



XIX CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

AVANCES EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS 2014

Santiago Condón, Diego García, Pilar Mañas, Javier Raso,
Rafael Pagán e Ignacio Álvarez (Eds.)



1542

Universidad
Zaragoza



Zaragoza, 24-26 de septiembre de 2014

XIX CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

AVANCES EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS 2014

Editado por:

Santiago Condón

Diego García

Pilar Mañas

Javier Raso

Rafael Pagán

Ignacio Álvarez

**Edificio Paraninfo
Universidad de Zaragoza**

© Los autores

Ilustración de la cubierta: Ignacio Álvarez Lanzarote

ISBN: 978-84-941181-7-3

Impreso en España

Imprime y edita: Gráficas Vela, S.L. Reino 38. 50003 Zaragoza

D.L.: Z-XXXX-2014

ÍNDICE

Carta de bienvenida	11
Comités	13
Programa de congreso	17
Conferencia inaugural	23
- Mecanismos de patogenicidad de <i>Salmonella</i> y <i>Campylobacter jejuni</i> : resultados similares para estrategias distintas. Jorge Galán.	25
SESIÓN I: Avances metodológicos en Microbiología de los Alimentos	27
- Biología molecular de comunidades microbianas y posibles aplicaciones en microbiología de alimentos. Daniel López.	29
- Uso de reactivos de viabilidad para la discriminación de la infectividad del HAV en muestras de alimentos. Gloria Sánchez y col.	32
- Cuantificación de la expresión génica de mohos productores de OTA en productos cárnicos crudos-curados mediante PCR en tiempo real. Alicia Rodríguez y col.	34
- Evaluación del uso de la tecnología VIS-NIR para el control <i>in situ</i> de la calidad microbiológica de la carne fresca de pollo. Natalia Prado Marrón y col.	36
- Detección de <i>Salmonella</i> spp. en huevos frescos mediante el método de PCR a tiempo real SureTect™. Belén Moreno y col.	38
- Secuencia y análisis del <i>locus</i> de la plantaricina C, lantibiótico producido por <i>Lactobacillus plantarum</i> LL441. Baltasar Mayo y col.	40
- Validación del nuevo método DryPlates®-XBC. Jorge Sanchis y col.	42
- Doble enriquecimiento simultáneo para detección de <i>Salmonella</i> . Jorge Sanchis y col.	44
- Aproximaciones moleculares al análisis de BAL asociadas a la producción de “atole agrio”, bebida fermentada de maíz originaria de Tabasco (México). A. Pérez y col.	46
- Detección mediante PCR en tiempo real de <i>Escherichia coli</i> productores de verocitotoxina (ECVT) en muestras de alimentos de la ciudad de Zaragoza. M. Asunción Lafarga y col.	48
- Detección y cuantificación de células viables de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> en vino por PMA-qPCR. Verónica Santos y col.	50
- Identificación de levaduras aisladas de lacón crudo-curado mediante PCR-RFLP y secuenciación de la región ITS-5.8S. M. Camino García-Fontán y col.	52
- Desarrollo de un método de extracción de ARN fúngico en alimentos para detectar mohos viables mediante PCR. Victoria Bernáldez y col.	54
- Desarrollo de la aplicación informática BioRCA 1.4 para el estudio de la estructura de los <i>biofilms</i> bacterianos. Rosa Capita y col.	56

SESIÓN II: La seguridad alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde distintas perspectivas I. 59

- La Seguridad Alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde la perspectiva de los Sistemas Sanitarios de Salud. Rosa del Campo. 61
- La Seguridad Alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde la perspectiva de los investigadores. Miguel A. Asensio. 63
- Actividades recientes de la EFSA sobre riesgos biológicos en seguridad alimentaria. Pablo Romero. 65
- La Seguridad Alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde la perspectiva de las industrias agroalimentarias. Blanca Jáuregui Arbizu. 67

SESIÓN III: La seguridad alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde distintas perspectivas II. 69

- Betalactamasas de espectro extendido en alimentos: prevalencia y estudio filogenético de cepas de *Escherichia coli*. Elena Ojer-Usó y col. 71
- Presencia y caracterización genotípica de *Staphylococcus* meticilina resistentes aislados a partir de queso fresco. Fanny Herrera Arias y col. 73
- Uso de bacteriófagos como bioconservantes frente a *Listeria monocytogenes* en zumos de frutas. Márcia Oliveira y col. 75
- Efecto inhibitorio de metabolitos y compuestos fenólicos de extractos de arándano rojo frente a la adherencia de *E. coli* uropatógena. Adelaida Esteban Fernández y col. 77
- Evaluación de la degradación de aminos biógenos por un extracto enzimático de *Penicillium citrinum* CIAL 274,760 en vinos a escala piloto de bodega. Irene Gil-Sánchez y col. 79
- Efecto de la radiación UV-A y UV-B en *Aspergillus* aislados de viñedos españoles. Esther García-Cela y col. 81
- Resistencia a biocidas y antibióticos en cepas procedentes de alimentos ecológicos adaptadas a crecimiento en presencia de triclosan. Elena Ortega y col. 83
- Inactivación de microorganismos patógenos en jamón cocido mediante tratamientos combinados de bioconservantes y altas presiones. Margarita Medina y col. 85
- Comportamiento de las esporas de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina. M^a del Camino García y col. 87
- Evaluación de factores que afectan al crecimiento de tipos patógenos de *Escherichia coli*. Jesús Ángel Santos Buelga y col. 89
- Eficacia de ingredientes naturales sobre virus entéricos. Gloria Sánchez y col. 91
- Producción de aminos biógenos por cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso. M. Eugenia Tornadizo y col. 93
- Caracterización de resistencias de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos en Navarra durante el periodo 2004-2013. María Díez-Leturia y col. 95
- Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de *Craterellus cornucopioides* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Eva Guillamón y col. 97
- Implementación de objetivos de seguridad alimentaria para la eliminación de *Salmonella* en Chorizo Asturiano. Natalia Prado Marrón y col. 99
- Evaluación de la producción de Ocratoxina A por *P. nordicum* y *P. verrucosum* en diferentes condiciones ambientales. Lourdes Sánchez-Montero y col. 101

- Prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en cepas de VRE aisladas de carne de pollo en España. Diana Molina-González y col.	103
- <i>Salmonella spp.</i> y <i>Campylobacter spp.</i> en productos cárnicos frescos. Zaragoza 2008-2013. M. Asunción Lafarga y col.	105
- Potencial uso del propóleo en combinación con calor para lograr la inactivación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en zumo de manzana. Adrián Luis y col.	107
- Inactivación térmica de diferentes patógenos alimentarios en medios de distinto pH y actividad de agua. M ^a J. Serrano y col.	109
- Riesgos sanitarios del consumo de potón (<i>Dosidicus gigas</i>). Rocío Lahoz y col.	111
- <i>Arcobacter butzleri</i> : Patógeno emergente de difícil diagnóstico. Condón Abanto A y col.	113
- <i>Clostridium difficile</i> : ¿Patógeno vehiculado por alimentos? Condón Abanto A y col.	115

SESIÓN IV: Biotecnología microbiana de los alimentos I. **117**

- Probióticos y microbiota intestinal. De dónde venimos y a dónde vamos. Clara G. de los Reyes-Gavilán y col.	119
- Los fructanos tipo inulina influyen sobre las especies de bifidobacterias intestinales y el perfil de ácidos grasos de cadena corta en mujeres obesas. Nuria Salazar y col.	122
- Efecto de una dieta alta en mantequilla sobre enterococos fecales y su relación con la presión arterial del hospedador. Marina Hidalgo y col.	124
- Clonación y caracterización de la proteína D2EK17 de <i>Pediococcus acidilactici</i> CECT 5930 con actividad degradadora de tiramina. Sara Callejón y col.	126
- Microbiota resistente a antibióticos en un queso tradicional e identificación de los genes responsables de la resistencia. Ana Belén Flórez y col.	128
- Selección y Optimización de las condiciones de producción de PHBs a partir de subproductos de Maíz y de Patata. Patricia Arrubla y col.	130

SESIÓN V: Biotecnología microbiana de los alimentos II. **133**

- Bacterias lácticas del vino y fermentación maloláctica. Albert Bordons.	135
- Capacidad de la microbiota oral humana para producir compuestos odorantes del vino a partir de precursores no odorantes de la uva. Carolina Muñoz-González y col.	138
- Inoculación de cepas de <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> en fermentaciones alcohólicas en la DOQ Priorat. Beatriz González y col.	140
- Interacciones entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> durante la vinificación. Olga Lucio y col.	142
- Mejora del crecimiento y la adaptación al estrés de <i>Oenococcus oeni</i> por la adición de glutatión. Maria del Mar Margalef y col.	144
- Efecto de una cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modificada genéticamente con actividad pectinolítica en vinos Cabernet Sauvignon. Mónica Fernández-González y col.	146
- Biodiversidad de cepas de <i>Hanseniaspora uvarum</i> en fermentaciones alcohólicas en la DOQ Priorat. Beatriz Padilla y col.	148
- Un nuevo medio de cultivo para la producción de cultivos iniciadores malolácticos de <i>O. oeni</i> . Carmen Berbegal y col.	150
- Interacciones entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Hanseniaspora uvarum</i> en fermentaciones alcohólicas. Chunxiao Wang y col.	152

- Estudio de la implantación de cepas de bacterias lácticas autóctonas en la elaboración de queso Manchego. Susana Seseña y col. 154
- Efecto de los aminoácidos aromáticos y sus compuestos derivados bioactivos sobre el crecimiento de diferentes levaduras vínicas. Jennifer Vázquez y col. 156
- Selección y caracterización de bacterias lácticas autóctonas de uvas y vinos del Priorato. Judit Franquès y col. 158
- Bioproducción de colorantes a partir de melaza de mandarina. Escalado y métodos de extracción. María Garrido y col. 160

SESIÓN VI: Retos microbiológicos en la industria alimentaria I. 163

- Descontaminación en canales. Elena González Fandos. 165
- *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. Antonio Español. 169
- *Toxoplasma gondii* en la industria cárnica. Susana Bayarri. 171
- Vida útil de lacón cocido loncheado envasado en atmósfera modificada. Marta Mourelle y col. 174
- Calidad microbiológica de la leche pasteurizada suministrada en máquinas expendedoras. Comunidad Autónoma del País Vasco. 2010-2013. Dolores Coll Jordá y col. 176
- Evaluación de *Debaryomyces hansenii* como cultivo protector para reducir la presencia de ocratoxina A en productos cárnicos madurados. Belén Peromingo y col. 178

