo M, Garcia de Fernando GD, Velasco R, Ordóñez JA, George SM, Pin C. (2006). Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. Appl. Environ. Microbiol., *72*, 2533-8.
5. Metris A, George SM, Baranyi J. (2006). Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. Appl. Environ. Microbiol., *72*, 6674-9.
6. Nauta MJ. (2000) Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. Int. J. Food Microbiol., *57*: 9-18.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo se ha llevado a cabo gracias al Ministerio de Ciencia y Tecnología, proyecto Consolider Carnisenusa, CSD2007-0016.

P157 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* EN AMÍGDALAS DE CERDO

Ana Mª Sánchez Cánovas[1], Mª de los Ángeles Castaño Garrido[1], Gracia Martínez Reina[1], Ana Maria Vivas Gil[1], Mª Luz Abad Bolarín[1], Mª Inés Villa López[2] y Mercedes López Cascales[2]
[1] Laboratorio de Microbiología, Consejería de Sanidad y Consumo. Ronda de Levante 11, 30008, Murcia.
ana.sanchez@carm.es
[2] Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis, Consejería de Sanidad y Consumo. Ronda de Levante 11, 30008, Murcia

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Yersinia enterocolitica es una de las tres especies del género *Yersinia* identificadas como patógenas para el hombre. El cuadro más comúnmente originado es la enterocolitis, principalmente en niños menores de 5 años, que tras 24-36 horas de incubación cursa con dolor abdominal agudo, fiebre, cefalea, diarrea, malestar, vómitos, náuseas y escalofrios. Las infecciones por *Yersinia enterocolitica*, a diferencia de las producidas por otras bacterias entéricas, son más frecuentes durante el otoño y los meses de invierno.

Yersinia enterocolítica es una enterobacteria, Gram negativa, no esporulada, capaz de crecer dentro de una amplia escala de temperaturas, desde -1ºC hasta +40ºC. Se multiplica en las mucosas y se puede transmitir a través del contacto con los animales, ingestión de productos alimenticios ó aguas contaminadas. Se puede aislar de distintas procedencias ambientales (suelo, agua dulce, tracto intestinal, animales), siendo el cerdo el reservorio más importante de las cepas patógenas para el hombre. Se ha aislado frecuentemente en amígdalas, lengua, mucosa oral, ganglios linfáticos mesentéricos, intestino y heces de animales aparentemente sanos. También se ha encontrado en numerosos alimentos: leche y productos lácteos, carne (sobre todo cerdo), canales de ave de corral, pescado, marisco, frutas y hortalizas.

La Agencia Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) ha publicado varios informes desde 2007 relativos a *Yersinia enterocolitica* en los que recomienda realizar su investigación a nivel nacional en los mataderos de cerdos (principal lugar donde se produce la contaminación de la carne de cerdo con *Yersinia enterocolítica*), con el fin de conocer la prevalencia de la enfermedad en cada país, en un punto de la cadena alimentaria que es relevante para la Salud Pública.

En base a todo esto, el objetivo del trabajo ha sido determinar la prevalencia de *Y. enterocolítica* en canales de porcino de la Región de Murcia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se procedió a la toma de 35 muestras de tejido linfoide de orofaríngе (amígdalas) de 72 cerdos aparentemente sanos para determinar la prevalencia de *Yersinia enterocolítica* en los cerdos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

El material objeto de análisis fue tomado del despojo rojo, previamente al acondicionamiento y refrigeración del mismo, seleccionando el tejido linfoide menos susceptible de contaminarse durante el faenado.

Los porcinos procedían de 5 explotaciones diferentes y fueron sacrificados en 3 mataderos de la Región durante los meses de febrero a mayo.

Cada muestra analizada procedía de 2 animales de la misma partida y explotación, excepto 6 muestras que recogían tejido linfoide de 3 animales del mismo origen debido a la insuficiencia de tejido para el aislamiento.

Se han analizado las muestras según la UNE-EN ISO 10273: 2003 "Método horizontal para la detección de *Yersinia enterocolítica* patógena presuntiva".

Suspensión madre: 10 gr de muestra de amígdalas en 90 ml de Caldo peptona, sorbitol y sales biliares (Caldo PSB). Incubación 5 días, sin agitación, a 22ºC ± 1ºC. A continuación se siembra, con asa de cultivo, la superficie de una placa de Agar selectivo para Yersinia (Agar CIN). Incubación durante 24-48h a 30ºC ± 1ºC. Las colonias de *Yersinia enterocolítica* en el Agar CIN son de color rosa oscuro al rojo o bien incoloras con centro coloreado. La confirmación se hizo con Api 20E.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La realización de la técnica de análisis ha resultado muy complicada, puesto que el medio selectivo (agar CIN) empleado no es tan selectivo como sería de esperar. Todas las muestras analizadas produjeron crecimiento de colonias en las placas de agar CIN que se ajustaban a la descripción hecha para *Yersinia* según la norma ISO, pero sólo pudimos confirmar *Yersinia* en una de las 35 muestras analizadas (2,85%). A su vez, hay que destacar que colonias similiares morfológicamente dieron como resultado diferentes microorganismos.

Las placas de agar CIN aparecían contaminadas con gran cantidad de microorganismos distintos de *Yersinia*, sobretodo enterobacterias, aunque también aparecían otros tipos de bacterias (por ejemplo bacilos gram negativos anaerobios facultativos, como *Aeromonas* y *Pasteurella*) aunque en proporción más baja.

Después de realizar numerosos APIs (galerías de pruebas bioquímicas) a los distintos tipos de colonias sospechosas encontradas en las placas de agar CIN, los microorganismos aislados han sido principalmente: *Morganella, Citrobacter*, y *Enterobacter*, También se han encontrado, en menor proporción, *Pantoea*, *Serratia*, *Proteus* y *Providencia*.

Yersinia enterocolitica se ha subdividido en 50 serotipos. En cerdos, los serotipos que con mayor frecuencia están implicados en infecciones humanas son: O:3, O:5,27, O:8, O:9. La cepa de *Yersinia* que hemos aislado en nuestro laboratorio se ha enviado a tipificar al Centro Nacional de MIcrobiología. En Europa, Canadá, Japón y Sudáfrica predominan los serotipos O:3 y O:9, mientras que en Norteamérica es el O:8. En España las Yersinias declaradas al Sistema de Información Microbiológica (SIM) durante el 2009 procedentes de 11 Comunidades Autónomas, han sido mayoritariamente del serotipo O:3.

Yersinia enterocolitica es responsable de una considerable morbilidad en las regiones frías de Europa y Norteamérica. Además, en ciertas zonas de Alemania occidental y Canadá la incidencia de enteritis por *Y. enterocolitica* es comparable a la de *Salmonella*.

La muestra que dio positiva fue tomada durante el mes de marzo, con temperaturas medias de 12ºC. Este hecho coincide con lo referido por diversos autores como Fukushima *et al.*, Fredrikson-Ahomma, Ortiz *et al.*, quienes indican que el germen se aísla más en invierno, cuando la prevalencia del patógeno es baja en la explotación porcina de muestreo. Los estudios epidemiológicos en humanos también reflejan una marcada estacionalidad del germen, con mayor afluencia de casos durante los meses de invierno (Verhaegen, J. *et al*). Es posible, por tanto, que si el estudio lo hubiéramos realizado en invierno se hubieran obtenido más aislamientos.

CONCLUSIONES

Hemos encontrado una gran dificultad en el aislamiento de *Yersinia enterocolitica* ya que las amigdalas son zonas del cerdo altamente contaminadas por otras enterobacterias y en los medios actualmente existentes para *Yersinia* crecen con colonias similares. Sería conveniente que se desarrollaran medios de cultivo más selectivos para *Yersinia* que no permitieran el crecimiento de la flora acompañante o que, en todo caso, diferenciaran *Yersinia* del resto de enterobacterias.

Por otra parte, dado que *Yersinia enterocolitica* crece preferentemente en ambientes fríos y la incidencia mayor se encuentra en los meses de invierno, sería conveniente repetir el estudio de prevalencia en dichos meses para contrastar si en nuestra Comunidad Autónoma este factor es relevante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Academia Dissertation, Helsinki.
Fredriksson-Ahomma, M. (2001). Molecular epidemiology of *yad*A-positive *Yersinia enterocolitica*. Fukushima, H. *et al.* (1983). Veterinary Microbiology, 8 (5), 469-483.
EFSA Journal. http://www.efsa.europa.eu
Ortiz Martínez, P. *et al.* (2009). Foodborne Pathogens and Disease, 6 (6): 719-724.
Sistemática bacteriana. 3ª edición (1992). J. Hernández Haba y F. Dubón Pérez.
UNE-EN ISO 10273. Método horizontal para la detección de *Yersinia enterocolitica* patógena presuntiva.
Verhaegen, J. *et al.* (1998). Clinical Infections Diseases, 27: 59-64.

P161 PROYECTO DE PREREQUISITOS HACCP EN LA EMPRESA ALIMENTARIA CASO DE ESTUDIO: PLANTA DE CHOCOLATE

Reyes García A, Peña Terrazas E, Becerril Estrada J L.
Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos Campus El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, CP 50014.
ali_reyes@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

En los últimos años en México las empresas alimentarias pequeñas y medianas han evolucionado en la implantación de sistemas de seguridad alimentaria. La elección de la normativa que define los requisitos legales a cumplir es la primera decisión a tomar, adicionalmente es necesario considerar los requisitos que el mercado comercial de la empresa le impone, adoptar estos requisitos en su producción diaria adoptando un ciclo de mejora continua y sin dejar de lado los requisitos para satisfacer al consumidor.

La secuencia de acciones que las empresas siguen generalmente se da de la siguiente manera: en primer lugar la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura, la implantación de Programas Prerrequisitos para HACCP y la

implantación del Sistema HACCP. Solo las grandes empresas acceden a la implantación de la norma ISO 22000, algunos ejemplos en México son: Nestlé México, Grupo Lala, Unilever, Grupo Peñafiel entre otros.
Las pequeñas y medianas empresas optan por llegar hasta la implantación del sistema HACCP, como es el caso que de la empresa objeto de este trabajo.

OBJETIVO

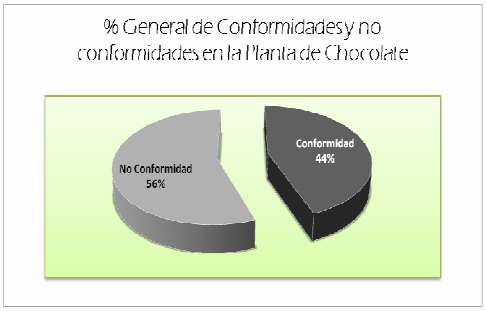
Definir los prerrequisitos HACCP aplicables a la elaboración de chocolate, evaluar y detectar las áreas de oportunidad en la planta de producción mediante una lista de verificación de prerrequisitos HACCP basada en normas y manuales de calidad nacional e internacional (NOM, CODEX, FAO, AIB) y diseñar un manual de prerrequisitos HACCP que facilitaría la implementación en los procesos.

METODOLOGÍA

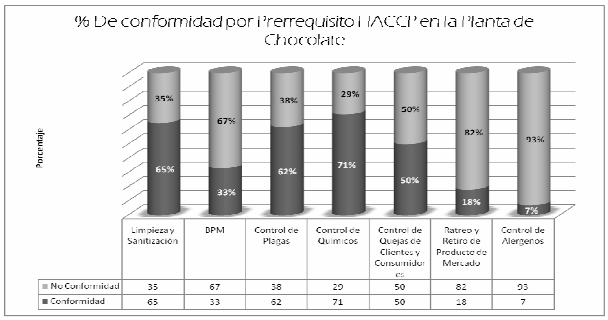
Para la implementación del Sistema HACCP es necesario cumplir con los prerrequisitos HACCP; la empresa determinó cuantos prerrequisitos deseaba tener, Se siguieron las siguientes etapas: Determinación del objeto de estudio, Revisión de fuentes de consulta, Definición de los prerrequisitos HACCP aplicables en la planta de chocolate, Realización de la auditoria diagnóstico, Presentación de resultados de la auditoria diagnóstico, Atención de no conformidades y Elaboración del manual de prerrequisitos HACCP para la planta de chocolate.

RESULTADOS

Se delimitaron dos líneas de producción para aplicación del proyecto de prerrequisitos. La revisión de normas nacionales e internacionales (NOM, CODEX, FAO, AIB) permitió definir los 7 prerrequisitos: Programa de limpieza y Sanitización, Programa de Buenas Prácticas de Manufactura, Programa de Control de Plagas, Programa de Control de Químicos, Programa de Control de Quejas de Clientes y Consumidores, Programa de Rastreo y Retiro de Producto del Mercado y finalmente, Programa de Control de Alérgenos que se implementarían en la empresa.
La información consultada permitió elaborar la lista de verificación que se aplicaría en la auditoria diagnóstico; las áreas auditadas fueron: almacén de materias primas y producto terminado; aduana; servicios; personal; sistema para la gestión integral; mantenimiento para la higiene y sanidad industrial; calidad y finalmente producción; para optimizar el tiempo y tener una mejor visualización de las áreas, se realizo un cronograma, se tomó como referencia las horas de producción, los cambios de turno, la línea de producción, las paradas por mantenimiento, entre otros.



Gráfica 1: Porcentaje de conformidades 44% y No conformidades 56%, obtenidas de la auditoría diagnóstico en la planta de chocolate.