SESIÓN VII: Retos microbiológicos en la industria alimentaria II. 181

- Impacto en la Salud Pública de una extensión en el periodo de almacenamiento del huevo cáscara. Pablo Romero. 183
- Desinfección de verduras mínimamente procesadas. Silvia García. 185
- Descontaminación de harinas y frutos secos. Nicolás Meneses. 188
- Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en pera mínimamente procesada en distintos estados de madurez. Pilar Colás y col. 189
- Luz UV-C como método de descontaminación de alimentos pulverulentos. Santiago Condón-Abanto y col. 191
- Efectividad de las defensas naturales del huevo contra la penetración de *Salmonella* spp. Arantxa Muñoz y col. 193
- Resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas en el aire de una granja de vacuno de leche. Susana Sanz y col. 195
- Origen de la contaminación de los vinos con *Brettanomyces*. Susana Sanz y col. 197
- Caracterización de cepas bacterianas resistentes a biocidas aisladas a partir de la industria láctea. M^a Luisa Fernández Márquez y col. 199
- Tolerancia a biocidas en aislados de *Salmonella* procedentes de productos cárnicos en Andalucía. Antonio Marín Garrido y col. 201
- Efecto protector de *Lactobacillus reuteri* INIA P572 frente a *Listeria monocytogenes* en queso. Izaskun Martín-Cabrejas y col. 203
- Incidencia de hongos con potencial toxigénico en muestras de piensos y materias primas. Rodrigo Vera y col. 205
- Evaluación de la microbiota de leche de yegua: aislamiento de cepas potencialmente probióticas. Gisela Girmé y col. 207

- Innovación y desafíos para la higiene en las industrias alimentarias. Ramón Bertó y col.	209
- Estudio de la descontaminación superficial de la flora natural del salmón. Selene Pedrós y col.	211
- Predicción de la vida útil de buey de mar (<i>Cancer pagurus</i>) pasteurizado a 75°C según las normas recomendadas por la FDA. Santiago Condon-Abanto y col.	213
- Selección de un antimicrobiano natural para la conservación del Potón del Pacífico (<i>Dosidicus gigas</i>). Virginia Ruiz y col.	215
- Condiciones mínimas de cocción del potón del pacífico (<i>Dosidicus gigas</i>). Virginia Ruiz y col.	217
- Modelización del tiempo máximo admisible de marinado del potón del Pacífico (<i>Dosidicus gigas</i>) a distintas temperaturas. Rocío Lahoz y col.	219
- Efecto de la concentración de nitrato y nitrito en la supervivencia de <i>Listeria innocua</i> y <i>Escherichia coli</i> inoculadas en jamón curado. Xavier F. Hospital y col.	221

SESIÓN VIII: Avances en fisiología microbiana de interés en microbiología de alimentos. 223

- Una mirada “positiva” a los biofilms bacterianos. Diego Romero.	225
- Respuestas adaptativas al estrés en microorganismos patógenos y sus implicaciones para la seguridad alimentaria. Avelino Álvarez-Ordóñez y col.	227
- Efecto sobre la síntesis de proteínas y mecanismo de acción de la proteína antifúngica PgAFP en <i>Aspergillus flavus</i> . Josué Delgado y col.	230
- Desarrollo de una metodología versátil para la cuantificación de biofilms formados en superficies sólidas expuestas a interfase aire-líquido. Sònia Paytubi y col.	232
- Análisis transcriptómico de <i>Escherichia coli</i> MG1655 tras exposición a pulsos eléctricos de alto voltaje. Beatriz Chueca y col.	234
- Efecto de la bomba de exporte EfrAB en la tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos en enterococos aislados de alimentos fermentados. Nabil Benomar y col.	236
- Resistencia a antibióticos y tolerancia a biocidas en Bacterias del Ácido Láctico aisladas a partir de aceitunas "Aloreña" fermentadas naturalmente. Nabil Benomar y col.	238
- Efecto de distintos factores enológicos sobre el crecimiento de cepas de <i>Oenococcus oeni</i> aisladas de mostos y vinos. L.E. Cruz-Pio y col.	240
- Efecto de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento de las bacterias acéticas. Florencia Sainz y col.	242
- Variación en los parámetros estructurales cuantitativos de los <i>biofilms</i> producidos por diferentes serotipos de <i>Salmonella</i> . Carlos Alonso-Calleja y col.	244
- Papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la superficie celular en la adaptación a biocidas de bacterias Gram-negativas. Alicia Alonso-Hernando y col.	246
- Biopelículas de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> : desarrollo e inhibición mediante compuestos constituyentes de aceites esenciales. Laura Espina y col.	248
- Formación de especies reactivas del oxígeno en <i>Escherichia coli</i> durante el tratamiento térmico. María Marcén y col.	250

SESIÓN IX: Tecnologías emergentes y microbiología predictiva I. 253

- Microbiología predictiva orientada a la integración en una evaluación de riesgos microbiológicos alimentarios. Pablo S. Fernández y col.	255
--	-----

- Perfil de temperaturas en refrigeradores domésticos. Impacto en la vida útil segura de productos cárnicos cocidos. Anna Jofré y col.	256
- Uso de modelos no lineales para caracterizar la termorresistencia de <i>Cronobacter sakazakii</i> . Juan Pablo Huertas y col.	258
- Aproximación probabilística de resultados microbiológicos de presencia/ausencia para determinar la concentración de <i>Salmonella</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i> en carne de cerdo. David Rodríguez Lázaro y col.	260
SESIÓN X: Tecnologías emergentes y microbiología predictiva II.	263
- Posibilidades y limitaciones del plasma frío para la conservación e higienización de los alimentos. Mercedes López Fernández	265
- Efecto combinado de nisina y D-limoneno sobre <i>Listeria monocytogenes</i> aplicados mediante nanoemulsiones. Javier Maté y col.	267
- Tratamiento combinado con luz ultravioleta y calor para la pasteurización de zumo de zanahoria natural. María Gouma y col.	269
- Inactivación de esporos de <i>Alicyclobacillus</i> spp. mediante tratamientos combinados de alta presión y temperatura en zumo de naranja. Sergio J. Ramos y col.	271
- Influencia de la temperatura del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en la permeabilización de <i>Chlorella vulgaris</i> . Elisa Luengo y col.	273
- Efecto de las altas presiones y de la composición química sobre la microbiota del jamón Serrano. Nerea Martínez-Onandi y col.	275
- Efecto combinado de calor y nisina en la inactivación de <i>Clostridium sporogenes</i> . María Ros-Chumillas y col.	277
- Evaluación de un sistema de envasado activo antimicrobiano para el control microbiológico de queso curado elaborado con leche cruda de oveja. Ana González-Vicente y col.	279
- Resistencia al calor de <i>Clostridium sporogenes</i> en condiciones no isotérmicas en tampón y caldo de ternera. M.-Dolores Esteban y col.	281
- Prevención de hinchazón tardía en queso Castellano mediante la reuterina producida <i>in situ</i> por <i>Lactobacillus reuteri</i> INIA P572. Natalia Gómez-Torres y col.	283
- Influencia de la variación de pH y temperatura, en la actividad antifúngica de un envase activo con canela en fase vapor. Sofía Manso y col.	285
- Eliminación de <i>Listeria monocytogenes</i> en quesos blandos madurados por mohos mediante radiación beta. Raquel Velasco y col.	287
- Efecto de los pulsos de luz en los parámetros de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> . Gonzalo García de Fernando y col.	289
- Estudio del efecto antimicrobiano de diferentes aceites de oliva y polifenoles sobre cepas intestinales. Antonio Cobo y col.	291
- Evaluación del efecto antimicrobiano de nanopartículas frente a levaduras enológicas. Lucía Polo y col.	293
- Efecto de mohos seleccionados sobre la población de ácaros en jamón curado. Aránzazu Picón y col.	295
- Presurización <i>versus</i> pasteurización en <i>smoothies</i> de fruta: calidad, seguridad y vida útil. Anna Jofré y col.	297
- Estudio de vida útil de dos cortes comerciales de carne de ternera envasada en atmósfera	299

modificada: Efecto del porcentaje de CO ₂ empleado. M.Camino García-Fontán y col.	
- Vida útil de platos preparados a base de carne envasados en atmósfera protectora enriquecida en CO ₂ . Sonia Español y col.	301
- Seguridad y calidad sensorial de platos preparados a base de pescado. Sonia Español y col.	303
- Inactivación de microorganismos patógenos por Plasma Atmosférico no Térmico: efecto de la velocidad del flujo y naturaleza del gas. Tamara Calvo y col.	305
- Estudio de resistencia de diferentes esporos bacterianos a tratamientos de alta presión en combinación con temperatura. Miriam Chiquirrín y col.	307
- Bioconservación de filete de pescado <i>Oreochromis niloticus</i> “Tilapia del Nilo” mediante el tratamiento combinado de Nisina y Ácido láctico. Juan Carlos Ramos Gorbeña y col.	309
- Cinéticas de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso curado de oveja en diferentes condiciones de almacenamiento. David Rodríguez Lázaro y col.	311
- Efecto de la pasteurización del buey de mar (<i>Cancer pagurus</i>) en el seno de un campo ultrasónico. Santiago Condon-Abanto y col.	313
- Efecto del Dimetil dicarbonato en la resistencia de <i>Escherichia coli</i> a un tratamiento combinado de luz ultravioleta y calor en zumo de manzana. Maria Gouma y col.	315
- Inactivación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 mediante la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje de mili y microsegundos. Santiago Condón-Abanto y col.	317
- Presencia de especies reactivas del oxígeno y permeabilización de la membrana en células de <i>Escherichia coli</i> tratadas con ozono. María Marcén y col.	319
Resumen Tesis Doctoral – Premio Oxoid	321
Premio especial del Grupo de Microbiología de los Alimentos 2014 para investigadores jóvenes del Grupo de Microbiología de los Alimentos de la SEM	329
Índice de autores	333

CARTA DE BIENVENIDA

Estimados colegas:

Hemos tenido el honor de ser invitados por el Grupo de Microbiología de los Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología para la organización de su XIX Congreso Nacional. Acometemos este encargo con entusiasmo y, por qué no decirlo, con cierta preocupación. Nos hemos propuesto organizar un Congreso abierto a la sociedad, pero sin perder las esencias que la ya larga tradición de nuestro grupo SEM ha consolidado. El Congreso de la SEM-Alimentos ha sido, es y debe seguir siendo una reunión eminentemente científica, pero la evolución de la sociedad obliga, cada vez más, a utilizarlo como foro de encuentro con otros agentes sociales interesados en la microbiología de los alimentos, especialmente los especialistas en salud pública y los técnicos de las empresas agroalimentarias.