Gráfica 2: Porcentaje de Conformidades y No Conformidades por Prerrequisito HACCP obtenidos de la auditoría diagnóstico en la Planta de Chocolate.

Se atendieron en primer lugar las no conformidades para los programas con mayor porcentaje de no conformidades: Programa de alérgenos, 91%, Rastreo y retiro de producto del mercado, 82% y Buenas prácticas de manufactura, 67%. Finalmente se elaboro el manual de prerrequisitos para HACCP, incluyendo las actividades concretas y se mencionó a los responsables, la frecuencia, las áreas donde se realizarían y sobre todo la metodología para llevar a cabo cada una de las actividades.

CONCLUSIONES

Con la ayuda de la lista de prerrequisitos se logró la identificación de las áreas de oportunidad específicas para cada sector de la planta. La empresa llevo a cabo actividades para atender las no conformidades.
El manual de prerrequisitos HACCP fue una herramienta fundamental para facilitar la consulta de información y lograr una capacitación a todo el personal de la planta.
Con la implementación de los prerrequisitos para el Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos de Control Críticos (HACCP) la empresa podrá iniciar la implementación del Sistema HACCP y demostrar su capacidad para ajustarse a las normas nacionales e internacionales en materia de calidad e inocuidad de los alimentos y a corto plazo utilizar este cumplimiento como herramienta de marketing para mejorar el posicionamiento de la empresa fabricante de chocolates en el mercado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIB, (2009), Guía de AIB International para el Desarrollo de las BPMs y los Programas de Prerrequisito. AIB internacional.
CODEX, (2009). Higiene de los Alimentos. Cuarta edición. OMS/FAO. Roma 2009

Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos CIEMA (1991) El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos: Su Aplicación a las Industrias de Alimentos, ACRIBIA, Zaragoza.
FAO, (2002) Sistemas de Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Manual de capacitación, OMS, Roma, Italia, p 110-118
NOM-120-SSA1-1994, (1994), Practicas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas, Secretaria de Salud, México.
NOM-251-SSA1-2007, (2007), Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, Secretaria de Salud, México.
Organización Mundial de la Salud FAO (2002) Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). Roma
Informáticas:
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (1999) Manual para la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) en la Industria Lechera, SENASA, Argentina, http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Manual_HACCP_lacteos.pdf , (15/12/09)

P166 INFLUENCIA DEL SISTEMA DE CRÍA EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y EN LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* DE HUEVOS DE GALLINA EN CASTILLA Y LEÓN

Rosa Capita, Jessica Domínguez-Rodríguez, Alicia Alonso-Hernando y Carlos Alonso-Calleja
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071, Leon
rosa.capita@unileon.es.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los huevos de gallina son una fuente barata de proteínas de alta calidad, jugando un papel muy importante en la dieta humana, con un consumo *per cápita* anual de 211 (España)-235 (Unión Europea) unidades (FAO, 2010). Las gallinas ponedoras están sometidas a diferentes sistemas de cría: gallinas criadas en jaula, gallinas criadas en suelo, gallinas camperas y gallinas de producción ecológica, que suponen el 75%, 14%, 9% y 2% de la producción de huevos en la Unión Europea (Magdelaine, 2009). Además, en los mercados locales se pueden encontrar ocasionalmente huevos caseros. Así, el consumidor dispone de un abanico amplio de productos de muy diferentes precios, pero habitualmente carece de información sobre la calidad de cada uno de ellos.

El elevado consumo de huevos, junto con la relativamente alta prevalencia de microorganismos patógenos en estos alimentos, hacen que huevos y ovoproductos se vean con frecuencia implicados en brotes de infecciones e intoxicaciones alimentarias (23,1% del total en la Unión Europea en 2008) (EFSA, 2010). *Escherichia coli* es un microorganismo habitual del tracto gastrointestinal del hombre y los animales de sangre caliente. Su presencia suele considerarse indicadora de contaminación fecal, siendo el 10-15% de las cepas patógenas oportunistas (Akond *et al*., 2009). Además, en los últimos años la importancia de este microorganismo ha aumentado al utilizarse habitualmente como marcador de resistencia a antibióticos (SCENIHR, 2009). Hasta el momento es muy escasa la información disponible sobre las características microbiológicas de huevos de gallina en el noroeste de España. Este trabajo ha tenido como objetivos: 1) conocer los niveles de flora aerobia viable y coliformes fecales en la superficie de huevos de gallina de Castilla y León, 2) determinar la resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas y 3) determinar la influencia del sistema de cría en los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 200 huevos de gallina procedentes de diferentes establecimientos comerciales de León, Palencia, Valladolid y Zamora. Se analizaron 40 unidades de cada sistema de cría: gallinas criadas en jaula, gallinas criadas en suelo, gallinas camperas, gallinas de producción ecológica y gallinas caseras. Se determinaron los niveles de flora aerobia viable (PCA, 30º C, 3 días) y coliformes fecales (VRBA, 45º C, 24 horas) en las cáscaras de los huevos. A partir de cada huevo se aislaron del medio VRBA entre 1 y 4 colonias con morfología característica, que fueron sometidas a las pruebas de tinción por el método Gram, actividad catalasa y actividad citocromo oxidasa. La identificación se realizó con el sistema *E. coli* test (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italia). Las pruebas de resistencia a antibióticos se llevaron a cabo con un total de 100 cepas de *E. coli* (20 de cada sistema de cría) utilizando la técnica de difusión en disco. Se ensayaron 15 compuestos diferentes: gentamicina (GEN), ampicilina-sulbactam (AMS), amoxicilina-ácido clavulánico (AUG), piperacilina-tazobactam (TZP), cefotaxime (CTX), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), cloranfenicol (C), ciprofloxacino (CIP), ácido nalidíxico (NA), tetraciclina (TE), nitrofurantoína (F) y fosfomicina (FOS). Los recuentos (log_{10} ufc/cm^2) se evaluaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), con separación de medias empleando la prueba de rango múltiple de Duncan. Las prevalencias de resistencia a antibióticos se compararon mediante la prueba de Fisher. En ambos casos se utilizó el programa informático Statistica® 6.0 (Statsoft ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los huevos presentaron recuentos medios de 2,49±1,14 log_{10} ufc/cm^2 (flora aerobia viable) y 0,65±0,92 log_{10} ufc/cm^2 (coliformes fecales). Estos valores se encuentran en el límite inferior del intervalo de valores observados por otros autores consultados (De Reu *et al*., 2009). Los niveles de flora aerobia viable fueron superiores (P<0,05) en los huevos caseros (3,69±0,72 log_{10} ufc/cm^2) que en resto (entre 1,96±1,00 y 2,34±1,16 log_{10} ufc/cm^2). Los mayores recuentos (P<0,05) de coliformes fecales se obtuvieron en los huevos caseros (1,35±0,87 log_{10} ufc/cm^2) y

de gallinas criadas en suelo (1,35±1,02 log_{10} ufc/cm^2). En el resto de las muestras los niveles fueron menores y oscilaron entre 0,10±0,24 y 0,25±0,48 log_{10} ufc/cm^2. El alto porcentaje de huevos caseros con suciedad macroscópica es probablemente responsable de este elevado grado de contaminación.

De las 100 cepas de *E. coli* examinadas el 23% fueron sensibles a todos los antibióticos, el 18% resistentes a un antibiótico y el 59% multirresistentes (a dos o más antibióticos). Los mayores porcentajes de cepas sensibles se obtuvieron en los huevos ecológicos (30% de las cepas) y caseros (70%). Por otro lado, el 95% de las cepas procedentes de huevos de gallinas criadas en jaula y criadas en suelo fueron multirresistentes. El elevado porcentaje de cepas resistentes y multirresistentes coincide con los valores observados por otros autores consultados (Musgrove *et al.*, 2006; Adesiyun et al., 2007) y podría deberse al amplio uso de antibióticos, como agentes preventivos, profilácticos o terapéuticos, en producción animal (Miles *et al.*, 2006). Es de destacar la menor prevalencia de resistencia en los huevos ecológicos y caseros, hecho que podría deberse al menor empleo de antibióticos en estos sistemas de cría, y que justificaría en parte la percepción de alimentos saludables que los consumidores tienen en relación con ambos grupos de huevos.

Los antibióticos con mayores prevalencias de resistencia fueron TE (55% de las cepas), AUG (47%), SXT (33%), F (17%) y FOS (15%). Hay que señalar que tetraciclinas y sulfamidas son antimicrobianos de amplio uso en producción animal. Los porcentajes de resistencia al resto de los compuestos oscilaron entre 1% (CTX, CIP) y 3% (AMS y C). Los cuatro patrones de resistencia más frecuentes fueron AUG/SXT/TE (30% de las cepas), AUG/FOS/TE (7%), TE/F (8%) y F (9%). El resto de las cepas (46%) se agruparon en 15 patrones diferentes.

CONCLUSIONES

1) Los huevos de gallina procedentes de establecimientos de Castilla y León presentan una buena calidad microbiológica en comparación con los resultados de otros estudios realizados fuera de nuestro entorno geográfico. Los huevos caseros contienen niveles de flora aerobia viable y de coliformes fecales significativamente superiores a los de producción industrial.

2) La elevada prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes y multirresistentes a antibióticos puede llegar a suponer un riesgo para el consumidor, teniendo en cuenta la resistencia observada frente a algunos de los compuestos empleados habitualmente en la práctica clínica.

3) Los mayores niveles de resistencia a antibióticos se observaron frente a aquéllos más ampliamente utilizados en producción avícola.

4) Los menores porcentajes de cepas resistentes se detectaron en los huevos caseros y de producción ecológica, hecho probablemente relacionado con el escaso empleo de antibióticos en ambos tipos de producción. Estos resultados sugieren la posibilidad de monitorizar la resistencia bacteriana a los antibióticos como herramienta para detectar el empleo de estos compuestos en las explotaciones avícolas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adesiyun, A., Offiah, N., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V. y Musai, L. (2007). *Food Control* 18, 306-311.

Akond, M.A., Hassan, S.M.R., Alam, S. y Shirin, M. (2009). *Americann Journal of Environmental Sciences* 5 (1), 47-52.

De Reu, K., Rodenburg, T.B., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Tuyttens, F.A.M., Sonck, B., Zoons, J. y Herman, L. (2009). *Poultry Science* 88, 2442-2448.

EFSA –European Food Safety Authority- (2010). *The EFSA Journal* 8 (1), 1496-1808.

FAO (2010). Dirección de internet: http://faostat.fao.org/. Fecha del último acceso: 14 de junio de 2010.

Magdelaine, P. (2009). Proceedings WPSA (World's Poultry Science Association) Symposia on Quality of poultry meat, eggs and egg products 2009. Dirección de internet: http://www.cabi.org/animalscience/Uploads/File/AnimalScience/additionalFiles/WPSATurku2009/2_eggmeat2009_magdelaine_PL3.pdf Fecha del último acceso: 14 de junio de 2010.

Miles, T.D., McLaughlin, W. y Brown, P.D. (2006). *BMC Veterinary Research* 7, 1316-1327.

Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K., Cox, N.A., Harrison, M.A., Fedorka-Cray, P.J. y Ladely, S.R. (2006). *Poultry Science* 85, 1665-1669.

SCENIHR-Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks- (2009). Dirección de internet: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf. Fecha del último acceso: 14 de junio de 2010.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la subvención de la Junta de Castilla y León (Proyecto LE013A10-2) y de la *Universidad de León* (Proyecto ULE 2009-1).

P168 SISTEMAS DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA EN EMPRESAS DE ALIMENTOS EN EL VALLE DE TOLUCA

A. Reyes-García, O. Dublán-García y MA. Colín-Cruz

Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos Campus El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, CP 50014

ali_reyes@yahoo.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Al consumir un alimento procesado, en forma remota se piensa en todo el camino que tiene que recorrer el alimento desde la planta de manufactura hasta las manos del consumidor final. La producción de alimentos se ha convertido en un proceso muy complejo; los productos alimenticios procesados se han convertido en parte de nuestra vida diaria y la mayoría de los consumidores pueden disfrutar de ellos con seguridad.

Para que las empresas puedan brindar esta seguridad al consumidor, deben tomar medidas consistentes y organizadas para asegurar sus procesos. Estas medidas incluyen entre otras la aplicación de buenas prácticas de

manufactura, programas de desarrollo de proveedores, control de alérgenos, programas prerrequisitos que finalmente aseguraran la implementación del sistema de análisis de peligros e identificación de puntos críticos de control, por sus siglas en ingles HACCP, y otras normas como la ISO 22000. Las empresas alimentarias del Estado de México están comprometidas con la implementación de sistemas de calidad y seguridad alimentaria para consolidar su imagen y credibilidad en un mercado global. El Estado de México se localiza en la zona centro de México; aquí se concentra el 40% de las empresas alimentarias del país. Durante la última década la Facultad de Química, a través del Departamento de Alimentos ha participado en trabajos de prevención, evaluación e implementación de sistemas de calidad y seguridad alimentaria en diversas empresas de alimentos en el Valle de Toluca.
El objetivo fue analizar los trabajos de prevención, evaluación e implementación de sistemas de calidad y seguridad alimentaria derivados de la vinculación Facultad de Química (UAEMex)-Empresa alimentaria durante la última década, para identificar puntos coincidentes que permitan mejorar futuras aplicaciones en otras empresas alimentarias.

MÉTODO
Con base en las normativas nacionales e internacionales en materia de seguridad alimentaria (Buenas Prácticas de Manufactura, Sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, Normas ISO), se analizaron los resultados de estudios sobre la implementación de sistemas de calidad en las siguientes empresas de alimentos: Pastas, Colorantes, Bebidas embotelladas, Productos embutidos, Sabores y colorantes, Servicios de alimentos y bebidas.

RESULTADOS
Como punto inicial en la implementación de un sistema de calidad la empresa eligió la norma de referencia a seguir. Para lograr con éxito la implementación de cualquier sistema de calidad o seguridad alimentaria, la integración de equipos de trabajo multidisciplinarios dentro de las empresas aparece como requisito indispensable en todos los resultados reportados. Los reportes coincidieron en que fue imprescindible, en todos los niveles de la organización, la capacitación al personal en los requisitos de la norma de referencia; para el personal clave (auditores, supervisores, jefes de planta) la capacitación debe incluir además, temas como auditorias y elaboración del sistema documental (manuales, procedimientos, listas de verificación, registros y formatos para todas las áreas de la empresa). En el aspecto legal, la implantación de un sistema de calidad o seguridad facilitó la comunicación de la empresa con la autoridad sanitaria garantizando la calidad en este aspecto, que es el punto de encuentro de la responsabilidad entre el gobierno y la industria para proteger a los consumidores. En todas las empresas se logró mejorar la competitividad tanto en el mercado interno como externo.

CONCLUSIONES
Los trabajos analizados subrayan de manera importante que es indispensable el compromiso del personal directivo y operario de la organización al momento de implementar un sistema de calidad.
El análisis de estos trabajos permitirá a la Institución (Universidad Autónoma del Estado de México) llevar a cabo de manera más puntual y dirigida el análisis de la situación inicial de la empresa y la definición del plan para la implementación de un sistema de calidad y seguridad alimentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Almazán González C; Evaluación y Desarrollo de proveedores en una empresa de pastas alimenticias; FQ UAEMex; Junio 2006.
Calderón Dávila A; Elaboración e implementación del sistema recepción-proceso-consumo para el Servicio de alimentos y bebidas; FQ UAEMex; Diciembre 2003.
García Chávez VM; Manual en sistemas de seguridad en alimentos; FQ UAEMex; Octubre 2008.
Luna Cano S; Prevención de contaminación cruzada con alérgenos en la industria de alimentos, FQ UAEMex; Abril 2007.
Olguín Ramírez W; Aplicación de HACCP para evitar la presencia de objetos extraños en mezclas de colores; FQ UAEMex; Septiembre 2006.
Ortega Martiñon MG; Propuesta y evaluación de un programa de limpieza y desinfección aplicado a una planta procesadora de pastas, FQ UAEMex; Julio 2009.
Rivera Guzmán PW; Implementación de ISO 22000:2005 en una empresa de sabores líquidos y en polvo secados por aspersión; FQ UAEMex; Enero 2010.
Sandoval Copado JR; Aplicación de un plan HACCP en el proceso de elaboración de saborizantes secados por aspersión; FQ UAEMex; Junio 2007

P169 *FLO11* EXPRESSION SEEMS TO BE INVOLVED IN A COMMERCIAL BAKER'S STRAIN "IN VIVO" VIRULENCE

Patricia Roig[1], Rosa de Llanos[2], Amparo Querol[1] y Teresa Fernández-Espinar[1]
[1] Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Avda. Agustín Escardino nº7, 46980 Paterna (Valencia)
Patricia.roig@uv.es
[2] Aberdeen Fungal Group, School of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences, Foresterhill, University of Aberdeen, AB25 2ZD Aberdeen, UK.

INTRODUCTION AND OBJECTIVES
Saccharomyces cerevisiae is widely distributed yeast in nature and it has been used extensively in baking, brewing, wine making and biotechnology (de Llanos et al. 2004; Murphy & Kavanagh, 1999). Moreover, it is even consumed as a

nutritional supplement, in particular by sportsmen and as a biotherapeutic agent in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhoea and colitis in humans (de Llanos et al. 2006a). This microorganism has been considered as GRAS (generally regarded as safe) during long time, it can colonize the respiratory, gastrointestinal and genitourinary tracts in a saprophytic way without causing disease; however, in the last decades numerous cases of clinical infections caused by it, superficial and systemic infections, have been reported in the literature (de Llanos et al. 2006 a,b; Murphy & Kavanagh, 1999). At the present time *S. cerevisiae* should be regarded as an opportunistic pathogen of low virulence rather than as a non-pathogenic yeast (Murphy & Kavanagh, 1999; Yáñez et al. 2009). Since the exogenous exposure to this organism occurs mostly through foods, drinks and nutritional supplements, there is a growing interest in elucidate the molecular mechanisms involved in the aetiology of infections caused by this yeast species. Adherence to host cells, colonization and biofilm production prelude the development of fungal infection and they are very important determinants of pathogenesis. *FLO11* encodes the main cell surface protein involved in adhesion-related phenotypes that are considered as virulence mechanisms (Bayly et al. 2005). In this work we have studied *FLO11* gene expression level by RT-PCR in *S. cerevisiae* strains from different origin (clinical and non-clinical) and we have correlated that expression with their potential virulence.

MATERIAL AND METHODS

Strains and growth conditions. Seven isolates of *S. cerevisiae* were used for this study in accordance with previous *in vitro* and *in vivo* studies of virulence (Llanos et al. 2006b, Yañez et al. 2009, manuscript in preparation). Tree of the strains were of clinical origin (nº 60, 102 and 115), and four were food-related (CECT 10.431, ICV17, ICV30 and "Cinta Roja"). The origin and sources of these strains are listed in a previous study (de Llanos et al. 2004, 2006a).
Growth curve analysis. Isolates growth was followed by measuring the O.D. at 600 nm.
Relative quantification of gene expression by LightCycler RT-PCR. Isolates were grown at 37ºC until mid-logarithmic and stationary phases of growth in BHI (brain heart infusion) broth and in YPD liquid medium as control medium. Total RNA was extracted using the "Total Quick RNA Cells and Tissues" kit (Talent, Italy) following the manufacturer's directions. Reverse transcription was performed with M-MLV Reverse Transcriptase of USB Corporation (Ohio, USA) and oligo $(dT)_{18}$ to obtain the cDNA of the samples. Relative *FLO11* gene expression was determined using a pair of oligonucleotide primers designed by the "LightCycler probe design software".
Study of promoter & ORF FLO11. Promoter and ORF size of *FLO11* gene was tested by conventional PCR using primers deduced from the sequence.

RESULTS AND DISCUSSION

Strains growth analysis. All strains grow slower and reach lower $O.D._{600\ nm}$ in BHI broth than in YPD medium. In each medium, strains all grow in a similar way displaying a similar doubling time. In both mediums the reference strain CECT 10.431, the baker's commercial strain "Cinta Roja" and the clinical strain 115 present a longer lag phase than the rest of the strains but reach a similar $O.D._{600nm}$ at the stationary phase of growth. It is interesting to denote multicellular aggregates formation by the baker's commercial strain "Cinta Roja", the clinical strains 60 and 102 and the strain CECT 10.431 when grow in BHI medium until stationary phase of growth. This aggregates formation is consequence of cell-cell adhesion (flocculation) and pseudohyphae formation, phenomenons in which can be implicated *FLO11* expression. Strains which shown this phenomenon were the most virulent in previous studies of our group (Llanos et al. 2006b, Yañez et al. 2009, manuscript in preparation).
Quantification of ACT1 and FLO11 expression by Light-Cycler real-time PCR. Strains present increased *FLO11* gene expression in BHI broth than in YPD medium. Independently of culture conditions, strains which more *FLO11* gene expression are the clinical strains 102 and 60 and food strains "Cinta Roja" and CECT 10.431. An association between *FLO11* gene expression level and clumps formation seems to take place supporting the fact that it is a gene involved in phenomenons such as cell-cell adhesion and flocculation (Lo W.S. & Dranginis A.M., 1998).
Study of promoter & ORF FLO11 size by convencional PCR. All strains have an intact promoter with the exception of *S. cerevisiae* CECT 10.431 that present a deletion that would explain the high *FLO11* expression level in stationary growth phase in BHI.
PCR products from different strains differed in length. This can be explained because this protein has a central domain of highly repeated serine/threonine/proline -rich sequences that can suffer rearrangements. These differences in *FLO11* ORF size involve protein structure changes that could explain different phenotypes in strains such as adhesion, flocculation or biofilm formation.

CONCLUSIONS

-The clinical strains 60 and 102, and the baker's strain "Cinta Roja", which present increased *FLO11* gene expression level when are cultured in BHI broth until stationary phase and form clumps in these conditions, are the most virulent strains. Therefore we have seen that *FLO11* gene expression, cell aggregates formation and potential virulence are related in *Saccharomyces cerevisiae.*
-The fact that virulent isolates have ability to flocculate and isolates that do not flocculate are not so virulent suggest the idea that this may constitute a virulence factor in that it could lead to the death by obstruction of capillaries (Murphy & Kavanagh, 1999; de Llanos et al. 2006a).

REFERENCES
Bayly J.C., Douglas L.M., Pretorius I.S., Bauer F.F., Dranginis A.M. 2005. Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 5: 1151-1156.
de Llanos R., Querol A., Planes A.M., Fernández-Espinar M.T. 2004. Molecular Characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. System. Appl. Microbiol. 27: 427-235.
de Llanos R., Fernández-Espinar M.T., Querol A. 2006a. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. Antonie van Leeuwenhoek. 90: 221-231.
de Llanos R., Querol A., Pemán J., Gobernado M., Fernández-Espinar M.T. 2006b. Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a posible origin of human systemic infections. International Journal of Food Microbiology 110: 286-290.
Lo W.S., Dranginis A.M. 1998. The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell. 9: 161-171.
Murphy A., Kavanagh K. 1999. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen. Implications for biotechnology. (Review) Enzyme Microb. Technol. 25: 551-557.
Yáñez A., Murciano C., Llopis S., Fernández-Espinar T., Gil M.L., Gozalbo D. 2009. *In vivo* and *in vitro* studies on virulence and host responses to *Saccharomyces cerevisiae* clinical and non-clinical isolates. The Open Mycol J. 3: 37-47.

P205 ESTUDIO DEL GEN DE LA FOSFO-BETA-GALACTOSIDASA EN AISLADOS DE *LACTOCOCCUS GARVIEAE* DE ORIGEN ALIMENTARIO, CLÍNICO Y AMBIENTAL

*Mónica Aguado-Urda[1], M. Teresa Cutuli[1], M. Mar Blanco[1], José F. Fernández-Garayzábal[1], Lucas Domínguez[2], José L. Tejedor[3], Carmen Aspiroz[4] y Alicia Gibello[1]**
[1] Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, [2] Centro VISAVET, Universidad Complutense de Madrid (UCM). Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid
magur@vet.ucm.es
[3] Dibaq. Crta. Nacional Navalmanzano a Fuentepelayo, Km 4,300, 40260, Fuentepelayo (Segovia)
[4] Unidad de Microbiología, Hospital Royo Villanova, 50015, Zaragoza

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Lactococcus garvieae es el agente causal de la lactococosis, una enfermedad infecciosa emergente de especial incidencia en la trucha arco iris. *L. garvieae* ha sido también asociado a procesos infecciosos en animales domésticos, como mastitis en ganado vacuno y procesos neumónicos en ganado porcino. Este agente se ha encontrado además en muestras humanas procedentes del tracto urinario y piel, así como en pacientes con procesos infecciosos como neumonía, endocarditis y septicemia, habiéndose sugerido que *L. garvieae* puede ser clasificado como un potencial agente zoonótico (Vendrell *et al.*, 2006). Además de en muestras ambientales, *L. garvieae* se encuentra frecuentemente en diferentes tipos de alimentos como carne cruda y productos cárnicos (salchichas y morcilla), vegetales y productos lácteos, siendo un componente habitual de la microbiota de estos últimos (Foschino *et al.*, 2008). En este sentido, la presencia de *L. garvieae* en alimentos podría suponer un riesgo potencial para los consumidores, habiéndose descrito procesos gastrointestinales en el hombre asociados al consumo de alimentos contaminados con este patógeno (Wang *et al.*, 2007).

Una de las acciones principales de los lactococos es la fermentación de la lactosa en lactato. En estos microorganismos la lactosa es transportada y fosforilada por el sistema PTS (fosfoenolpiruvato-transferasa) e hidrolizada por una fosfo-beta-galactosidasa codificada por el gen *lacG*. Recientemente se ha propuesto la presencia del gen *lacG* como marcador potencial para distinguir aislados de *L. garvieae* procedentes de productos lácteos y de peces (Fortina *et al.*, 2009). Sin embargo, la presencia de este gen no ha sido analizada en aislados de *L. garvieae* de otras procedencias.

Por tanto, con el fin de comprobar la utilidad de este marcador para establecer el posible origen alimentario de los aislados, el objetivo de este trabajo ha sido investigar la presencia del gen *lacG,* así como la capacidad de metabolizar lactosa, en aislados de *L. garvieae* de diversos orígenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon 48 aislados de *L. garvieae* procedentes orígenes diversos, incluyendo: productos alimentarios (n=7, de los cuales 6 procedían de productos lácteos y 1 de morcilla de Burgos), peces (n=10), mastitis de ganado vacuno (n=5) o mastitis de búfalo (n=2), cerdos (n=10), aves (n=3), muestras ambientales (n=10) y muestras humanas (n=3). Todos los aislados fueron identificados bioquímicamente mediante la galería comercial Rapid ID32 Strep (BioMèrieux) y mediante PCR (Zlotkin *et al.*, 1998).