La Microbiología de los Alimentos está experimentando notables cambios en los últimos años. Por una parte, desde un punto de vista sanitario, existe una clara conciencia del creciente aumento de las toxiinfecciones alimentarias, lo que ha hecho que algunos países desarrollados dicten normas para mejorar los análisis de riesgos y cuantificar más objetivamente el impacto social real de estos problemas. Además, existen fundadas sospechas de que algunas graves enfermedades (el síndrome de Guillain-Barré, por ejemplo), en principio no consideradas como toxiinfecciones alimentarias, pueden ser causadas por especies microbianas vehiculadas por los alimentos. También empieza a preocupar gravemente el aumento de resistencias a los antibióticos en las bacterias patógenas que, según algunos investigadores, podrían estar relacionadas con la presencia de antibióticos en los alimentos.

Por otra parte, desde el punto de vista industrial, el desarrollo económico posterior a la crisis de los setenta fue el origen de un nuevo consumidor con una mayor capacidad adquisitiva y, sobre todo, mucho mejor informado sobre aspectos relacionados con la salud, la nutrición y los alimentos en general. Este nuevo tipo de consumidor demandaba productos cada vez más parecidos a los alimentos frescos, con todas las garantías sanitarias y un elevado valor nutritivo. Esta circunstancia indujo a la búsqueda de nuevas tecnologías, alternativas al calor, que permitiesen obtener productos sanitariamente seguros pero con mejores propiedades sensoriales, funcionales y nutritivas. También se planteó como alternativa el desarrollo de procesos combinados, cuyas bases científicas desarrolló el Prof. Leistner a lo largo de las décadas de los setenta y ochenta. Leistner propuso sustituir los tratamientos de conservación tradicionales, en general de gran intensidad y que por ello alteraban la calidad de los alimentos, por procesos más complejos consistentes en aplicar simultánea o sucesivamente varias tecnologías, pero a una intensidad baja; estas combinaciones, en general, permitían conseguir productos estables y de mejor calidad. A lo largo de los ochenta y noventa, las presiones de los consumidores obligaron a reducir la concentración y tipo de conservantes químicos añadidos a los alimentos y en algunos casos incluso se prohibió legalmente su uso, lo que obligó a la industria alimentaria a buscar nuevos compuestos bacteriostáticos y/o bactericidas de “origen natural”. Finalmente, la globalización de los mercados aumentó los intercambios de productos alimenticios lo que obligó a buscar procesos capaces de prolongar la vida útil de los alimentos.

Desde otro punto de vista, totalmente diferente, existen ya claras evidencias de que el bienestar y la salud de los ciudadanos están muy relacionados con su microbiota intestinal. Muchos de los microorganismos beneficiosos para esta microbiota (probióticos) son especies presentes en los alimentos (bacterias ácido lácticas, por ejemplo), y muchos componentes de los alimentos pueden ayudar a reequilibrarla (prebióticos).

Se pretende que este Congreso refleje la situación actual y las perspectivas de futuro de todos estos problemas desde distintos enfoques. Para conseguir este propósito, el Congreso se ha estructurado en seis sesiones temáticas con conferencias, ponencias y comunicaciones. Los temas seleccionados incluyen aspectos relacionados con los avances metodológicos, con las interrelaciones entre la seguridad alimentaria y la microbiología de los alimentos, con algunas cuestiones de especial relevancia para los biotecnólogos de los alimentos, y con algunos avances en el conocimiento de la fisiología microbiana de interés para los microbiólogos de los alimentos. Otras sesiones se dedican a tratar retos microbiológicos concretos en la industria alimentaria actual y una última a las tecnologías emergentes y a la microbiología predictiva. En línea con este objetivo de potenciar los aspectos multidisciplinares, hemos pedido la colaboración de eminentes microbiólogos y especialistas de campos próximos cuya opinión previsiblemente nos ayudará a verlos desde otra perspectiva. Además, hemos vinculando la presentación de las comunicaciones a las ponencias en sesiones mixtas en la creencia de que esto dotará de mayor flexibilidad a las sesiones y potenciará enriquecedores debates.

Es nuestra intención que, al menos durante este corto tiempo, olvidemos los problemas diarios y las cuestiones de “intendencia” y nos dediquemos a disfrutar de lo que realmente nos gusta y nos une: la Microbiología. El entorno no puede ser más adecuado para ello. Bienvenidos a Zaragoza.

Santiago Condón Usón
Presidente del Comité Organizador

COMITÉS

COMITÉ DE HONOR

Excma. Sra. Dña. Luisa Fernanda Rudi Úbeda
Presidenta de Aragón

Excma. Sr. D. José Ángel Biel Rivera
Presidente de las Cortes de Aragón

Excmo. Sr. D. Gustavo Alcalde Sánchez
Delegado del Gobierno en Aragón

Excmo. Sr. D. Juan Alberto Belloch Julbe
Alcalde de Zaragoza

Excma. Sra. Dña. María Dolores Serrat Moré
Consejera de Educación, Universidad, Cultura y Deporte, Gobierno de Aragón

Excmo. Sr. D. Modesto Lobón Sobrino
Consejero de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, Gobierno de Aragón

Excmo. Sr. D. Arturo Aliaga López
Consejero de Industria e Innovación, Gobierno de Aragón

Excmo. Sr. D. Ricardo Oliván Bellosta
Consejera de Sanidad, Bienestar Social y Familia, Gobierno de Aragón

Ilmo. Sr. D. Luís María Beamonte Mesa
Presidente de la Diputación Provincial de Zaragoza

Sr. D. Manuel José López Pérez
Rector Magnífico de la Universidad de Zaragoza

Sr. D. Ricardo Guerrero Moreno
Presidente de la Sociedad Española de Microbiología (SEM)

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

Sr. D. Juan José Badiola Díez
Presidente del Consejo General de Colegios Veterinarios de España

Sr. D. José Rómulo Silva
Presidente del Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de la provincia de Zaragoza

Sra. Dña. Concha Ferrer Novella
Presidenta del Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Zaragoza

Sr. D. Ramón Jordán Alba
Presidente del Ilustre Colegio de Farmacéuticos de Zaragoza

COMITÉ CIENTÍFICO

Presidente honorífico: Francisco J. Sala Trepas

Coordinador: Santiago Condón Usón (Universidad de Zaragoza)

Miguel A. Asensio (Universidad de Extremadura)

Albert Bordons (Universitat Rovira y Virgili)

Francisco J. Carballo García (Universidad de Vigo)

Rosa del Campo (IRYCIS)

José Fernández-Salguero (Universidad de Córdoba)

Gonzalo D. García de Fernando (Universidad Complutense Madrid)

Clara González de los Reyes-Gavilán (IPLA, CSIC)

Elena González Fandos (Universidad de La Rioja)

Antonio Herrera Marteache (Universidad de Zaragoza)

Antonio Martínez (IATA, CSIC)

Baltasar Mayo (IPLA, CSIC)

Margarita Medina (INIA)

Manuel Núñez (INIA)

Juan A. Ordoñez Pereda (Universidad Complutense Madrid)

Alfredo Palop (Univ. Cartagena)

Antonia M^a Picón (INIA)

David Rodríguez (ITACyL)

Vicente Sanchís Almenar (Universidad de Lleida)

COMITÉ ORGANIZADOR

Santiago Condón (Presidente)

Diego García (Secretario)

Pilar Mañas (Tesorera)

Javier Raso (Vocal)

Rafael Pagán (Vocal)

Ignacio Álvarez (Vocal)

PROGRAMA DEL CONGRESO

24 SEPTIEMBRE (miércoles)

9.30 h. Apertura de Congreso

10.15 h. Conferencia inaugural.

Mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* y *Campylobacter jejuni*: resultados similares para estrategias distintas. **Dr. Jorge Galán**. Director del Departamento de Microbial Pathogenesis de la School of Medicine de la Universidad de Yale, Estados Unidos. Premio Robert Koch. Miembro de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (NAS).

11.00 h. Café.

11.30 h. SESIÓN I. Avances metodológicos en Microbiología de los Alimentos

- Biología molecular de comunidades microbianas y posibles aplicaciones en microbiología de alimentos. **Dr. Daniel López**. Director de laboratorio en el Institute for Molecular Infection Biology. Universidad de Würzburg. Alemania.
- Comunicaciones y discusión.

13.00 h. Workshop OXOID.

"PCR en Seguridad Alimentaria: Optimización de proceso". **Dña. Itziar Olea García**.

14.00 h. Comida.

15.00 h. SESIÓN II. La seguridad alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde distintas perspectivas I.

- La perspectiva de los sistemas sanitarios de salud. **Dra. Rosa M. del Campo**. Investigadora Miguel Servet del Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal de Madrid.
- La perspectiva de los investigadores. **Dr. Miguel Ángel Asensio**. Catedrático del área de Nutrición y Bromatología y antiguo Presidente del grupo de Alimentos de la SEM.
- Actividades recientes de la EFSA sobre riesgos biológicos en seguridad alimentaria. **D. Pablo Romero**. Scientific Officer de la European Food Safety Authority.
- La perspectiva de las industrias agroalimentarias. **Dra. Blanca Jaúregui**. Directora de I+D+i en el CNTA.
- Discusión general.

17.00 h. Café.

17.30 h. SESIÓN III. La seguridad alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde distintas perspectivas II.

- Comunicaciones y discusión.

19.00 h. Asamblea de socios de la SEM.

20.00 h. Visita guiada a Zaragoza.

25 SEPTIEMBRE (jueves)

9.00 h. SESIÓN IV. Biotecnología microbiana de los alimentos I.

- Probióticos y microbiota intestinal. De dónde venimos y a dónde vamos. **Dra. Clara González de los Reyes-Gavilán**. Directora del IPLA-CSIC.
- Comunicaciones y discusión.

11.00 h. Café.

11.30 h. SESIÓN V. Biotecnología microbiana de los alimentos II.

- Bacterias lácticas del vino y fermentación maloláctica. **Dr. Albert Bordons**. Catedrático Emérito de la Universidad Rovira Virgili.
- Comunicaciones y discusión.

13.00 h. Workshop ZEULAB S.L.

"Sistemas lab-in-a-box para la detección de microorganismos y antibióticos en los alimentos"

14.00 h. Comida.

15.00 h. SESIÓN VI. Retos microbiológicos en la industria alimentaria I.

- Descontaminación de canales. **Dra. Elena González Fandos**. Catedrática de Tecnología de los Alimentos, Universidad de La Rioja.
- *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. **D. Antonio Español**. Servicio de Seguridad Alimentaria, Salud Ambiental y Coordinación. Gobierno de Aragón.
- *Toxoplasma gondii* en la industria cárnica. **Dra. Susana Bayarri**. Profesora Titular de Universidad del Área Nutrición y Bromatología. Universidad de Zaragoza.
- Comunicaciones y discusión.