Para cada aislado se determinó la capacidad de producción de ácido a partir de lactosa que se realizó en medio base rojo fenol conteniendo lactosa al 1%, y la presencia del gen *lacG* que codifica la producción del enzima fosfo-beta-galactosidasa, mediante una modificación de la PCR diseñada por Fortina *et al.* (2009) usando los *primers* galF (5'-GCTACAGCTGCTTATCAAGC-3') y galR (5'-AGCTACTCGACGACCAACAC-3') con una temperatura de hibridación de 51º C. La confirmación de los resultados positivos para esta PCR se realizó mediante la secuenciación del fragmento amplificado (aproximadamente 1 Kb) y posterior comparación de las secuencias obtenidas con la secuencia completa del gen *lacG* (GenBank: EU153556.1) mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los aislados de *L. garvieae* de origen alimentario, el gen *lacG* se detectó en todos aquellos procedentes de productos lácteos a excepción del aislado procedente de kajmak (derivado lácteo tradicional de Serbia). Este

resultado no es acorde con los obtenidos por Fortina *et al.* (2009) quienes encontraron la presencia del gen *lacG* en todos los aislados procedentes de productos lácteos. En el aislado de morcilla no se detectó el gen.
Entre los aislados de *L. garvieae* de origen no alimentario, el gen *lacG* no se detectó en ninguno de los aislados procedentes de peces, pero estuvo presente en porcentajes diferentes en el resto de aislados de otros orígenes (mastitis de vaca, aislados de humanos y de cerdos y muestras ambientales). La ausencia del gen *lacG* en las muestras clínicas de peces coincide con los resultados obtenidos por Fortina *et al.* (2009), quienes propusieron que los aislados de peces son mutantes naturales lactosa-negativo y no poseen por tanto los genes implicados en la utilización de la lactosa.
Hubo una concordancia entre la presencia del gen *lacG* y la capacidad para utilizar la lactosa en la mayoría de los aislados de *L. garvieae* estudiados. Sin embargo, los aislados de cerdos y una de las cepas humanas que fueron positivos para el gen *lacG* resultaron incapaces de metabolizar la lactosa. Este resultado podría deberse a que, en estos aislados, pudiera existir una alteración a nivel del sistema de transporte y fosforilación de la lactosa.

CONCLUSIONES

- La presencia del gen *lacG* no es exclusiva de los aislados *de L. garvieae* procedentes de productos lácteos y por lo tanto, su utilización como marcador para la clasificación de dichos aislados en función de su origen no es adecuada.
- El gen *lacG* se encuentra heterogéneamente distribuido entre los diferentes aislados de *L. garvieae* estudiados, confirmándose la ausencia de dicho gen en las cepas procedentes de peces.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403-410.
Foschino R, Nucera D, Volponi G, Picozzi C, Ortoffi M, Bottero MT. 2008. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *J Appl Microbiol*, 105:652-662.
Fortina MG, Ricci G, Borgo F. 2009. A study of lactose metabolism in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing between dairy and fish biotypes. *J Food Proc*, 72:1248-1254.
Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 29:177-198.
Wang CY, Shie HS, Chen SC, Huang JP, Hsieh IC, Wen MS, Lin FC, Wu D. 2007. *Lactococcus garvieae* infection in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int J Clin Pract*, 61:68-73.
Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H. 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol*, 36:983-985.

P209 ESTUDIO DE PARÁMETROS DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN EL AGUA DE ABASTO DE EXPLOTACIONES AVÍCOLAS EN GRAN CANARIA.

Esteban Pérez[1], Antonio Simoes[1], Conrado Carrascosa[1], Rafael Millán[1] y Esther Sanjuán[1]
[1]Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Trasmontaña s/n 35413, Arucas, Las Palmas.
estebanpg@hotmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El Anexo I del RD 140/2003, de 7 de febrero, que establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, especifica los valores paramétricos que el agua considerada como *apta* debe cumplir. Entre otros, se encuentran los requisitos de carácter microbiológico.
Con el fin de controlar las posibles repercusiones que la calidad microbiológica del agua suministrada en las granjas a gallinas ponedoras pudiera tener posteriormente, se llevó a cabo el presente trabajo como una acción de vigilancia en el entorno APPCC, que pretendió detectar y prevenir posibles riesgos y/o peligros microbiológicos presentes en muestras de aguas para consumo de gallinas en diversas explotaciones de la isla de Gran Canaria, que pudieran vehicularse al consumidor por la ingesta de huevos insalubres.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron en la isla de Gran Canaria, durante los años 2009 y 2010, un total de 146 muestras de agua de abasto procedentes de 23 explotaciones avícolas diferentes y con sistema de autocontrol implantado, ubicadas en 4 zonas de la isla (Norte, Sur-Oeste, Este y Centro), siendo los puntos de muestreo y recogida, los depósitos, grifos y jaulas.
Los parámetros microbiológicos investigados en las muestras fueron los especificados como referentes de calidad en el RD 140/2003:
- Parámetros microbiológicos: *Escherichia coli*, enterococos y *Clostridium perfringens*.
- Parámetro indicador: recuento de coliformes.

El criterio señalado en el RD para todos estos microorganismos es de 0 ufc/ 100 ml de agua.
Todas las determinaciones se llevaron a cabo mediante los procedimientos analíticos descritos por Pascual Anderson (2000), para cada uno de estos microorganismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que el grado de cumplimiento mostrado por las muestras analizadas en el presente estudio, con respecto a la legislación vigente fue del 100% para *E. coli* y *Clostridium perfringens;* del 88,4% para coliformes totales y del 85,6% para enterococos.

Al comparar estos resultados con los datos suministrados por el SINAC (Sistema de Información Nacional de Aguas de Consumo) facilitados en un informe técnico sobre la calidad del agua de consumo humano en España en el año 2008, se observó (Figura 1), que las muestras de aguas de Gran Canaria mostraron una mejor calidad microbiológica global en lo referente a *E. coli* y *Clostridium perfringens*, aunque algo inferior en cuanto a enterococos y coliformes, dado que estos controles efectuados a nivel nacional reflejaron un cumplimiento de 99,81%, 99,59%, 99,68% y 99,32%, respectivamente.

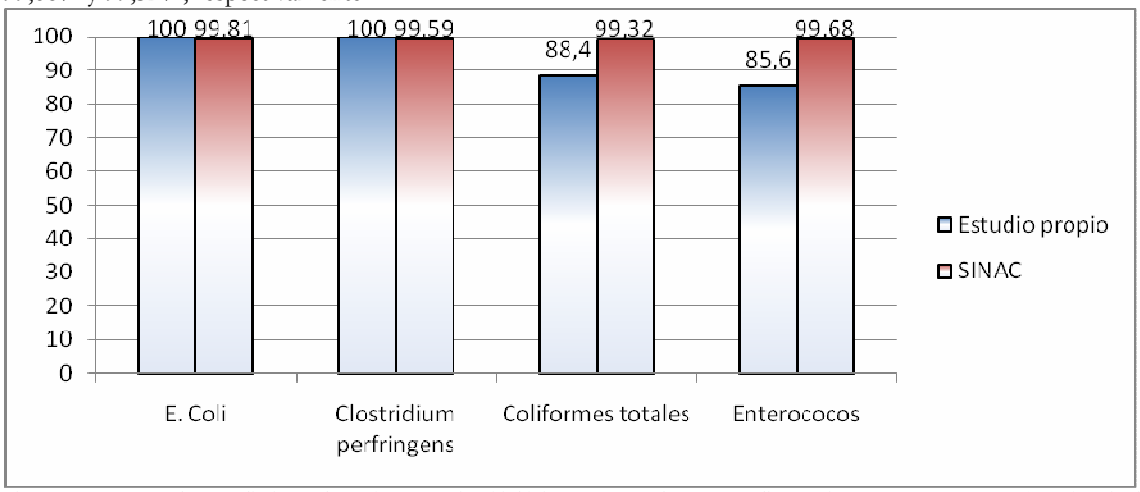


Figura 1. Porcentaje de cumplimiento de parámetros microbiológicos en aguas de GC (estudio propio) y en España (SINAC) según criterios del RD 140/2003.

CONCLUSIONES

Los resultados de los análisis microbiológicos de las muestras de agua analizadas de la isla de Gran Canaria suministrada a gallinas ponedoras, muestran un elevado porcentaje de cumplimiento con las exigencias legales, si bien no hay un cumplimiento al 100% en lo que respecta a los parámetros enterococos y coliformes, lo cual indicaría un riesgo potencial de enfermedades gastrointestinales para los animales en producción que podría vehicularse a través de la puesta de huevos.

Se hace por tanto necesario, integrar en el sistema APPCC, el control higio-sanitario de los huevos para consumo producidos en las granjas participantes en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pascual, M.R, Calderón, V. (2000). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ed. Díaz de Santos.
SINAC. (2008). Informe técnico sobre la calidad del agua de consumo humano en España. http://sinac.msc.es/
Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

P211 VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS EN CANALES PORCINAS BENEFICIADAS EN UN MATADERO INDUSTRIAL TIPO II

Johanna Barrios, Iria Acevedo y Oscar García
UCLA. Decanato de Agronomía. Programa de Ingeniería Agroindustrial.
iacevedo@ucla.edu.ve; oscargarcia@ucla.edu.ve

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Para garantizar la calidad del producto se debe realizar una serie de análisis microbiológico, para evitar la contaminación microbiana de los alimentos el cual es un problema serio para la industria alimentaria por las grandes pérdidas económicas que trae consigo, por eso, hoy en día las empresas procesadoras de alimentos para el consumo humano emplean equipos modernos en sus laboratorios de control de calidad, que asegure la inocuidad de esos productos, para ello se recomienda realizar controles periódicos de las diferentes etapas, es el caso de la recepción de las materias primas, productos en procesos y productos terminados; con el fin de minimizar el crecimiento microbiano. Por consiguiente se debe realizar una serie de análisis microbiológicos para asegurar de una u otra forma la calidad de esos productos, entre estos análisis se encuentran: el recuento de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras, Salmonella, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* hemorrágica y Coliformes totales. En este mismo orden de ideas, en las empresas procesadoras de alimentos de origen animal como las beneficiadoras de animales se obtienen productos confiables desde el punto de vista sanitario, con buena presentación, que agraden a los consumidores y a precios accesibles. De esta forma se garantiza la permanencia en el mercado, se optimizan las condiciones de competencia y se facilita las ventas, para lograr estos objetivos es imprescindible poner en marcha un sistema de control de calidad que evite, que salgan al mercado productos no aptos para el consumo humano.

Con el objetivo de realizar esta investigación se evaluó durante ocho (08) semana la calidad microbiológica de la carne porcina beneficiada y almacenada en las diferentes cavas refrigeradas en un matadero industrial tipo II, ubicado en la ciudad de Barquisimeto en Venezuela y verificar que los resultados obtenidos se encuentren dentro

de los parámetros establecidos en la norma ISO 9001-2000. Así como también establecer un plan de acción para disminuir los microorganismos durante el beneficio de los cerdos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una evaluación microbiológica durante ochos (8) semanas de *Escherichia Coli* Hemorrágica, Salmonella, *Staphylococcus Aureus*, Mohos y Levaduras, Aerobios Mesófilos y Coliformes totales, a las canales de porcinos una vez beneficiadas y almacenadas en las cavas de refrigeración, la cual consistió en tomar muestras de 250g de cada canal de porcinos seleccionadas aleatoriamente en los diferentes extremos de las cavas (10 canales); siendo las mismas beneficiadas del mismo día y almacenados a una temperatura de 3 °C aproximadamente, dichas muestras fueron tomadas de los cedillo, mano, pecho, costilla, falda, paleta; utilizando un cuchillo y pinza previamente estéril, se corto las partes antes mencionadas, y fueron introducidas en una bolsa herméticas, llevadas al laboratorio, identificadas con fecha, hora, nombre y luego se procedió a la molienda en una solo masa y de esta se tomaba la porción necesaria para la siembra y así determinar los análisis microbiológicos de *Escherichia Coli* Hemorrágica, Salmonella, Mohos y Levaduras, Aerobios Mesófilos, Coliformes Totales y E. Coli. Los datos obtenidos se le cálculo el promedio para ver si se encontraban dentro de los parámetros establecidos, y se determinó por medio de la prueba T Student si existían diferencias significativas, para ellos se trabajo con el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 1, la calidad microbiológica de la carne porcina, se pudo observar que al determinar Aerobios Mesófilos presentó un promedio de 135,000 UFC/ml, con una desviación estándar de 30,970, encontrándose dentro de los parámetros permitidos, (100.000 a 500.000 UFC/ml), con respecto a los Mohos y Levaduras arrojaron un promedio de 123 UFC/ml, (20 a 200 UFC/ml) con una desviación estándar de 102 UFC/ml, los *Staphylococus Áureos* y E.coli igualmente se encuentran dentro de los parámetro permitidos con un promedio de <99 UFC/ml (<500 UFC/ml) con una desviación estándar de 44,2 UFC/ml, y la E.coli con un promedio <23 UFC/ml (<100 UFC/ml) con una desviación estándar de 37 UFC/ml. También se observa que los coliformes totales se encuentran muy cercano al valor más alto del parámetro permitido (<500 UFC/ml), evidenciándose que en la semana 5 y 6 estuvo fuera del mismo, y al observar el promedio durante las ochos semanas este se mantiene muy cercano a salir del parámetro (< 491 UFC/ml), presenta una desviación estándar elevada (24,89 UFC/ml) entre las diferentes semanas de estudios, resultados similares encontró Malave (2006). A partir de este resultado obtenido se deduce que este incremento de los coliformes totales se puede deber a una contaminación de las agua utilizadas durante el proceso de faenado, así como también producto de una contaminación durante proceso de evisceración. Por último la determinación de E.coli hemorrágica y Salmonella están ausentes durante estos resultados obtenidos reflejan la importancia de evaluar las causas generativa en el presente estudio, con la finalidad de establecer un plan de acción para reducir dichas causas que puedan estar afectando la calidad de la carne.

Tabla 1. Análisis microbiológico de la carne porcina

Análisis Microbiológico	*promedio*	*desviación*	*Parámetro*	*Método*
Aerobios Mesófilos (UFC/ml)	135,000	30,970	100,000 a 500,000	Petrifilm
Moho y Levadura (UFC/ml)	123	102	20 a 200	Petrifilm
Coliformes Totales (UFC/ml)	491	25	< 500	Petrifilm
Staphylococus Áureos (UFC/ml)	99	44	< 500	Petrifilm
E. coli (UFC/ml)	23	37	< 100	Petrifilm
E. Coli Hemorrágica (UFC/ml)	ausente	ausente	ausente	VIP EHEC
Salmonella (UFC/ml)	ausente	ausente	ausente	COVENIN 1291-88

CONCLUSIONES

Por medio de análisis microbiológicos a la carne porcina se pudo observar que Aerobios Mesófilos, los Mohos y Levaduras, los *Staphylococus Áureos* y *E.coli* se encuentran dentro de los parámetro permitidos por la empresa, excepto la determinación de Coliformes totales se encuentran muy cercano al valor más alto del parámetro permitido (<500 UFC/ml). Se estableció un plan de acción para reducir la calidad microbiológica de la carne y así reducir los microorganismos patógenos en la línea de matanza en porcinos, al mismo este plan constituye un instrumento de información que servirá de orientación al personal que labora en la empresa, para redactar normativas en la manipulación y manufactura de la carne, así también establecer programas de higienes del personal manipulador, programas de limpieza de los equipos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS
Norma COVENIN 794-86. Código de prácticas de higiene para mataderos industriales, mataderos frigoríficos industriales, frigoríficos industriales y salas de matanzas municipales o privadas.
Norma COVENIN 3338-97. Alimentos: Recuentos de aerobios. Método de placas con películas secas rehidratadles (Petrifilm)

P212 INCIDENCIA DE AFLATOXINA M_1 EN DERIVADOS LÁCTEOS. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN EN CATALUÑA

Esther García, German Cano, Sonia Marín y Antonio J. Ramos
Departamento de Tecnología de Alimentos, UTPV-XaRTA, Universidad de Lleida. Av/ Rovira Roure, 191, 25198, Lleida
gcano@tecal.udl.cat

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS
Las aflatoxinas son compuestos altamente tóxicos, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos producidos por *Aspergillus flavus, A. parasiticus* y *A. nomius*. Aunque la aflatoxina M_1 (AFM_1) es menos tóxica que la AFB_1, ha sido clasificada como posible carcinógeno en humanos, agente del Grupo 2B según la Agencia Internacional de Investigación en Cancer (IARC, 1993). Los objetivos de este estudio fueron, por un lado, i) determinar la incidencia de AFM_1 en los principales productos lácteos consumidos en Cataluña (España), y por el otro, ii) evaluar la exposición de la población catalana a esta micotoxina, mediante los métodos deteminísticos y probabilísticos.

MATERIAL Y MÉTODOS
La incidencia de AFM_1, se determinó en 72 *composites* de leche, 72 *composites* de queso y 72 *composites* de yogur procedentes de Cataluña. Los *composites* se obtuvieron mezclando 3 muestras individuales procedentes del mismo establecimiento comercial. El muestreo se llevó a cabo en 12 ciudades que representaron el 72% de la población catalana. La concentración de AFM_1 se analizó con un kit comercial de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).
En la evaluación de la exposición, se llevaron a cabo tres aproximaciones: un método determínistico y dos modelos probabilísticos mediante simulación por el método Monte Carlo (un modelo no paramétrico y otro modelo paramétrico, usando distribución gamma).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Se cuantificó AFM_1 en el 94,44% (68/72) de las muestras de leche entera UHT por encima del nivel de cuantificación de 5 ng/kg, en el 2,8 % (2/72) de las muestras de yogur, y no se detectó en las muestras de queso por encima del nivel de cuantificación de 25 ng/kg. Las concentraciones medias de leche, queso y yogur fueron 9,29 ± 2,61, <12,5 y 13,22 ± 4,82 ng/kg, respectivamente.
Los niños resultaron el mayor grupo de riesgo expuesto a AFM_1, con diferencias significativas entre sexos (LSD test, $P<0.05$), siendo el sexo femenino el más expuesto. Valores de exposición más altos se observaron en los percentiles altos, por ejemplo el percentil 95 en los niños, quienes mostraron exposiciones de 0,358 y 0,434 ng/kg b.w./día en niños y niñas, respectivamente. En cualquier caso, los valores se situaron por debajo del límite tolerable de 1 ng/kg bw/día.

CONCLUSIONES
Según estos valores, no se debería esperar que la población Catalana esté expuesta a niveles significativos de riesgo derivados de AFM_1, incluyendo grandes consumidores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
International Agency for Research on Cancer (IARC). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Lyon: IARC Scientific Publication 1993; 56: 19–23.

VIROLOGÍA

COMUNICACIONES ORALES

O120 DETECCIÓN Y TIPADO DE ROTAVIRUS GRUPO A, UN PATÓGENO EMERGENTE EN LA CADENA ALIMENTARIA.

Marta Diez-Valcarce[1], Maria Isabel Fernández-Natal[2], Hortensia Rodríguez-Pollán[2], David Rodríguez Lázaro y Marta Hernández[1]*
[1]Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología. Instituto Tecnológico Agrario (ITA), Junta de Castilla y León, Valladolid.
ita-dievalma@itacyl.es
[2]Servicio de Microbiología Clínica, Complejo Asistencial de León (SACYL) e Instituto de Biomedicina (IBIOMED), León.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS
Hoy en día, los virus están tomando una gran importancia en seguridad alimentaria. En 2007 Alemania notificó 59.000 casos de infecciones por rotavirus como tercera causa de enfermedad declarada, por detrás de norovirus y campilobacteriosis, aunque en alimentos se diagnostiquen poco debido a la complejidad de las matrices

alimentarias[1]. Se ha descrito que los rotavirus son la principal causa de gastroenteritis en niños y provoca más de 2 millones de hospitalizaciones y 440.000 muertes en niños menores de 5 años, además de producirse algunos brotes en adultos debido a ingestiones alimentarias. Son un género de virus con una gran diversidad de genotipos debido en parte a la acumulación de mutaciones que se estima sea de una por cada ciclo de replicación[2], lo que hace que se observen diferencias entre continentes y entre regiones de un mismo continente[3] además de que existen evidencias de infecciones en humanos por recombinaciones de cepas de rotavirus humanos y animales[4]. En este trabajo se han analizado 124 muestras utilizando dos métodos de detección (inmunocromatografía -IC- y PCR a tiempo real con transcripción inversa -RT-rt-PCR-) y se han caracterizado las muestras mediante las proteínas VP4 y VP7 (genotipo P y G, respectivamente), además de analizar la coexistencia de otros virus.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 124 muestras de heces de pacientes con diarrea en un rango de edad comprendido entre los 0 y 69 años, procedentes del Hospital de León, entre octubre 2008 y marzo 2009. Las muestras fueron criopreservadas a -80ºC y posteriormente se realizó una extracción de ARN a partir de una suspensión en PBS 1× suplementado con gentamicina, utilizando el kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante. La detección de rotavirus del grupo A se realizó por inmunocromatografía (GastroVIR-Strip, Coris Bioconcept) y PCR a tiempo real con transcripción inversa[5].La detección de hepatitis A, hepatitis E, norovirus grupo I y grupo II se realizó por PCR a tiempo real con transcripción inversa y la detección de adenovirus humano se realizó por PCR a tiempo real. El genotipado de rotavirus se realizó por RT-PCR convencional seguido de PCR anidada para las proteínas VP4 y VP7**.**

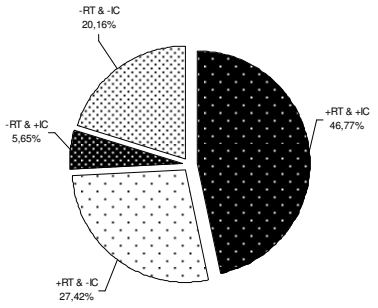
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

92 Muestras fueron positivas por RT-rt-PCR y 65 por IC (58 muestras positivas y 25 negativas para ambos métodos). Considerando la IC el método de referencia, se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y exactitud relativa del método de RT-rt-PCR en 89,23%, 42,37% y 66,94%, respectivamente. De hecho, se detectaron rotavirus por RT-rt-PCR en 34 muestras del total de 59 muestras negativas por IC, lo que representa un 27,42% (34 de 124 muestras totales) de falsos negativos y 5,65% (7 de 124) fueron positivas por IC y negativas por RT-rt-PCR, lo que podría considerarse falsos positivos (Figura 1A).

El genotipado (Figura 1B) se realizó en 99 muestras (79,84% del total de muestras) para las proteínas de la cápside, VP4 (P) y VP7 (G). Cincuenta y cinco muestras (44,35% o 55,56% del total o de las muestras caracterizadas, respectivamente) estaban infectadas con más de un genotipo, y para aquellas con infección única (28,23% o 35,35% del total o de las muestras caracterizadas, respectivamente) los genotipos más prevalentes fueron G4P[8], G2P[4], G2P[8] y G10P[8] (71,43%, 8,57%, 8,57% y 5,71%, respectivamente). Al mismo tiempo, en el 44,35% de las muestras en las que se observó la coexistencia de varios genotipos, también G4 y P[8] fueron los más prevalentes pero con un menor porcentaje, 61,14%.

Además, se estudió la presencia de otros agentes víricos, el 91,30% de las muestras positivas presentaban algún otro virus, 85,87% fueron positivas a adenovirus humano, 26,09 % norovirus humano grupo I, 35,87% norovirus humano grupo II, 10,87% a hepatitis E y ninguna a hepatitis A, mientras que en las muestras negativas a rotavirus la presencia de estos virus fue muy baja, excepto en el caso de adenovirus, en que tanto las muestras positivas como negativas a rotavirus mostraron porcentajes similares en cuanto a la presencia de adenovirus (84,38% *vs* 85,87%).

A



B

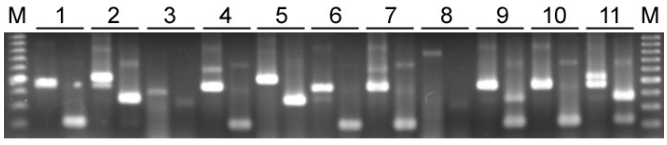


Figura 1. (A) Resultados de prevalencia de rotavirus grupo A usando dos métodos de análisis, inmunocromatografía (IC) y PCR a tiempo real con transcripción inversa (RT). (B) Genotipos muestras M- 100 bp Ladder 1- G4 (452 pb) P[8] (224 pb) 2- G2 (521 pb) G4 (452 pb) P[4] (362 pb) y P[8] (224 pb) 3- G4 (452 pb) P[4] (362 pb) 4- G1 (618 pb) G4 (452 pb)y P[8] (224 pb) 5- G2 (521 pb) P[4] (362 pb) 6- G4 (452 pb) G12 (387 pb) y P[8] (224 pb) 7- G3 (682 pb) G4 (452 pb) y P[8] (224 pb) 8- G12 (387 pb) P[4] (362 pb) 9- G4 (452 pb) P[4] (362 pb) y P[8] (224 pb) 10- G4 (452 pb) P[8] (224 pb) y P[10] (462 pb) 11- G2 (521 pb) G4 (452 pb) P[4] (362 pb) y P[8] (224 pb).

CONCLUSIONES

El sistema de RT-rt-PCR mostró ser un método más específico, sensible y fiable para la detección de rotavirus, ya que se detectaron un 36,96% más de muestras positivas que por IC (92 positivas por RT-rt-PCR y 58 por los dos

métodos). No se observaron diferencias significativas debidas al sexo del paciente y sin embargo se observó un incremento significativo durante los meses de invierno. De las muestras caracterizadas, G4P[8] y G2P[4] fueron los genotipos mayoritarios mostrando G2P[4] porcentajes similares a los ya descritos (8,57% en este estudio y 9% en Europa y el mundo 12%) y G4P[8] se detectó en un mayor porcentaje a lo ya descrito (71,43% *vs* 11% y 8,5 % en Europa y el mundo, respectivamente), lo que indicaría un claro predominio de este genotipo.
Por otro lado, se ha constatado la presencia concomitante de otros virus, excepto para adenovirus en los que las muestras positivas para rotavirus no se correlacionaron con un porcentaje significativamente mayor de muestras positivas a adenovirus, por lo que indicaría que adenovirus es un buen indicador de contaminación fecal pero no así indicador de infección viral por otros virus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mayr C, Strohe G, Contzen M. Detection of rotavirus in food associated with a gastroenteritis outbreak in a mother and child sanatorium. International Journal of Food Microbiology 2009; 135,179-182
2. Blackhall J, Fuentes A, Magnusson G. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. Virology 1996; 225,181-90.
3. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Korsun N, Kroneman A, Lappalainen M, László B, Maunula L, Matthinjnssens J, Midgley S, Mladenova Z, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, Steyer A, Sidaraviciute I, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M, de Rougemont A, Gray J. Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. J Infect Dis 2009; 200, S215-21.
4. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev Med Virol 2005; 15, 29-56.
5. Freeman MM, Kerin T, Hull J, McCaustland K, Gentsch J. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. J Med Virol 2008; 80, 1489-96.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto Europeo FP7 "VITAL" Contract No. 213178.