17.00 h. Café.

17.30 h. SESIÓN VII. Retos microbiológicos en la industria alimentaria II.

- Impacto en la salud pública de una extensión en la fecha de caducidad del huevo cáscara. **D. Pablo Romero**. Scientific Officer de la European Food Safety Authority.
- Descontaminación de frutas y hortalizas. **Dña. Silvia García de la Torre**. Investigadora CNTA.
- Descontaminación de harinas y frutos secos. **Dr. Nicolás Meneses**. Departamento I+D Bühler (Suiza).
- Comunicaciones y discusión.

21.30 h. Cena del congreso.

26 SEPTIEMBRE (viernes)

9.00 h. SESIÓN VIII. Avances en fisiología microbiana de interés en microbiología de alimentos.

- Una mirada "positiva" a los biofilms bacterianos. **Dr. Diego Romero.** Investigador Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga y en el Instituto de hortofruticultura subtropical y mediterránea CSIC.
- Respuestas adaptativas al estrés en microorganismos patógenos y sus implicaciones para la seguridad alimentaria. **Dr. Avelino Álvarez Ordoñez.** Investigador Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co. Cork.
- Comunicaciones y discusión.

11.00 h. Café.

11.30 h. Premios y distinciones.

- Premio a la mejor comunicación.
- Premio MICROKIT a la Innovación en Microbiología Alimentaria
- Premio Oxoid a la mejor Tesis Doctoral en Microbiología de los Alimentos (Ponencia 30 minutos).
- Premio especial del Grupo de Microbiología de los Alimentos 2014 para investigadores jóvenes del Grupo de Microbiología de los Alimentos de la SEM.

12.15 h. Conferencia de clausura. Investigador premiado.

13.00 h. Workshop GOMENSORO.

"Detección de Contaminación Microbiana en Alimentos en Tiempo Real: BacTrac". **Dr. José Félix Álvarez.**

14.00 h. Comida.

15.00 h. SESIÓN IX. Tecnologías emergentes y microbiología predictiva I.

- Microbiología predictiva orientada a la integración en una evaluación de riesgos microbiológicos alimentarios. **Dr. Pablo Fernández Escámez.** Catedrático de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Cartagena. Experto del Panel de Riesgos Biológicos de EFSA.
- Comunicaciones y discusión.

17.00 h. Café.

17.30 h. SESIÓN X. Tecnologías emergentes y microbiología predictiva II.

- Posibilidades y limitaciones del plasma frío para la conservación e higienización de los alimentos. **Dra. Mercedes López Fernández.** Profesora Titular de la Universidad de León.
- Comunicaciones y discusión.

19.00 h. Clausura del Congreso.

CONFERENCIA INAUGURAL

Mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* y *Campylobacter jejuni*: resultados similares para estrategias distintas

Jorge Galán

Director del Departamento de Microbial Pathogenesis de la School of Medicine de la Universidad de Yale, Estados Unidos. Premio Robert Koch. Miembro de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (NAS).



Jorge E. Galán es Profesor Lucille P Markey de Patogénesis Microbiana y Presidente del Departamento de Patogénesis Microbiana en la Facultad de Medicina de la Universidad de Yale. Se licenció en Veterinaria en 1980 por la Universidad Nacional de La Plata, Argentina y luego obtuvo el doctorado en 1986 por la Universidad de Cornell. El Dr. Galán completó sus estudios postdoctorales en la Universidad de Washington, St. Louis con el Dr. Roy Curtiss y posteriormente se incorporó a la facultad de la SUNY Stony Brook, antes de trasladarse a la Universidad de Yale en 1998 como Profesor Lucille P. Markey de Microbiología y Presidente del Departamento de Patogénesis Microbiana.

Su trabajo ha cosechado muchos premios, entre ellos el Premio Pew Scholars en 1990, una beca del Searle-Chicago Community Trust, el Premio Hans Sigríst, y el prestigioso Premio Robert Koch. El Dr. Galán es miembro de la Academia Americana de Microbiología y de la Asociación Americana para el Avance de las Ciencias, así como de la Academia Leopoldina Alemana de Ciencias y de la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. (NAS).

Su trabajo se centra en la relación entre los microorganismos patógenos y sus huéspedes, y en concreto sobre los mecanismos por los que las bacterias patógenas *Salmonella* y *Campylobacter* interactúan con el anfitrión para provocar la enfermedad.

SESIÓN I: Avances metodológicos en Microbiología de los Alimentos

Biología molecular de comunidades microbianas y posibles aplicaciones en microbiología de alimentos

Daniel López

Research Centre for Infectious Diseases ZINF, University of Würzburg
97080 Würzburg, Alemania, Daniel.lopez@uni-wuerzburg.de

El uso desproporcionado de antibióticos es la mayor causa de la aparición de resistencias en bacterias pero también puede ocurrir mediante interacciones competitivas entre las diferentes cepas que coexisten en una comunidad microbiana. Ciertos aislados de MRSA (*S. aureus* resistentes a meticilina) diversifican espontáneamente cepas diferentes que aparecen de modo secuencial. La primera cepa produce potentes bacteriocinas que compiten por nutrientes con la cepa parental. La segunda cepa es resistente a esa bacteriocina y también resistente a otros antibióticos como la vancomicina, lo que se conoce como cepas VISA (*S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina) que son detectadas en pacientes de hospitales. La diversificación de estas cepas ocurren también in vivo, de acuerdo con el hecho que ambos fenotipos evolucionados se asemejan a cepas comúnmente aisladas en clínica. Nuestro estudio muestra cómo la co-evolución bacteriana puede generar resistencia a antibióticos y dar lugar a fenotipos importantes en el desarrollo de infecciones.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son actualmente la herramienta más poderosa para combatir infecciones bacterianas pero el número de antibióticos efectivos disminuye a medida que incrementan los patógenos resistentes a antibióticos. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a antibióticos no está exclusivamente restringido a cepas patógenas. Muchas bacterias del suelo son productoras de antibióticos y poseen genes que confieren inmunidad a esos antibióticos, que les permiten resistir la acción de sus productos. Utilizan estos antibióticos para eliminar competidores del nicho ecológico, lo cual también ejerce una presión selectiva sobre las bacterias cohabitantes del nicho, que son capaces de adquirir mutaciones para adaptarse a prevenir la actividad microbiana. Uno de los patógenos más virulentos es *Staphylococcus aureus*. Su tratamiento desproporcionado con penicilina (e.g. meticilina) en los 60 causó el desarrollo de cepas resistentes a estos antibióticos (MRSA, de *S. aureus* resistentes a meticilina). Las infecciones de MRSA se trataron convencionalmente con vancomicina, pero eso también llevó al desarrollo de nuevas cepas que exhibían una resistencia intermedia a este antibiótico (VISA) (Hiramatsu y col., 1997).

Las infecciones de *S. aureus* implican una alta densidad celular y periodos prolongados de infección que generalmente están asociados a la formación de agregados celulares o biofilms (Lopez y col., 2010). Las bacterias atrapadas en los biofilms están sometidas a una gran selección natural, ya que tienen que competir por espacio y nutrientes, y eso puede ser un factor esencial en la generación de nuevos fenotipos y diversidad (Nadell y col., 2009). Esas condiciones pueden desembocar en la generación de

una población heterogénea de bacterias genéticamente diferentes que muestran características que son relevantes para entender el desarrollo de un proceso infeccioso. Este estudio muestra cómo las interacciones bacterianas juegan un gran papel en la evolución microbiana y pueden explicar la diversificación de fenotipos durante una infección.

MATERIAL Y MÉTODOS

RNA deep-sequencing con Illumina HiSeq. Cultivos en TSB agar fueron resuspendidos en RNA protect (Qiagen®, USA). El pellet fue recolectado y lisado mecánicamente en Fast Prep. El lisado fue centrifugado y el sobrenadante usado para purificación de RNA mediante el kit RNeasy (Qiagen®, USA). Fue tratado con RNase-free DNase I (New England Biolabs®, USA) para eliminar las trazas de DNA. Las librerías de cDNA fueron generadas sin fraccionamiento del RNA de acuerdo a Dugar y col (2013). Las muestras fueron enlazadas a una cola poly(A) usando poly(A) polimerasa. 5'-PPP se eliminó usando la pirofosfatasa ácida del tabaco, seguida de una ligación de RNA mediante adaptadores al terminal 5'. cDNA fue generado a partir de la acción de M-MLV transcriptasa reversa con adaptadores oligo(dT). El cDNA resultante fue amplificado por PCR y analizado por electroforesis capilar. Las librerías fueron secuenciadas con Illumina HiSeq en 100 ciclos. Realizamos un demultiplex de las lecturas y eliminamos las secuencias adaptadoras. El procesamiento de las lecturas, eliminación de las colas poly(A), filtro de tamaño (min 12 nt), estadística y cálculo de cobertura y normalización fue realizado con RNA-análisis pipeline RAPL versión 0.1 y DESeq 1.12.0. Los datos están depositados en NCBI Gene Expresión Omnibus y están accesibles a través de un and GEO Series accesión number GSE49636.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones de crecimiento ricas en magnesio favorecen la formación de robustos agregados celulares inmovilizados dentro de una matriz extracelular. Detectamos diversas morfologías durante el desarrollo de las comunidades que se manifestaron con la formación de diferentes patrones de sectorización en *S. aureus*. La cepa parental forma inicialmente un centro color naranja que llamamos origen (O). El color proviene del carotenoide estaphyloxantina, responsable de la coloración de *S. aureus* (Marshall y col., 1981). Con el tiempo, una nueva cepa albina emerge (W) y crece rápidamente hasta rodear O. Después, una tercera cepa aparece (Y) que se expande desde el O hasta la superficie, formando sectores que se abren paso por la región W.

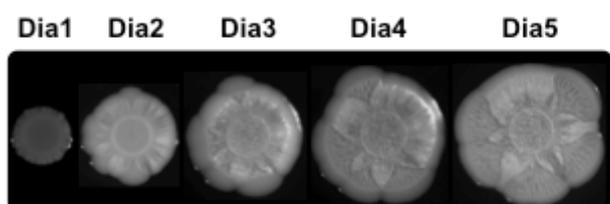


Figura 1: Agregados bacterianos de *S. aureus* crecidos en TSB enriquecido en magnesio a 37°C durante 5 días. Es posible visualizar la expansión de sectores discretos durante el desarrollo de la comunidad microbiana.

La activación diferencial del sistema de quorum sensing (*agr*) fue explorado mediante análisis global de expresión génica usando RNA-deep sequencing Illumina HiSeq para las cepas O, W y Y. La hiperactivación de la expresión de *agr* en W ocurre a la par que una activación de la expresión de los genes regulados por *agr*. Esto es consistente con una pérdida de función de σ^B , un factor sigma inducido por estrés que reprime *agr* y activa la pigmentación (Bischoff y col., 2001; Kullik y col., 1998). Esto explica por qué W expresa activamente *agr* y no es pigmentada. *Agr* induce la producción de metabolitos secundarios. Esto incluye la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de O y surfactantes que permiten a W expandirse y colonizar la placa de agar (Tsompanidou y col., 2013). En resumen, W emerge como consecuencia de una mutación en σ^B y causa una hiperactivación de *agr*. W produce varios compuestos extracelulares, incluido el antibiótico Bsa y su maquinaria de resistencia. La presencia de Bsa inhibe solamente el crecimiento de O. Además, cuando eliminamos *bsa* en *S. aureus*, la diversificación de W no causó la generación de sectores Y en la comunidad microbiana, demostrando que Bsa es un factor adicional que genera diversidad en el biofilm y causante de la diferenciación de Y.

Bsa actúa contra el Lípido II en la formación de la pared celular al igual que la vancomicina. Por lo tanto, es posible que Y haya adquirido un fenotipo de resistencia parecido a VISA para resistir la presencia de Bsa. De hecho, Y mostró también resistencia a vancomicina mediante una difusión reducida del antibiótico a su diana en el septo. En resumen, la producción de Bsa por W lleva a la evolución de Y, la cual presenta un fenotipo muy similar a las cepas VISA que son resistentes a vancomicina y causan tantas complicaciones en los hospitales. Para comprobar si estos eventos evolutivos conducen a la diversificación de VISA también in vivo, infectamos una cohorte de ratones y después de 5 días de infección, los órganos fueron recolectados y la carga bacteriana cuantificada. Muestras de los huesos, pulmones y riñones mostraron una alta carga bacteriana que pueden relacionarse con la formación de biofilm y mostraron una muestra heterogénea de O, W e Y. Y fue la cepa más abundante en riñones y huesos mientras que W fue más abundante en pulmones. Estos fenotipos W e Y asemejan a los encontrados en clínica, donde mutantes en σ^B aparecen en el 10% de las infecciones de *S. aureus* (Lennette, 1985) y el fenotipo Y asemeja a VISA, el cual genera actualmente grandes problemas de salud pública. Nuestro trabajo sugiere que la competición en biofilms puede ser central para entender los diferentes fenotipos que aparecen durante los procesos infecciosos y enfatiza la necesidad de considerar no solo el impacto del tratamiento de la infección bacteriana sino también la interacción entre las propias bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

- K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F. C. Tenover. 1997, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40: 135-136.
- D. Lopez, H. Vlamakis, R. Kolter, 2010, Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000398.
- C. D. Nadell, J. B. Xavier, K. R. Foster. 2009, The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 33: 206-224.
- G. Dugar, A. Herbig, K. U. Forstner, N. Heidrich, R. Reinhardt, K. Nieselt, C. M. Sharma. 2013, High-resolution transcriptome maps reveal strain-specific regulatory features of multiple *Campylobacter jejuni* isolates. *PLoS Genet* 9: e1003495.
- J. H. Marshall, G. J. Wilmoth. 1981, Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J Bacteriol* 147: 914-919.
- M. Bischoff, J. M. Entenza, P. Giachino, 2001, Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183: 5171-5179.
- I. Kullik, P. Giachino, T. Fuchs. 1998, Deletion of the alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bacteriol* 180: 4814-4820.
- E. Tsompanidou, E. L. Denham, D. Becher, A. de Jong, G. Buist, M. van Oosten, W. L. Manson, J. W. Back, J. M. van Dijk, A.

Dreisbach, 2013, Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. *Appl Environ Microbiol* 79: 886-895.

E. H. Lennette. 1985, *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C. American Society for Microbiology.



Daniel López es Licenciado y Doctor en Bioquímica por la Universidad de Murcia (2005). En 2006, se incorporó al Departamento de Microbiología e Inmunología de la *Harvard Medical School*, donde trabajó 4 años como investigador postdoctoral bajo la supervisión del Prof. Roberto Kolter. Desde 2011, ejerce como director de laboratorio en el Instituto de Investigación de

Enfermedades Infecciosas ZINF-IMIB, en la Universidad de Würzburg, Alemania. A lo largo de su carrera académica se ha especializado en microbiología, genética molecular, biología molecular y bioquímica, y actualmente combina aspectos de estos campos científicos para el estudio de los mecanismos de señalización en bacterias patógenas y su contribución al desarrollo de procesos infecciosos. Con este objetivo, en 2013 le fue concedida una ERC-Starting Grant de la Comisión Europea, destinadas a laboratorios dirigidos por investigadores jóvenes de excelencia.

Es autor de 21 publicaciones internacionales en revistas de alto impacto (*Molecular Microbiology*, *PNAS*, *FEMS Microbiology Reviews*, *Applied and Environmental Microbiology*, etc.), centradas en diferentes aspectos de la comunicación entre bacterias, y la especialización celular en comunidades bacterianas. Ha dirigido o está dirigiendo 6 tesis de máster y 5 tesis doctorales.

Uso de reactivos de viabilidad para la discriminación de la infectividad del HAV en muestras de alimentos

Gloria Sánchez^{1,2}, Laura Moreno¹ y Rosa Aznar^{1,2}

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, España, glosanmo@uv.es

²Departamento de Biotecnología, IATA-CSIC, España

El virus de la hepatitis A (VHA) se transmite principalmente por vía fecal oral, a través de agua o alimentos contaminados, y produce una hepatitis aguda. Las cepas que circulan entre la población no se multiplican *in vitro*, por lo cual su detección en alimentos se basa en técnicas moleculares, que aunque son muy sensibles no discriminan entre virus infecciosos y no infecciosos. Por ello, en este trabajo se optimizó el pretratamiento con reactivos de viabilidad para la discriminación del VHA tanto en suspensiones, como inoculado en agua de lavado de lechuga o en distintos alimentos.

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis A (VHA) es responsable de casi la mitad del número total de infecciones de hepatitis diagnosticadas en todo el mundo. La infección del VHA se propaga principalmente a través de la vía fecal-oral, y como consecuencia de la globalización, la frecuencia de brotes transnacionales transmitidos por alimentos se ha visto aumentada en los últimos años. Actualmente, la detección del VHA en alimentos se realiza por técnicas moleculares basadas en PCR que proporcionan resultados rápidos, fiables y sensibles. Sin embargo, estos métodos sólo detectan la presencia de ácidos nucleicos lo que no se puede asociar directamente a la infectividad de la muestra. Para aunar las ventajas de la PCR y la seguridad en determinar la infectividad de la muestra, se están evaluando diversas metodologías para la discriminación de virus infecciosos y no infecciosos mediante PCR a tiempo real, entre ellas el uso de reactivos de viabilidad como el propidio de monoazida (PMA) o el etidio de monoazida (EMA)

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus y línea celular. Se utilizó la cepa HM-175 del VHA, y se cultivó en la línea FRhK4.

Fotoactivación. Suspensiones de VHA tratadas por calor (5 min a 99 °C), se incubaron con PMA o EMA, a diferentes concentraciones (20 y 50 µM), temperaturas (4, 25 y 37°C) y tiempos de incubación (5, 10, y 30 min), además de en presencia o ausencia de tensoactivos (Triton X-100 y Span 20). Posteriormente, las muestras se expusieron a luz de alta intensidad durante 15 minutos utilizando un sistema de fotoactivación (Led-Activo Azul), se extrajo el ARN con el kit comercial NucleoSpin RNA virus kit (Macherey–Nagel) y se realizó la cuantificación del virus mediante RT-PCR a tiempo real (Sánchez y col, 2012a).

Agua y alimentos. Suspensiones del VHA de concentraciones conocidas, inactivadas o no inactivadas por

calor, se inocularon en agua de lavado de vegetales procedente de industria de IV gama (López y col., 2011), y en concentrados de diferentes alimentos incluyendo vegetales en IV gama como lechuga, espinacas, perejil, y moluscos, como tellinas y almejas. Los vegetales de IV gama fueron procesados según el protocolo descrito por Sánchez y col. (2012b) y las muestras de marisco según la ISO/TS 15216-2:2013.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del tratamiento con reactivos de viabilidad

De las distintas condiciones ensayadas, el tratamiento más eficiente para discriminar los VHA muertos por calor consiste en la aplicación de 50 µM de PMA, a 25 °C durante 10 min y agitación a 150 rpm (Tabla 1)

Tabla 1: Ejemplo de optimización de las condiciones de pretratamiento

	Niveles de VHA			
	6 x 10 ⁴ TCID ₅₀		6 x 10 ³ TCID ₅₀	
	Cuantificación	Reducción	Cuantificación	Reducción
Vivas	3,99 ± 0,15	-	3,30 ± 0,06	
Vivas (PMA 50 µM)	3,62 ± 0,09	0,37	3,03 ± 0,08	0,27
Muertas	3,98 ± 0,02	-	2,23 ± 0,59	
Muertas (PMA 50 µM)	2,11 ± 0,19	1,87	<1,20	>1,03

Optimización en agua de IV gama

Una vez establecidas las mejores condiciones para discriminar suspensiones muertas del VHA, se procedió a evaluar la eficacia de este procedimiento en agua de lavado de vegetales, evaluando de nuevo la eficacia del PMA y del EMA en presencia de tensoactivos. La tabla 2, muestra que en esta matriz, el

tratamiento de PMA en presencia de Triton X-100 discriminaba totalmente la presencia de virus no infecciosos.

Tabla 2: Reducción logarítmica de las cuantificaciones obtenidas a partir de suspensiones de VHA no infecciosos antes y después de los tratamientos con marcadores de viabilidad inoculadas en el agua de lavado de la lechuga

	Marcadores de viabilidad	
	PMA (50 μ M)	EMA (20 μ M)
Sin tensoactivo	2,86 \pm 0,24	2,58 \pm 0,44
0,5% Triton 100	>3,42 \pm 0,48	2,39 \pm 0,59
0,1% Span 20	2,96 \pm 0,17	2,24 \pm 0,33
0,5% Span 20	2,61 \pm 0,39	2,11 \pm 0,17

Optimización en productos de IV gama

El pretratamiento que mejor eliminaba los virus no infecciosos en concentrado de lechuga fue, como en el caso del agua de lavado, el de PMA combinado con Triton X-100 donde se conseguía eliminar entre 1,5 y 2 órdenes logarítmicos de virus inactivados (Tabla 3).