POSTERS

P90 EVALUATION OF EXTRACTION METHODS FOR EFFICIENT DETECTION OF ENTERIC VIRUSES IN PORK MEAT PRODUCTS

Mónica Martínez-Martínez[1], Marta Diez-Valcarce[1], Nigel Cook[2], Marta Hernández[1] and David Rodríguez-Lázaro[*]
[1] Laboratory of Molecular Biology and Microbiology. Instituto Tecnológico Agrario (ITACyL), Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain, marmarrm@itacyl.es
[2] Food and Environmental Virology Group, Food and Environmental Research Agency, York, United Kingdom.

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The incidence of foodborne diseases has increased worldwide during the last decades, becoming a major concern in public health. Foodborne pathogenic viruses can be present in different food matrices, and pork meat products could constitute a significant route of indirect zoonotic transmission of enteric viruses. Hepatitis E virus could be transmitted to humans by close contact with infected swine or from the consumption of contaminated raw or undercooked pork, wild boar liver or deer meat (Tei et al., 2003). A potential zoonotic transmission of NoV to humans through meat, dairy or farm samples from infected pigs and cows has been also suggested (Mattison et al., 2007).
Enteric viruses in food can be present in low levels, and furthermore some pathogenic viruses are non-cultivable, so their detection in foods usually relies on molecular methods. Food components or extraction reagents can be PCR inhibitors, and consequently can produce underestimation of the viral load or even false-negative results. Pork meat and pork products have a high fat content that can interfere with nucleic acid extraction and inhibit the subsequent detection step. The aim of this study was to evaluate the performance of three different protocols to extract and purify viral nucleic acids from different pork meat matrices. An in-house protocol and two commercial kits (RNeasy Mini Kit, Qiagen, and NucliSens, bioMérieux) were evaluated in three pork meat products with different compositions and fat contents. In order to evaluate the performance of the extraction for different enteric viruses, murine norovirus and human adenovirus were selected as model viruses.

MATERIALS AND METHODS

In 3 independent experiments, 25 grams of each food matrix (cooked ham, pig liver or Spanish fermented sausage "chorizo") were taken from three different locations and were homogenized using sterile surgical blades. 50 µl of viral ten-fold serial dilutions down to a final concentration of 10^3 pfu/ml for MNV-1 and 10^2 pfu/ml for HAdV-2 were added to the surface of 0.25 (pig liver, cooked ham or "chorizo"), 1 or 2.5 g (pig liver) of homogenized product and allowed to be adsorbed. As negative control, 50 µl of sterile water were also used to spike one sample in each experiment.
Lysis was performed in a mechanical disruptor using sterile 1 mm zirconia beads and the corresponding lysis buffer. Lysis buffer for in-house protocol consisted on 4 M guanidine thiocyanate; 0.5% *N*-Lauroylsarcosine sodium salt and 25 mM sodium citrate pH 7.0 supplemented with 0.14 M β-mercaptoethanol. RLT buffer supplemented 0.14 M β-mercaptoethanol and NucliSens (bioMérieux) lysis buffer were used for RNeasy and NucliSens magnetic extraction protocols respectively. Clarificated aqueous phase from lysis step was employed for NA extraction. For the in-house protocol this was performed by adding Trizol and chloroform. Recovered

aqueous phase was extracted with the same volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol, and then with the same volume of chloroform. RNA precipitation was performed by adding 0.1 volumes of 5 M lithium chloride and incubating for 4 hours at -20ºC. Pellets were washed with ice cold 70% and resuspended in 50 µL of DNase/RNase free water For RNeasy and NucliSens methods, unless otherwise stated, manufacturer's instructions were followed, and final elution was performed in 50 µl of DNase/RNase free water and in 50 µl of elution buffer respectively.
MNV-1 RNA and HAdV-2 DNA were detected using previously published qRT-PCR and qPCR assays respectively (Baert et al., 2008; Hernroth et al.,2002). All reactions were performed in triplicate and included Non Template Controls (NTC) and non-spiked pork meat samples.

RESULTS AND DISCUSSION

The developed in-house method was effective in facilitating a quantitative detection of the two viruses in the three products assayed. The linearity (R^2 ≥0.99) and the PCR efficiency (E ≥0.91) demonstrated an accurate quantification down to 50 (MNV-1) and 5 (HAdV-2) pfu/reaction, in a dynamic range of at least 4 logs when 0.25 g spiked samples were assayed. Interestingly, the performance was similar irrespectively of the food matrix assayed. However, RNeasy minikit was not suitable for quantitative detection of MNV-1, while it was useful to quantify HAdV-2 in spiked pig liver in a dynamic range of 3 logs with linearity and efficiency values similar to those obtained with the in-house method. NucliSens extraction protocol showed a suitable performance for quantitative detection of MNV-1 in artificially spiked pig liver in a dynamic range of 3 logs (R^2 value was almost the same as for the in-house protocol, and efficiency was slightly lower).
A critical aspect in the design of molecular diagnostic methods for enteric viruses in foods is the achievement of low detection limits (LOD), *i.e.* analytical sensitivity. The practical detection limits using the three different protocols were established around 50 and 10 pfu per sample (200 and 40 pfu/gram), for MNV-1 and HAdV-2 respectively (Table 4). These results are very similar to those achieved in other studies (14 HAV pfu/g in tomato sauce and 33 HAV pfu/g in strawberries) (Love et al., 2008). Cooked ham and pig liver have similar fat contents (around 4%) while the fat content of Spanish fermented sausage is around 10 times higher. Consequently, the nucleic acid extraction protocol described here can reduce the PCR inhibition effect of fat content since similar limits of detection were achieved in pork products with different fat compositions. However, a lower detection limit was observed when liver was assayed, due to the presence of PCR inhibitors (Al-Soud et al., 2005; Wallace et al., 2000). Finally, the limit of detection of HAdV-2 was 10 times higher than that of MNV-1 independently of the pork meat matrix assayed using the in-house or NucliSens protocols. This could be explained due to a less reliable isolation of intact viral RNA genomes in comparison with DNA, as well as by the need of an additional RT step.
As only the in-house protocol provided quantitative data for both viruses in all the matrices assayed, only this protocol was subjected to scale up. The performance of the in-house method was similar to that achieved with 0.25 g when 1 gram of pig liver was analyzed. Additionally the method allowed non quantitative viral RNA detection (down to 500 pfu/reaction) in 2.5 g of spiked pig liver samples, and furthermore adequate quantitative detection of viral DNA down to 500 pfu/sample. It can be due to an increased concentration of PCR inhibitors at the end of the extraction and purification.

CONCLUSIONS

The study remarks the need for improved extraction and purification methods to detect foodborne viruses in meat matrices. In the present work, commercial methods did not provide robust results being the in-house method the only able to produce results than can be used for QVRA irrespectively of the matrix or virus assayed. The method was suitable to be coupled with quantitative q(RT-)PCR in all products, not only when 250 mg were analyzed, but also for 1-gram samples facilitating the quantitative detection of viral contamination in foods when it occur at low doses. The results on the present work also support the use of TriZol-based protocols for recovery of foodborne viruses from internally contaminated pork meat matrices. Furthermore, this in-house method is at least five times cheaper than those based on commercial kits and it can be performed in a single day.

REFERENCES

1. Al-Soud, W.A., Ouis, I.S., Li, D.Q., Ljungh, S., and Wadstrom, T., 2005. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 44, 177-182.
2. Baert, L., Wobus, C.E., Van Coillie, E., Thackray, L.B., Debevere, J., and Uyttendaele, M., 2008. Appl. Environ. Microbiol. 74, 543-546.
3. Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., and Allard, A.K., 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4523-4533.
4. Love, D.C., Casteel, M.J., Meschke, J.S., and Sobsey, M.D., 2008. Int. J. Food Microbiol. 126, 221-226.
5. Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., and Farber, J.M., 2007. Emerg. Infect. Dis. 13, 1184-1188.
6. Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., and Mishiro, S., 2003. Lancet 362, 371-373.
7. Wallace, D.J., Van Gilder, T., Shallow, S., Fiorentino, T., Segler, S.D., Smith, K.E., Shiferaw, B., Etzel, R., Garthright, W.E., and Angulo, F.J., 2000. J. Food Prot. 63, 807-809.

AGRADECIMIENTOS

This work was supported by the EU VITAL project Contract No. 213178.

P162 OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE RT-PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCION Y CUANTIFICACIÓN DE HAV Y NOV EN PRODUCTOS CARNICOS

Alejandro Rodrigo, David Tomás y Sonia Marco
[1]*Departamento de Bioensayos, ainia centro tecnológico. C/ Benjamin Franklin, 5-11, 46980, Valencia.*
argil@ainia.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El número y tipo de virus que potencialmente pueden hallarse en productos cárnicos es elevado, por lo que el desarrollo y aplicación de un método analítico adecuado a este tipo de productos es un aspecto fundamental en seguridad alimentaria. El objetivo que se pretende lograr en este estudio es la optimización de una metodología de análisis rápida, sensible, robusta y específica para la detección y cuantificación mediante PCR a tiempo real de virus RNA de interés en seguridad alimentaria tales como norovirus (NoV) y virus de la hepatitis A (HAV). Para ello se testaron distintos tampones de extracción viral y se probaron sobre distintos productos cárnicos utilizando el virus mengo (cepa cedida por Albert Bosch) como modelo. Finalmente, el método aplicado se validó sobre distintas matrices cárnicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la optimización del método analítico se utilizaron 25g de diversos productos cárnicos tales como jamón cocido, chopped, salchichón y chorizo. Para ello se adquirieron dichos productos en distintos establecimientos y se inocularon artificialmente con NoV genogrupo I y II y virus HAV. Los inóculos utilizados se cuantificaron mediante unidades de RT-PCR en el caso de norovirus y en $TCDI_{50}$ para el virus HAV, depositándose en gotas de 10 µl sobre la superficie de los productos analizados. Las muestras inoculadas se mantuvieron 1 hora previamente a su análisis para facilitar la absorción del inóculo. Como tampones de extracción viral se testaron TGBE (tris glicina extracto de ternera) al 1 y 3% y tampón glicina utilizando como virus modelo para estudiar la eficiencia de extracción el mengovirus. La extracción del ARN viral se realizó mediante disrupción con tiocianato de guanidino y adsorción del ARN viral a partículas de sílice magnética. Las condiciones de amplificación y concentración de reactivos de la RT-PCR fueron los recomendados por el CEN/TC275/WG6/TAG4.

Para la validación del método se utilizaron productos cárnicos cocidos (jamón cocido) y productos curados (chorizo). El número de muestras analizadas en total fue de 24 con inóculos que fueron entre $5.0x10^3$-$1.0x10^2$ URT-PCR para el caso de norovirus y entre $2.0x10^2$-$2.0x10^1$ $TCDI_{50}$ para HAV. Los ensayos se realizaron en 2 tandas de inoculación y cada muestra se analizó por duplicado. Para la cuantificación de las muestras se utilizaron rectas de calibración con ADNdc obtenido a partir de la clonación del fragmento de amplificación en células de *E. coli* quimiocompetentes. Para el cálculo del límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se obtuvieron para cada tipo de matriz 4 resultados obtenidos a partir de 2 réplicas independientes que se inocularon en valores próximos al límite de detección. Para ello, haremos diluciones en torno ese valor e inocularemos las muestras para proceder a su análisis. Si hay señal en algunas de estas diluciones estimaremos el valor, su desviación estándar (S_0) y a partir de ahí el LOD ($3.3S_0$) y LOQ ($10\ S_0$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con los diversos tampones de extracción viral testados no mostraron diferencias significativas entre ellos seleccionándose el TGBE al 1% para el estudio de validación. Respecto a las eficiencias de extracción viral obtenidas sobre jamón cocido y chorizo variaron entre un 5 y un 14% por lo que en todos los casos fue superior al 1% mínimo indicado por el CEN/TC275/WG6/TAG4.

Las pendientes y coeficientes de correlación de las rectas de calibración obtenidos durante el estudio de validación tanto para NoV como HAV mostraron valores cercanos a -3.32 y 0.99 respectivamente por lo que en todos los casos fueron adecuadas. El estudio de validación mostró los siguientes LOD y LOQ expresados en copias de genoma/g de producto:

	HAV	NoV-GI	NoV-GII
LOD	JC: $5.0x10^0$ Ch: $3.7x10^0$	JC: $3.0x10^1$ Ch: $7.5x10^1$	JC: $2.0x10^1$
LOQ	JC: $1.0x10^1$ Ch: $9.0x10^0$	JC: $6.2x10^1$ Ch: $2.2x10^2$	JC: $4.7x10^1$

JC: jamón cocido
Ch: chorizo

CONCLUSIONES

El método optimizado de RT-PCR a tiempo real aplicado a productos cárnicos basado en las indicaciones del grupo CEN/TC275/WG6/TAG4 a resultado satisfactorio para el análisis de productos cárnicos cocidos y curados con valores de LOD y LOQ similares en ambos productos. Dichos valores han sido inferiores en el caso de HAV, con valores algo superiores para los norovirus genogrupo I y II.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR- Part 1: method for quantitative determination.

Morton, V. et al. Detection of noroviruses in ready- to-eat foods by using carbohydrate magnetic beads. Appl. Envir. Microbiol., july 1, 2009; 4641-4643.

Malek, M. et al. Outbreak of norovirus infection among rivers rafters associated with packaged delicatessen meat. Clin. Infect. Dis. 48: 31-37, 2009.

OTRA

POSTERS

P71 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE LEVADURAS EPIFÍTICAS DE CIRUELAS CON APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA EN LA DEGRADACIÓN DE GLICEROL

Paula García-Fraile[1], Luis R. Silva[2], Salud Sánchez-Márquez[3], Pedro F. Mateos[1], Eustoquio Martínez-Molina[1], Paula Andrade[2], Encarna, Velázquez[1] y Raúl Rivas[1]*

[1]Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Plaza Doctores de la Reina, s/n, 37007, Salamanca raulrg@usal.es

[2]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University. R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal.

[3]Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las levaduras se encuentran entre los más típicos microorganismos epifíticos. Las flores y frutas son algunos de los hábitats más habituales e importantes en los que se desarrollan, debido principalmente a la gran cantidad de azúcares sencillos que contienen y a su bajo pH. Estas condiciones, hacen que las levaduras sean, en gran parte, las responsables de la fermentación de la fruta cómo consecuencia de sus actividades metabólicas. En los últimos años, las particulares capacidades fermentativas de las levaduras, han sido utilizadas en procesos biotecnológicos tales como la producción de biocombustibles, éste es el caso de la producción de bioetanol. Del mismo modo, las capacidades de las levaduras también pueden ser utilizadas para resolver problemas ocasionados por la producción de otros biocombustibles como el biodiesel. Una de las principales preocupaciones en relación con la producción de biodiesel es la obtención de grandes cantidades, en torno al 10%, de glicerol como subproducto mayoritario. Esta situación provoca el descenso de los precios del glicerol y la acumulación de esta sustancia que pasa a tener connotaciones contaminantes. La conversión del glicerol en productos de alto valor añadido representa una oportunidad para solventar los problemas que han surgido en los últimos años. Estudios recientes relacionan especies de *Yarrowia, Candida* y *Rhodotorula* con la producción de ácido cítrico y otros compuestos a partir de glicerol (Papanikolaou *et al*., 2002). Los objetivos de este estudio fueron la identificación de cepas de levaduras epifíticas de ciruelas utilizando métodos moleculares y fenotípicos y la evaluación de su potencial como cepas biotransformadoras de glicerol.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de ciruelas fueron recogidas en supermercados del área de la ciudad de Salamanca. Los frutos maduros se colocaron de manera aséptica en un vaso de vidrio estéril recubierto con una doble capa de papel de aluminio. Se desinfectó la superficie de los frutos con lejía comercial diluida (1:10 en agua destilada) durante 2 minutos. A continuación, se eliminaron los restos de lejía y se machacaron los frutos manteniéndose en agitación constante en agua Milli-Q estéril durante 8 horas. Posteriormente, se aislaron las levaduras inoculando diversas diluciones de la muestra inicial sobre un medio específico con glicerol (YNB-GLY: 7 g/l de medio base nitrogenado para levaduras, Difco; 7 g/l de glicerol, Panreac; 20 g/l de agar, Scharlau) que contenía 500 mg/l de cloranfenicol.

Para la identificación de los aislados se empleó la secuenciación de la región ITS1- 5.8S rRNA-ITS2. La extracción del ADN se realizó utilizando un kit comercial (REdExtract-N-Amp Plant PCR, Sigma Aldrich). La región 5.8S-ITS fue amplificada mediante PCR con 2 µl del extracto de ADN y 3 µl (0,5 µM) por cada uno de los oligonucleótidos ITS4 (3´ TCCTCCGCTTATTGATATGC 5´) e ITS5 (5´ GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3´). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: 95º C durante 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94º C durante 1 minuto, 54º C durante 1 minuto, y 72º C durante 1 minuto; tras estos ciclos la reacción fue mantenida a 72º C durante 10 minutos. El amplicón obtenido tras la PCR fue purificado mediante filtración (MSB Spin PCRapace, Invitek), y secuenciado en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad de Salamanca, utilizando en kit "Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" y usando un equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem®, EE.UU.).

Del mismo modo, se procedió a realizar una caracterización de los aislados utilizando el kit comercial para identificación de levaduras de alimentos API 32C (Bio Merieux), que fue inoculado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por último, evaluamos la producción de ácidos orgánicos obtenida por nuestros aislados a partir de glicerol como única fuente de carbono. El análisis se realizó con la técnica HPLC/UV. Para ello, las cepas se mantuvieron creciendo durante 15 días a 24ºC en medio YNB-GLY sin agar ni cloranfenicol. Una vez crecidas, concentramos 5 ml del medio que fue disuelto con 200 µL de H_2SO_4 a 0.01 N y posteriormente lo filtramos. 20 µL de la muestra acidificada fueron inyectados en la unidad HPLC (Gilson) usando una columna Nucleogel® Ion 300 OA (300 × 7.7 mm). La elución se llevó a cabo, con un caudal de disolvente de 0,2 mL / min, isocráticamente, con ácido sulfúrico 0,01 N como fase móvil. La detección se realizó con un detector UV a 214 nm. La cuantificación se realizó en relación con estándares externos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 12 cepas de levaduras, capaces de utilizar el glicerol cómo única fuente de carbono, fueron aisladas de las muestras de ciruelas maduras. Los aislados se nombraron como: CIR01, CIR02, CIR03, CIR04, CIR05, CIR06, CIR07, CIR08, CIR09, CIR10, CIR11 y CIR14. Obtuvimos secuencias parciales de entre 480-550 pb de la región 5.8S-ITS de todos los aislados. Las secuencias obtenidas mostraron que los aislados pertenecían a 3 especies diferentes. Por un lado, las cepas CIR01, CIR03, CIR05, CIR07, CIR08, CIR09 y CIR11 presentaron una secuencia idéntica de la región 5.8S-ITS entre ellas y, a su vez mostraban un 100% de similitud con la secuencia de la especie tipo *Wickerhamomyces anomalus* CBS 5759^T (antes *Pichia anomala*) por lo que pudieron ser identificadas como *Wickerhamomyces anomalus,* una levadura que ha sido aislada de múltiples hábitats, incluidos los jugos de frutas, por lo que es lógico que aparezca cómo epífito en ciruelas, además cepas de esta especie han demostrado ser un buen agente para controlar patógenos de frutas como por ejemplo *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en melón (Wang *et al.*, 2009). El segundo grupo de cepas lo formaban CIR02, CIR04, CIR06 y CIR14 que presentaron una secuencia idéntica de la región 5.8S-ITS entre ellas y, a su vez mostraron un 100% de similitud con la secuencia de la especie tipo *Candida oleophila* CBS 2219^T por lo que fueron identificadas como *Candida oleophila.* Por último, la cepa CIR10 presentó una similitud del 100% en la región 5.8S-ITS con la especie tipo *Pichia fermentans* CBS 1876^T por lo que fue identificada como *Pichia fermentans.* Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación del 5.8S-ITS fueron comparados con los obtenidos mediante el uso del API 32C para todos nuestros aislados y que está destinado a la identificación de levaduras de alimentos. En primer lugar, las cepas identificadas como *Wickerhamomyces anomalus* de acuerdo con la secuencia de la región 5.8S-ITS, con el API ID32C fueron identificadas con un 99,9% de probabilidad como *Candida pelliculosa* que es el teleomorfo de *Pichia anomala* (actualmente *Wickerhamomyces anomalus)* por lo que ambos métodos son concordantes. La cepa identificada como *Pichia fermentans* de acuerdo con la secuencia de la región 5.8S-ITS, con el API ID32C fue identificada con un 99,9% de probabilidad como *Candida lambica* que es el anamorfo de *Pichia fermentans* por lo que de nuevo ambos métodos son concordantes. Sin embargo, las cepas identificadas como *Candida oleophila* de acuerdo con la secuencia de la región 5.8S-ITS, con el API ID32C fueron identificadas como *Candida sake* en un 93,8%, esta incoherencia nos hace pensar que en ocasiones pueden existir errores a la hora de identificar un aislado dependiendo del método utilizado, la identificación molecular permite una identificación más precisa ya que, todas las secuencias de las cepas tipo de todas las especies de levaduras, están depositados en bases de datos públicas por lo que la identificación es rápida, sencilla y sobre todo segura.

Una vez identificados nuestros aislados, procedimos a examinar qué tipo de sustancias eran producidas a partir de la degradación del glicerol y comprobamos que todos nuestros aislados producían ácidos orgánicos, entre los que se encontraban el ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético. El ácido cítrico y el ácido acético fueron producidos por gran parte de los aislados en cantidades que variaban entre los 500 mg/l a los 1400 mg/l, en el caso del ácido cítrico, y entre 700 mg/l y 4500 mg/l, en el caso del ácido acético. La cepa CIR14 produjo aproximadamente 350 mg/l de ácido oxálico mientras que el ácido láctico fue producido por gran parte de los aislados.

CONCLUSIONES

Las especies *Wickerhamomyces anomalus, Candida oleophila* y *Pichia fermentans* pueden encontrarse como levaduras epifíticas de frutos de ciruela donde no causan síntomas patogénicos aparentes. Además, cepas de estas especies pueden ser aplicadas en procesos biotecnológicos para la degradación de glicerol y obtención de productos de valor añadido tales cómo ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético como subproductos del proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Papanikolaou, P., Muniglia, L., Chevalot, G., Aggelis, G., and Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. Journal of Applied Microbiology, 92: 737–744.

Xiaodong Wang, Guoqing Li, Daohong Jiang and Hung-Chang Huang. (2009). Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. Biological Control, 50 (2): 164-171.

P80 CRECIMIENTO DE CEPAS DE *PENICILLIUM ROQUEFORTI* DEL QUESO DE CABRALES Y COMPARACIÓN CON EL DE CEPAS COMERCIALES

Baltasar Mayo[1*], *César O. Ferreira*[1,2], *Benjamín Paredes*[2] *y Mario Díaz*[2]

[1]*Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Carretera de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, y* [2]*Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias; baltasar.mayo@ipla.csic.es*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Muchas especies de mohos son capaces de crecer en los alimentos causando su deterioro. En otros casos, los mohos de los alimentos llegan a producir intoxicaciones alimentarias o reacciones alérgicas (Pitt y Hocking, 1997). Por el contrario, el crecimiento de algunas especies es indispensable para la transformación de diversas materias primas en una enorme variedad de productos elaborados. En estos casos, los hongos y sus actividades son responsables de los cambios que diferencian la materia prima del producto final.

Los mohos son esenciales en la maduración de los quesos de tipo Brie y Camembert (en los que el moho forma una película blanca que recubre la superficie del queso) y en la de los quesos azules (en los que los mohos crecen en el interior dándoles una tonalidad verde-azulada) (Gripon, 1999). *Penicillium camemberti* es el hongo más

característico de los quesos del primer grupo, mientras que el hongo más típico de los quesos azules es *Penicillium roqueforti*. Los mohos son responsables, en primera instancia, del aspecto externo y al corte de los quesos, características que los hacen inconfundibles. Pero además, la maduración de éstos se produce gracias a las potentes actividades enzimáticas de los mohos y, en especial, debido a la extensiva proteolisis y lipolisis que causan. Estos procesos generan un gran número de compuestos de flavor específicos que determinan las características organolépticas y reológicas diferenciales de los quesos enmohecidos. Debido a este papel fundamental, esporas de cepas seleccionadas de estos mohos se utilizan habitualmente como fermentos de maduración.

Por varios motivos, el queso de Cabrales es el queso tradicional más importante de los quesos asturianos y uno de los más conocidos de España. Este queso cuenta con Denominación de Origen Protegida (DOP) desde el año 1981 y está emparentado con otras variedades azules que se elaboran en el mismo entorno: Bejes-Tresviso, Valdeón y Gamonedo. La característica distintiva de todos ellos es el crecimiento en su interior del hongo *P. roqueforti*, responsable del aspecto y de gran parte de las cualidades sensoriales del queso maduro.

Nuestro grupo ha participado de forma reciente en la caracterización microbiana del queso de Cabrales (Flórez y col., 2006), fruto de la cual dispone de diversas cepas de esta especie (y de otras) (Flórez y col., 2007) que pudieran ser útiles como componentes de un fermento específico completo (compuesto de microorganismos acidificadores y de maduración). La utilización de dicho fermento impediría las fluctuaciones del desarrollo fúngico en la masa del queso y evitaría la formación de aromas y sabores extraños. El empleo racional de estos fermentos exige conocer las características funcionales básicas de las cepas y predecir el crecimiento del moho en las condiciones (de temperatura, acidez, concentración de sal) de maduración.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han seleccionado 5 cepas de *P. roqueforti* aisladas del queso de Cabrales (1AM8, 3AM8, 3AM11, 3AM16 y 3AM17) y 3 cepas comerciales de la casa Chr. Hansen (PB6, PR3 y PRG3). Además, y a modo de comparación, se estudian también dos cepas de la especie *Geotrichum candidum* (1AM3 y 3AM4), aisladas del Cabrales en niveles similares a los de *P. roqueforti*. De todas ellas se obtuvieron esporas tras crecimiento en placas de MEA durante 5-7 días a 25ºC. Las esporas se utilizaron para la inoculación (10 µl) de las placas en tres posiciones de las placas (Figura 1). Las actividades proteolíticas y lipolíticas de las cepas autóctonas y comerciales se ensayaron en placas de agar leche, y agar tributirina y agar aceite de oliva, respectivamente. El crecimiento de las cepas se ensayó en las siguientes condiciones de temperatura (4ºC, 8ºC, 12ºC, y 25º), pH (4.0, 5.0, 6.0 y 6.5) y concentración de sal (1%, 2%, 4%, 6%, 8% y 10%). En estos ensayos se han utilizado como medios de cultivo Malt Extrac Agar (MEA) y en Complete Medium (CM). El crecimiento se evaluó de forma diaria mediante la medida del diámetro de la colonia.