Tabla 3: Reducción logarítmica de las cuantificaciones obtenidas a partir de suspensiones de VHA no infecciosos antes y después del tratamiento con PMA con o sin Triton en concentrados de lechuga

	Niveles de VHA inoculados	
	6 x 10 ⁴ TCID ₅₀	6 x 10 ³ TCID ₅₀
PMA (50 μ M)	1,09 \pm 0,28	1,56 \pm 0,26
PMA (50 μ M), 0,5% Triton X-100	1,53 \pm 0,80	2,04 \pm 0,09

Evaluación del pretratamiento con PMA y Tritón en distintos alimentos

Los resultados de inoculación de distintos productos de IV gama y marisco (Tabla 4), muestra como el pretratamiento con PMA-Tritón es altamente dependiente de la matriz alimentaria y que en el caso del marisco existe una gran interferencia de la matriz, donde el pretratamiento con PMA-Tritón no consigue discriminar entre virus infecciosos y muertos. Esta interferencia se consigue parcialmente revertir diluyendo el concentrado de marisco 1/10 en tampón PBS.

Tabla 4: Reducción logarítmica de las cuantificaciones obtenidas a partir de suspensiones de VHA no infecciosos antes y después del tratamiento con PMA-Triton en concentrados de alimentos

	Niveles de VHA inoculados					
	6 x 10 ⁴ TCID ₅₀		6 x 10 ³ TCID ₅₀		6 x 10 ² TCID ₅₀	
Lechuga	3/3	1,64 \pm 0,34	3/3	1,79 \pm 0,53	2/3	0,55 \pm 0,03
Espinacas	3/3	1,15 \pm 0,80	3/3	0,69 \pm 0,21	1/3	0,43 \pm 0,17
Perejil	3/3	1,04 \pm 0,80	3/3	0,46 \pm 0,54	0/3	-
Almejas	3/3	0,01 \pm 0,12	3/3	0,23 \pm 0,29	2/3	0,00 \pm 0,02
Almejas (1/10)	3/3	1,36 \pm 0,54	3/3	1,53 \pm 0,31	0/3	-
Tellinas	3/3	0,27 \pm 0,05	3/3	0,30 \pm 0,02	3/3	0,47 \pm 0,02
Tellinas (1/10)	3/3	1,95 \pm 0,34	3/3	1,10 \pm 0,30	0/3	-

Los resultados de este trabajo muestran que el tratamiento con PMA combinado con Tritón es muy efectivo para discriminar la infectividad del VHA en suspensión e inoculado en agua de lavado, mientras que en alimentos, se necesita seguir optimizando el uso de los reactivos de viabilidad para evitar falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

- López-Gálvez, F., Posada-Izquierdo, G.D., Selma, M.V., Pérez-Rodríguez, F., Gobet, J., Gil, M.I., Allende, A. 2011. Electrochemical disinfection: an efficient treatment to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in process wash water containing organic matter. *Food Microbiol.*, 30:146–156.
- Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R. 2012. Discrimination of Infectious Hepatitis A Viruses by Propidium Monoazide Real-Time RT-PCR. *Food Environ. Virol.*, 4:21-25.
- Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R. 2012. A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*, 152:9-13.

Cuantificación de la expresión génica de mohos productores de OTA en productos cárnicos crudos-curados mediante PCR en tiempo real

Alicia Rodríguez^{1,2}, Ángel Medina², Juan J. Córdoba¹, Victoria Bernáldez¹, Rafael Miguel y Naresh Magan²

¹ Higiene y Seguridad Alimentaria, Universidad de Extremadura, España, mybernaldez@unex.es

² Grupo de Micología Aplicada, Universidad de Cranfield, Reino Unido

Las condiciones ecológicas que se producen durante la elaboración de los productos cárnicos crudos-curados y la concentración de sal (NaCl) utilizada favorecen la presencia de cepas de mohos productoras de ocratoxina A (OTA), pertenecientes principalmente a las especies *Penicillium nordicum* y *Penicillium verrucosum*. Una de las posibles estrategias para controlar la presencia de estos mohos durante la maduración es detectar contaminación de mohos viables productores de OTA. El objetivo de este estudio fue evaluar la idoneidad de la cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR) como herramienta de detección incipiente de mohos viables productores de OTA durante la maduración de los productos cárnicos curados. Para ello se estudió el crecimiento, la expresión de los genes *OTApks* y *OTAnps* así como la producción de OTA por cepas de *P. nordicum* y *P. verrucosum* en medios de cultivo elaborados con jamón curado y salchichón. Para reproducir las condiciones de maduración se utilizaron diferentes concentraciones de NaCl, reduciendo la actividad de agua (a_w) a valores desde 0,97 hasta 0,84. Los medios fueron inoculados con suspensiones de esporas de estas especies e incubados a 25 °C (jamón curado) y entre 10-30°C (salchichón) durante 12 días. Se utilizó RT-qPCR para estudiar los efectos de la interacción de estos dos factores (temperatura y a_w) sobre la expresión relativa de los genes claves implicados en la biosíntesis de OTA. Los resultados permitieron vincular el crecimiento y la producción de la toxina con la expresión de los genes implicados en la ruta biosintética. La técnica de RT-qPCR permitió, por tanto, la detección temprana de los mohos ocratoxigénicos antes de iniciarse la producción de OTA.

INTRODUCCIÓN

Las condiciones ecológicas que se alcanzan en los productos cárnicos madurados, como el jamón curado y los embutidos crudos-madurados, favorecen el desarrollo de una población de mohos compuesta principalmente por especies del género *Penicillium*. Aunque gran parte de estos mohos tienen un efecto beneficioso sobre el sabor y el aroma de estos productos, algunas cepas pueden ser productoras de ocratoxina A (OTA), un metabolito secundario extremadamente tóxico. OTA es la micotoxina más frecuentemente encontrada en jamón curado y en otros productos cárnicos (Bertuzzi y col., 2013; Rodríguez y col., 2012). Esto es debido a que las condiciones del procesado y la presencia de sal (NaCl) proporcionan un especializado nicho ecológico para el crecimiento de cepas productoras de OTA, principalmente pertenecientes a las especies *Penicillium nordicum* y *Penicillium verrucosum*.

Una de las posibles estrategias para controlar la presencia de estos mohos durante la maduración es detectar la contaminación de mohos viables productores de OTA, lo que resulta de especial interés en jamón curado y en embutidos crudos-curados que se elaboran de manera artesanal y en los cuales existe poco control sobre la población fúngica.

El objetivo de este trabajo fue, por tanto, evaluar la idoneidad de la cuantificación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR) como herramienta de detección incipiente de mohos viables productores de OTA durante la maduración de los productos cárnicos curados, como el jamón curado y los embutidos crudos-curados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el objetivo de este estudio es importante relacionar el crecimiento de *P. nordicum* y *P. verrucosum*, la expresión de los genes *OTApks* y *OTAnps* así como la producción de OTA en condiciones similares a las habituales en el proceso de elaboración de los productos cárnicos crudos-curados. Para ello, se inocularon esporas de tres cepas de *P. nordicum* y dos de *P. verrucosum* conocidas como productoras de OTA en medios de cultivo elaborados con jamón curado y salchichón. Para reproducir las condiciones de maduración se utilizaron diferentes concentraciones de NaCl, reduciendo la actividad de agua (a_w) a valores desde 0,97 hasta 0,84. Los medios fueron incubados a 25°C (jamón curado) y entre 10-30°C (salchichón) durante 12 días. La recogida de muestras se realizó cada dos días para determinar el crecimiento de la colonia del moho y la producción de OTA por cada una de las cepas estudiadas. Para la expresión génica se recogieron muestras cada tres días. El experimento se llevó a cabo por triplicado y se repitió al menos dos 2 veces.

Crecimiento fúngico. La medida del diámetro de las colonias se realizó en dos direcciones, en ángulos rectos uno del otro, cada dos días. Se obtuvieron las curvas de regresión entre los datos de los radios de las colonias respecto al tiempo (días de incubación) mediante la aplicación de un modelo lineal. Así, se calculó el radio de crecimiento (μm) de cada una de las cepas toxigénicas evaluadas en las distintas condiciones experimentales.

Producción de OTA. La extracción y posterior análisis de OTA mediante HPLC-FLD se realizó siguiendo el método detallado por Rodríguez y col. (2014).

Estudio de la expresión de los genes *OTApks* y *OTAnps*. La extracción de ARN y el posterior estudio de la expresión de los genes claves implicados en la biosíntesis de OTA mediante RT-qPCR se realizó siguiendo el método optimizado por Rodríguez y col. (2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de NaCl sobre el crecimiento de *P. nordicum* y *P. verrucosum*.

Se observaron diferencias en el crecimiento entre cepas de la misma especie en el mismo medio de cultivo elaborado con jamón curado o salchichón. Además, la misma cepa se comportó de forma diferente en los distintos medios de cultivo ensayados. Así, por ejemplo, aunque el crecimiento de la cepa de *P. nordicum* FHSCC2 se vio favorecido en el medio de jamón cuando la a_w fue de 0,87 (Rodríguez y col., 2014), en el caso del medio elaborado con salchichón el crecimiento máximo fue observado cuando la a_w modificada con NaCl fue de 0,94 (Figura 1). También se observaron diferencias entre ambas especies en el mismo medio de cultivo.

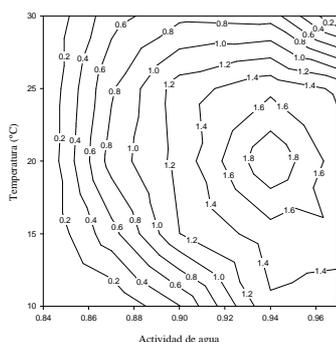


Figura 1: Mapa de contorno dimensional del crecimiento máximo de la cepa de *P. nordicum* FHSCC2 en un medio elaborado con salchichón que relaciona la actividad de agua (modificada con NaCl) y la temperatura. Los números indican el crecimiento de la cepa expresado en mm radio/día.

Producción de OTA de *P. nordicum* y *P. verrucosum* en medios elaborados con jamón curado y salchichón.

La mayoría de las cepas estudiadas produjeron OTA en diferentes cantidades, pero siempre después

de los 6 días de incubación. Cabe destacar, las grandes diferencias de producción de OTA entre las cepas de *P. nordicum* y *P. verrucosum* en el medio de salchichón en sus respectivas condiciones óptimas, siendo mayores en el caso de esta última especie (Figura 2).