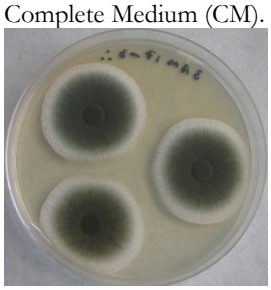


Figura 1.- Aspecto de *P. roqueforti* 3AM17 en medio CM tras 7 días de crecimiento a 25ºC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas mostraron una enorme variabilidad en el crecimiento en las distintas condiciones ensayadas; condiciones que recrean las que se encuentran a lo largo de la maduración del queso. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se representa la media del crecimiento de las 10 cepas a lo largo del tiempo en medio CM adicionado con un 2 y un 10% de cloruro sódico. Pequeñas concentraciones de sal estimularon el crecimiento (1-2%) respecto del control sin cloruro sódico, mientras concentraciones superiores resultaron inhibitorias aunque de manera muy diferente para cada cepa.

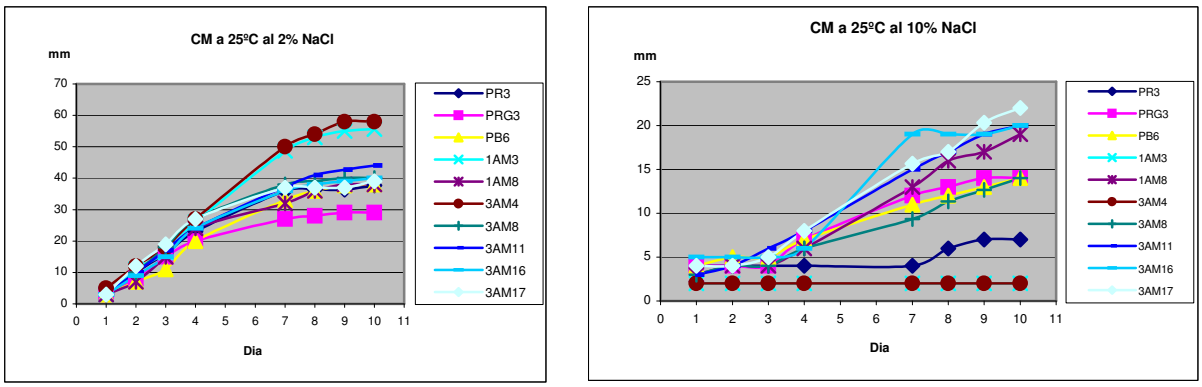


Figura 2.- Crecimiento de las cepas en medio CM en placas con un 2% y un 10% de cloruro sódico, respectivamente. (Nótese el diámetro máximo de las colonias en las distintas concentraciones de sal).

CONCLUSIONES

1.- Las cepas autóctonas del queso de Cabrales y las cepas comerciales mostraron una gran variabilidad fenotípica bajo las condiciones de ensayo.

2.- En algunas condiciones las cepas del queso de Cabrales parecen desarrollarse mucho mejor que las cepas comerciales.

3.- Antes de su utilización en la elaboración de queso, las cepas salvajes de *P. roqueforti* deberán someterse a una evaluación de seguridad (en particular para la producción de micotoxinas).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gripon, J.-C. 1999. Mould ripened cheeses. In, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Major Cheese Groups*. P. F. Fos (Ed.). Vol. II. (2nd Ed.). pp. 111-136. Chapman and Hall, London.

Flórez, A.B., López-Díaz, T.M., Álvarez-Martín, P., y Mayo, B. 2006. Microbial characterisation of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology,* 223: 503-508.

Flórez, A.B., Álvarez-Martín, P., López-Díaz, T.M., y Mayo, B. 2007. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese and technological characterisation of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* strains. *International Dairy Journal,* 17: 350-357.

Pitt, J.I., y Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.

P207 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS NATIVOS DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE OBTENCION DEL QUESO PAIPA.

Alfredo López-Molinello[1]y María Ximena Cárdenas[2]

[1]Programa de ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería. Universidad de La Salle. Cra. 5 N°. 59A-44, Bogotá,Colombia, alopez@unisalle.edu.co.

[2]Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera7 N°43-82, Bogotá, Colombia.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El queso paipa es el único queso típico colombiano que incluye un proceso de maduración. Se produce especialmente en el departamento de Boyacá en los municipios de Paipa, Belén, y Cerinza y en el departamento de Cundinamarca en los municipios de Pacho y Ubaté (Banco ganadero, 2004). Debido a que su preparación se realiza artesanalmente a partir de leche cruda y que los tiempos de maduración no son cumplidos, su calidad microbiológica durante y al final del proceso es deficiente trayendo con esto potenciales inconvenientes tanto en el mercadeo del producto como en la salud del consumidor (Neira y Silvestri 2006). Una posible solución a este problema es aislar los microorganismos que intervienen en los procesos de fabricación y maduración del queso, pasteurizar la leche y adicionarlos posteriormente para obtener un producto con las mismas características organolépticas originales y una calidad microbiológica aceptable. Por esta razón Neira y Hernández (2008) aislaron y caracterizaron las bacterias lácticas presentes en el queso Paipa. Sin embargo, no son los únicos microorganismos implicados en los procesos de fabricación y maduración de los quesos. Además de este tipo de bacterias se encuentran varios géneros de hongos (filamentosos y levaduriformes) que actúan como flora secundaria y ayudan a dar las características organolépticas específicas a este tipo de quesos (Beresford el al 2001, Hayaloglu y Kirbag, 2007). Por lo anterior, en este trabajo se pretendió aislar e identificar la microbiota fúngica involucrada en el proceso de obtención de queso Paipa, con el fin de producir un cultivo iniciador que pueda ser utilizado en un futuro, junto a las bacterias lácticas, por los productores y que permita obtener un queso Paipa con las mismas características y una adecuada calidad microbiológica. Este cultivo después de ser evaluado y conservado, también tendrá la posibilidad de ser ensayado para la fermentación de otro tipo de productos alimenticios.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se utilizaron muestras de leche cruda y queso paipa fabricados en los municipios de paipa y belén (boyacá) y pacho (cundinamarca) de cada municipio se ubicaron 2 productores representativos de queso Paipa y se recolectaron muestras de queso por triplicado de de 1, 5 y 10 días de maduración así como una muestra leche cruda. Se realizaron diluciones de las muestras hasta 10^{-4} las cuales se sembraron en profundidad por duplicado utilizando agar extracto de malta (Oxoid Ltd.), para la identificación de hongos filamentosos y agar YGC para levaduras. La incubación se realizó entre 25-30 ºC por 5-7 días. Los aislamientos obtenidos se subcultivaron, bajo las mismas condiciones hasta la obtención de cultivos puros (Samson, 2004). Posteriormente se procedió a la observación macroscópica de las colonias teniendo en cuenta color anverso, color reverso, textura y presencia de pigmento difusible. Se realizó la identificación microscópica de las colonias vistas utilizando un montaje con azul de lactofenol (Merck), para identificar las diferentes estructuras de los hongos filamentosos en especial estructuras vegetativas y estructuras de reproducción según claves Samson (2004). Para la identificación macroscópica de las levaduras se observaron características propias de las colonias como la apariencia, textura, color, borde, tamaño, producción de pigmento y se realizó una identificación microscópica inicial utilizando coloración tinta china para observar posible presencia de cápsula. La identificación bioquímica, se realizó usando los kits: API 20 C aux ®(bioMérieux) y Rapid Yeast Plus®(Remel) basados en reacciones de turbidez y colorimetría respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media $\log_{10}$ del recuento hongos filamentosos por gramo en el queso durante el proceso de maduración estuvo dentro del rango de 1.4 y 4.7, teniendo en cuenta que los conteos más altos estuvieron en los quesos con mayor

tiempo de maduración, como fue reportado también por Viljoen et al (2003) y Hayaloglu y Kirbag(2007). Las diferencias entre los recuentos obtenidos en los diferentes municipios se debe posiblemente a los cambios climáticos que ocurren a través del año y que afectan la humedad ambiental (Laurencik et al, 2008). El aumento en el recuento de hongos filamentosos y levaduras a medida que aumenta el periodo de maduración también ha sido descrito para diferentes quesos típicos de otros países como el Camembert y Brie (Viljoen et al 2003). A partir de las muestras de leche y queso, los análisis macroscópicos y microscópicos permitieron la identificación de nueve géneros de hongos filamentosos diferentes: *Geotrichum, Penicillium, Fusarium, Phoma Cladosporium, Aspergillus, Mucor, Ulocladium, Botrytis*. Algunos de estos son importantes en la maduración de un amplio rango de quesos, ya que durante los primeros días de la maduración, crecen sobre la superficie y la desacidifican oxidando el lactato y actuando en procesos proteolíticos, además poseen un complejo sistema de enzimas que contribuyen con la textura, color y sabor (Beresford et al, 2001). Sin embargo la presencia de otro tipo de especies es indeseable ya que pueden influenciar en las características organolépticas, además de producir micotoxinas (en especial el género *Aspergillus*) y representar un potencial riesgo para la salud (Torkar y Vengust, 2008). Cabe destacar que algunos hongos no se pudieron identificar ya que solo exhibieron micelio estéril o con presencia de clamidosporas (*Agonomycetes*).

Análisis macroscópicos permitieron obtener 17 cepas de levaduras, las cuales fueron evaluadas por reacciones bioquímicas mediante diferentes kits comerciales. Sin embargo solo se pudieron identificar: *Candida rugosa, Trichosporum beigelii, Cryptococcus albidus, Candida guilliermondii, Cryptococcus uniguttulatus, Rhodotorula minuta y Rhodotorula rubra***.** Los demás aislamientos posiblemente corresponden a un género y especie que no posee la batería de las pruebas bioquímicas. En cuanto a las levaduras encontradas estas también han sido reportadas como levaduras dominantes en quesos madurados (Viljoen et al, 2003). Estos organismos muestran una capacidad metabólica (incluyendo actividades proteolíticas y lipolíticas) las cuales juegan un papel substancial en el desarrollo de aromas y sabores en algunas cepas agradables (Beresford et al, 2001) y otras indeseables (Torkar y Vengust, 2008).

CONCLUSIONES.

Los géneros de hongos identificados en este trabajo también han sido reportados para otros tipos de queso madurados como responsables de otorgar sus características organolépticas. Sin embargo, también se presentan géneros que posiblemente son contaminantes y podrían llegar a convertirse en un problema de salud pública. Se espera realizar la caracterización molecular para determinar la especie de estos aislamientos y de esta forma descartar los patógenos y utilizar los benéficos para la posible elaboración de un cultivo iniciador que contribuya a la estandarización del proceso de obtención de un queso Paipa inocuo y de calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Banco ganadero e instituto de ciencia y tecnología de alimentos. guía para producción de quesos colombianos.colombia: banco ganadero, 1994. p. 7-11, 110-113.

Beresford T, Fitzsimons N, Brennan N, Cogan T. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal.* 11. 259-274.

Hayaloglu, A. Airbag, S. 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese *International Journal of Food Microbiology* 115 : 376–380.

Neira E, Silvestri J. 2006. Análisis del ordeño y de la calidad higienica de la leche utilizada en la fabricación del queso Paipa en el municipio Paipa (Boyacá), Colombia. Revista de investigación Universidad La Salle, Julio-Diciembre, año/vol.6 002.

Neira E y Hernández J. Aislamiento, identificación, conservación y caracterización molecular de bacterias ácido lácticas presentes en el queso Paipa. XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Quito, Ecuador, Octubre de 2008. ORAL.

Samson R, Hoekstra E. 2004. Introduction to food and airbone fungi. Septima edición. Editorial CBS. Holanda. 389 pp.

Viljoen B, Khoury A, Hattingh A. 2003. Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. Food Research International. 36: 275-283.

Laurenčík M, Sulo P, Sláviková E, Piecková E, Seman M,. Ebringer L. 2008. The diversity of eukaryotic microbiota in the traditional Slovak sheep cheese — Bryndza. International Journal of Food Microbiology 127: 176–179.

Torkar K, Vengust A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. Food Control. 19: 570-577.

AGRADECIMIENTOS

Sociedad Española de Microbiología (SEM)
Universidad de Valladolid (UVa)
Excmo. Ayuntamiento de Valladolid
Junta de Castilla y León (JCyL)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)

Agilent Technologies
Applied Biosystems
Bio-Rad
Biomerieux
Bioser
Bruker
Carburos Metálicos
DueroLab
Fisher Scientific
Laboratorios Conda-Pronadisa
MicroPlanet
NC Hiperbaric
Oxoid
Panreac
Prosisa
Roche
Sigma-Aldrich
Telstar

Industria gastronómica Cascajares
Microbial
Patatas Meléndez-El abuelo