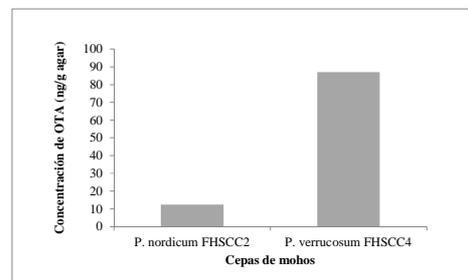


Figura 2: Producción de OTA de la cepa *P. nordicum* FHSCC2 (T 15°C y a_w 0,90) y *P. verrucosum* FHSCC4 (T 15°C y a_w 0,97) en un medio de cultivo elaborado con salchichón después de 12 días de incubación.

Estudio de la expresión de los genes *OTApks* y *OTAnps* de *P. nordicum* y *P. verrucosum* mediante RT-qPCR y su relación con el crecimiento y la producción de OTA.

Los análisis mediante RT-qPCR demostraron ser capaces de detectar la expresión de los genes *OTApks* y *OTAnps* sólo después de 3 días de incubación, antes de detectarse producción de OTA. Además, se relacionó el perfil de la expresión génica a lo largo del tiempo de incubación con la producción de la toxina (Rodríguez y col., 2014; datos no mostrados). Esto sugiere que los datos de la expresión de ambos genes obtenidos mediante RT-qPCR podrían ser un buen indicador del riesgo de contaminación con OTA de estos productos cárnicos durante su maduración. La RT-qPCR puede ser utilizada a nivel industrial para la detección de contaminación de mohos viables productores de OTA, permitiendo adoptar medidas correctoras tendentes a evitar la presencia de estos mohos y, por tanto, la acumulación de OTA en los productos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bertuzzi, T., Gualla, A., Morlacchini, M., Pietri, A. 2013, Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control* 34:79-83.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., Córdoba, J.J. 2012, Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Sci.* 90:728-734.
- Rodríguez, A., Medina, A., Córdoba, J.J., Magan, N. 2014, The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. *Int. J. Food Microbiol.* 178:113-119.

Evaluación del uso de la tecnología VIS-NIR para el control *in situ* de la calidad microbiológica de la carne fresca de pollo

Natalia Prado Marrón¹, Alfredo Corujo Fernández², Pelayo González González¹, Verónica Sierra³ y Juan Díaz García¹

¹ ASINCAR, Centro Tecnológico Agroalimentario, natalia@asincarc.com

² NUTRECO ESPAÑA, ³ SPECTRAPPLY S.L.

En el presente estudio se analizó la capacidad de la tecnología VIS-NIR (Espectroscopia en el Visible e Infrarrojo Cercano) para predecir la calidad microbiológica de jamoncitos de pollo con piel, envasados en atmósfera modificada. Para el análisis VIS-NIR, se ha usado el equipo LABSPEC, ASD dotado de una sonda de superficie. Se tomaron espectros de una población de 150 bandejas de jamoncitos y se realizó el recuento de aerobios mesófilos y Enterobacterias a distintos tiempos a lo largo del periodo de conservación. El análisis quimiométrico se realizó con el software comercial Unscrambler® v. 10.3 con el que se generaron distintos modelos de calibración cuyos coeficientes de determinación de calibración (R^2) y validación cruzada (R^2_{cv}) eran superiores a 0.8 y con valores estadísticos de RER y RPD adecuados. Posteriormente se ha realizado una validación con 16 bandejas de un nuevo lote. La predicción mediante VIS-NIR de los recuentos de microorganismos fue adecuada en un 93% de las muestras para el recuento de aerobios mesófilos y en un 87% de las muestras para el recuento de Enterobacterias, con un error promedio en ambos casos de 0.5 log ufc/g. Con este trabajo se demuestra el potencial del VIS-NIR para la predicción cuantitativa de microorganismos en jamoncitos de pollo con piel.

INTRODUCCIÓN

La estimación de calidad microbiológica de los productos es de gran importancia para la industria agroalimentaria. Es esencial contar con herramientas analíticas que den una respuesta rápida y fiable.

La espectroscopía en el infrarrojo cercano ha resultado ser una tecnología muy adecuada para el control de calidad y monitorización de procesos en la industria agroalimentaria (Sun, 2009) por su capacidad de obtener simultáneamente información de la composición química así como sobre características físicas y estructurales (Williams y col., 2001).

El potencial del VIS-NIR como herramienta para el análisis microbiológico ha sido evaluada en alimentos (Tito y col., 2012, Grau et al., 2012), si bien no se conocen precedentes de aplicación sobre jamoncitos de pollo con piel. De modo que el objetivo de este trabajo era evaluar la capacidad de la tecnología VIS-NIR para cuantificar la calidad microbiológica de jamoncitos de pollo con piel, envasados en atmósfera modificada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra. En la fase de calibración se han utilizado un total de 150 bandejas (unidad experimental), que contienen de 5 a 7 jamoncitos de pollo con piel envasados en atmósfera modificada. Estas bandejas procedían de 6 tandas de muestreo distintas, a su vez cada tanda se corresponde con un lote distinto. Dentro de cada tanda las bandejas se repartieron de forma que al menos 5 bandejas eran muestreadas en cada tiempo seleccionado a lo largo del

período de envasado. Para la fase de validación se recogieron otras 16 bandejas de un séptimo lote que fueron muestreadas a lo largo del período de envasado.

Análisis microbiológico. Para la evaluación de la calidad microbiológica se ha realizado el recuento de aerobios mesófilos y Enterobacterias de cada bandeja para lo que se ha recogido piel de los distintos jamoncitos de una bandeja y se ha creado una muestra conjunta para cada bandeja. Tras la toma de muestra y la preparación de una dilución madre 1:10, la determinación de microorganismos indicadores se ha llevado a cabo mediante la metodología del número más probable (NMP) miniaturizado y basada en el sistema Tempo®.

Análisis Estadístico. El análisis estadístico de los datos microbiológicos se realizó mediante el paquete SPSS vs 15.0. Se eliminaron espurios, se comprobó la normalidad mediante un Test Kolmogorov-Smirnov, y se estudió el efecto del lote y del tiempo de conservación sobre las variables microbiológicas mediante ANOVA.

VIS-NIR. La toma de espectros se realizó con un equipo LABSPEC 5000 (ASD), dotado de una sonda de superficie, que mide en reflectancia (350-2500nm, con 1nm de intervalo y 50 scans por disparo). Se recogieron espectros de cada jamoncito antes (con film) y después (sin film) de retirar el film protector, que fueron promediados obteniéndose un espectro medio por bandeja.

El análisis quimiométrico se realizó con el software comercial Unscrambler vs 10.3. Para estudiar el efecto del film y de la tanda de muestreo se han realizado Análisis Discriminantes y de Componentes Principales. Se ha trabajado tanto con los espectros brutos o tras aplicarles distintos tratamientos matemáticos (1ª y 2ª derivada, correcciones de efectos aditivos y dispersivos SNVD, MSC etc) así como seleccionando distintas regiones espectrales.

Para el análisis cuantitativo de la calidad microbiológica se han generado modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-R) y validación cruzada completa. Los mejores modelos fueron seleccionados en base a los coeficientes de determinación de calibración (R^2) y validación cruzada (R_{cv}^2) los errores típicos de calibración (ETC) y validación cruzada (ETCV) así como de los estadísticos RER (Rango/ETCV) y RPD (SD/ETCV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico de los datos microbiológicos mostraba un incremento significativo de la carga bacteriana de cada tanda a lo largo del tiempo. Además al analizar el efecto de las diferentes tandas sobre los recuentos de aerobios mesófilos y Enterobacterias, en los tiempos de muestreo comunes, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tandas, por lo que se demuestra que el lote es un factor importante que afecta considerablemente a dichas variables microbiológicas.

Fase de Calibración.

En primer lugar se comprobó la existencia de diferencias entre las poblaciones espectrales recogidas con o sin film (discriminación correcta del 95% de las muestras) por lo que hemos desarrollado calibraciones independientes según haya sido la recogida de espectros (con o sin film).

La tabla 1 resume los resultados de los mejores modelos obtenidos para la determinación de las variables microbiológicas analizadas, mostrando valores adecuados de coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada (> 0.8), errores típicos de calibración y validación cruzada (entre 0.5-0.6) así como de los estadísticos RER (> 8) y RPD (> 2).

Tabla 1: Estadísticos de calibración y validación cruzada.

CON FILM	N	ETC	R^2	ETCV	R_{cv}^2	RER	RPD
AM	134	0.48	0.90	0.69	0.79	8.6	2.2
ENT	122	0.52	0.87	0.61	0.82	10.6	2.3
SIN FILM	N	ETC	R^2	ETCV	R_{cv}^2	RER	RPD
AM	134	0.52	0.88	0.65	0.81	9.1	2.3
ENT	128	0.60	0.80	0.689	0.74	8.5	1.9

AM: Aerobios mesófilos. **ENT:** Enterobacterias. **N:** número de bandejas. **ETC:** error típico de calibración. **R^2 :** coeficiente de determinación de calibración. **ETCV:** error típico de validación cruzada. **R_{cv}^2 :** coeficiente de determinación de validación cruzada. **RER:** Ratio entre el rango de los datos y el error típico de validación cruzada. **RPD:** Ratio entre la desviación típica de la variable y el error típico de la validación cruzada.

Fase de Validación.

Estos modelos de calibración han sido validados con 16 bandejas procedentes de una nueva tanda/lote de muestreo. Los valores predichos de recuento microbiológico de las muestras de validación eran correctos y semejantes a los obtenidos mediante la analítica de referencia. El promedio, en valor

absoluto, de las diferencias entre datos predichos y reales fue de 0.40 log ufc/g para aerobios mesófilos y de 0.39 log ufc/g para Enterobacterias en los modelos generados en presencia del film y de 0.39 log ufc/g (aerobios mesófilos) y de 0.38 log ufc/g (Enterobacterias) en los modelos generados en ausencia del film. La desviación típica promedio de los datos predichos es de 0.76-0.77 log ufc/g para aerobios mesófilos y de 0.65-0.66 log ufc/g para Enterobacterias (ver tabla 2).

Tabla 2: Estadísticos de validación de los modelos quimiométricos generados

CON FILM	SEP	DESVEST	Dif
AM	0.50	0.77	0.40
ENT	0.55	0.65	0.34
SIN FILM	SEP	DESVEST	Dif
AM	0.48	0.76	0.39
ENT	0.53	0.66	0.38

AM: Aerobios mesófilos. **ENT:** Enterobacterias. **SEP:** Error típico de predicción. **DESVEST:** promedio de las desviaciones estándar de los datos predichos. **Dif:** promedio de los valores absolutos de la diferencia entre el valor real y el predicho.

Los resultados muestran que en todos los casos el error típico de predicción (SEP) de los modelos (aproximadamente 0.5 log ufc/g) es menor de dos veces el error típico de laboratorio.

De las 16 muestras utilizadas en la validación únicamente en una muestra para aerobios mesófilos (7%), y en 2 muestras para Enterobacterias (13%), tanto con film como sin él, el valor de referencia está fuera del rango de predicción de la calibración (valor predicho \pm desviación típica) por lo que se considera que dichas muestras no han sido bien predichas.

Pese al número limitado de diferentes lotes incluidos las calibraciones desarrolladas muestran una gran robustez. No obstante sería necesario ir incluyendo, de forma sistemática, nuevos datos provenientes de lotes no incluidos en la calibración.

Este trabajo muestra por primera vez el potencial de la espectroscopía VIS-NIR para la predicción cuantitativa de la calidad microbiológica en jamoncitos de pollo con piel y con presencia o no del film de envasado.

BIBLIOGRAFÍA

- Grau, R., Sánchez, J.A., Girón, J., Iborra, E., Ana Fuentes, A., Barat, J.B. 2011. Nondestructive assessment of freshness in packaged sliced chicken breasts using SW-NIR spectroscopy. *Food Research International*, 44: 331-337.
- Sun, D. 2009. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Academic Press / Elsevier, San Diego, California, USA.
- Tito, N.B., Rodemann, T., Powell, S.M., 2012. Use of near infrared spectroscopy to predict microbial numbers on Atlantic salmon. *Food Microbiol.*, 32:431-436.
- Williams, P., Norris, K. 2001. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2nd Edition. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.

Detección de *Salmonella* spp. en huevos frescos mediante el método de PCR a tiempo real SureTect™

Belén Moreno¹, Ruth Rodríguez¹, Patricia Urizarren¹, Carmen Oria², Nagore Errazti³ y Juncal Artieda⁴

¹ Laboratorio de Salud Pública de Gipuzkoa, San Sebastián, Gobierno Vasco, labora3-san@ej-gv.es

² Unidad de Sanidad Alimentaria, Subdirección de Salud de Gipuzkoa, San Sebastián, Gobierno Vasco

³ Comarca de Salud Pública Tolosa-Gohierri, Tolosa, Gobierno Vasco

⁴ Unidad de Epidemiología, Subdirección de Salud de Gipuzkoa, San Sebastián, Gobierno Vasco

En el estudio de varios brotes de gastroenteritis de origen alimentario causados por *Salmonella* Enteritidis, cuyo posible vehículo transmisor eran huevos frescos procedentes de una explotación, se estudió la presencia de *Salmonella* spp. en 60 muestras de huevo, tanto en la cáscara como en su interior, realizando el análisis de cribado en paralelo mediante dos métodos validados por AFNOR; un método nuevo de detección por PCR a tiempo real, Thermo Scientific SureTect™ *Salmonella* spp. PCR Assay, y un método inmunoenzimático de detección de antígenos de *Salmonella*, VIDAS *Salmonella* (VIDAS SLM). La confirmación se realizó en base a la norma ISO 6579. Los resultados fueron concordantes, detectándose *Salmonella* Enteritidis en el 5 % de las muestras analizadas por ambos métodos. Sin embargo, se comprobó que el método nuevo de PCR presentaba varias ventajas con respecto al inmunoenzimático, principalmente la disminución del tiempo de respuesta y una mayor rapidez y comodidad al disminuir el número de pasos en la manipulación.

INTRODUCCIÓN

Tras la aparición de varios brotes de gastroenteritis aguda cuyo origen fue *Salmonella* Enteritidis se inició el estudio epidemiológico y ambiental para determinar su existencia y magnitud, identificar la fuente de infección, el modo de transmisión, los factores de riesgo relacionados y establecer las medidas de control oportunas. Los huevos frescos de una explotación de Gipuzkoa fueron el alimento implicado en los brotes.

El objeto del estudio es evaluar el sistema SureTect™ para la detección de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real para su implantación en un laboratorio acreditado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo: la metodología utilizada permitió un muestreo sistemático de todo el producto clasificado y envasado por el centro de embalaje, utilizando un arranque aleatorio o valor a partir del cual se iniciaba la toma de muestras y un intervalo, definido como el número de medias docenas entre cada una de las muestras. El número de muestras correspondientes a cada una de las manadas y procedencias, se estimó en base al número de medias docenas clasificadas y envasadas el día del muestreo. Cada muestra seleccionada estaba compuesta por 6 huevos.

Parámetros: se procedió a la investigación de la presencia de *Salmonella* spp., tanto en la cáscara como en el interior de los huevos. Para ello, se siguió el método utilizado habitualmente en el laboratorio, acreditado por ENAC, VIDAS *Salmonella* (VIDAS SLM), método inmunoenzimático validado por AFNOR, que permite la

detección de antígenos de *Salmonella* por el método ELFA mediante el sistema automatizado VIDAS.

Con el fin de mejorar el tiempo de respuesta del laboratorio, las muestras se analizaron en paralelo por el método Thermo Scientific SureTect™ *Salmonella* spp. PCR Assay, validado por AFNOR. Es un sistema nuevo de detección de *Salmonella* spp. en alimentos mediante PCR a tiempo real.

Cada muestra estaba compuesta por seis unidades de huevo. Se procesó de forma separada la cáscara, lavado con 100 ml agua de peptona tamponada (APT), y el interior, homogeneizado con 1 L de APT, 37 °C a 16-20 h.

Protocolo VIDAS SLM: enriquecimiento selectivo de 1 ml del homogeneizado en caldo Muller-Kauffmann con Tetracionato y novobiocina (MKTTn), 6-8 h a 37 °C y de 0,1 ml en Rappaport Vassiliadis Soja (RVS), 6-8 h a 41,5 °C. Se transfirió 0,1 ml del caldo MKTTn a caldo M y paralelamente, 1 ml del caldo RVS a otro tubo de caldo M, 16-20 h a 41,5 °C. Se reincubaron los caldos MKTTn y RVS 6-20 h. Se transfirió 250 µl de cada caldo M a un cartucho VIDAS SLM, y se calentó en VIDAS Heat & Go® a 95-100 °C 15 min. Se dejó enfriar el cartucho y se llevó a cabo el test VIDAS. Los resultados positivos se confirmaron en agar XLD y Brilliance® *Salmonella* (SALM), incubando 24 h a 37° C. La confirmación de las colonias se realiza en base a la norma ISO 6579.

Protocolo SureTect™: tras el enriquecimiento en APT se añadió 10 µl del homogeneizado al tubo con reactivos de lisis, al que previamente se había añadido 10 µl de Proteínasa K. Se incubaron 10 min a 37 °C y seguidamente 5 min a 95 °C. Se dejó enfriar 2 min a temperatura ambiente. Se añadió 20 µl del lisado a un tubo con reactivos de PCR. Se lanzó la reacción de PCR utilizando el equipo Thermo Scientific™ PikoReal™. El software interpreta automáticamente los resultados. Los positivos se confirman

mediante cultivo del APT en agares SALM y XLD, incubando 24 h a 37° C. La confirmación de las colonias se realiza en base a la norma ISO 6579.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados fueron concordantes, se detectó *Salmonella* Enteritidis, cepa no vacunal, en 3 de las 60 muestras de cáscara de huevo (5 %) por ambos métodos. El protocolo VIDAS SLM exigió un enriquecimiento secundario empleando cuatro caldos por muestra, mientras que el protocolo SureTect™ permite realizar la PCR directamente desde el homogenizado con APT. Los resultados del cribado mediante el sistema VIDAS se obtuvieron a las 48 horas, mientras que con el sistema SureTect™ este tiempo fue de 24 horas.

Al evaluar los dos métodos de análisis el laboratorio se decantó por utilizar el método de detección mediante PCR al presentar las siguientes ventajas: menor tiempo de respuesta, negativos a las 24 h, no es necesario realizar enriquecimiento secundario, lo cual implica menos pasos en la manipulación, haciendo el flujo de trabajo más fácil, rápido, cómodo y con menor probabilidad de errores.

BIBLIOGRAFÍA

- AFNOR UNI 03/07-11/13 Thermo Scientific SureTect™ *Salmonella* spp. PCR Assay.
- UNE-EN ISO 6579. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
- AFNOR BIO 12/1-04/94.- VIDAS *Salmonella* (VIDAS SLM)) - Ref 30702 (protocolo double) pour la recherche de *Salmonella*.

Secuencia y análisis del *locus* de la plantaricina C, lantibiótico producido por *Lactobacillus plantarum* LL441

Baltasar Mayo¹, Evaristo Suárez^{1,2}, Susana Delgado¹, Lucía Guadamuro¹ y Ana Belén Flórez¹

Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa¹, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Julián Clavería, 6, 33006-Oviedo², Asturias baltasar.mayo@ipla.csic.es

En nuestro laboratorio identificamos una cepa de *Lactobacillus plantarum*, LL441 aislada del queso de Cabrales capaz de producir una bacteriocina de tipo lantibiótico (plantaricina C) que resultó ser activa contra diversas bacterias Gram-positivas patógenas y alterantes. La forma activa de la bacteriocina contiene 27 aminoácidos y actúa formando poros en las cepas sensibles de forma voltaje-independiente y sin requerir la presencia de una proteína receptora en la membrana. En esta comunicación presentamos la secuencia y el análisis del *locus* responsable de la síntesis de la plantaricina C, la cual se ha obtenido tras la secuenciación genómica de la cepa productora. La región codificadora de la bacteriocina comprende algo más de 8 kpb de ADN en los que se encuentra el gen estructural de la plantaricina C, un gen implicado en la modificación postraduccional del péptido y cuatro genes que codifican componentes de transportadores de tipo ABC; estos se suponen implicados en las funciones de inmunidad y secreción de la bacteriocina.

INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal con gran potencial para ser utilizadas de manera alternativa o combinada con los antimicrobianos convencionales. Las producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL) se consideran productos naturales adecuados para su empleo en la conservación de alimentos. Las bacteriocinas de las BAL se agrupan en tres grandes clases: péptidos con aminoácidos modificados, proteínas no modificadas y proteínas circulares. A la primera clase pertenecen los lantibióticos que contienen lantionina, β -metil lantionina, dehidrobutirina y/o dehidroalanina. A este grupo pertenece la nisina, producida por cepas de *Lactococcus lactis* y cuya aplicación como conservante alimentario (E234) está aprobada en más de 50 países (EFSA, 2006).

Durante la caracterización fenotípica y tecnológica de un conjunto de cepas de BAL, se descubrió que *Lactobacillus plantarum* LL441 presentaba una fuerte actividad antimicrobiana contra diversas bacterias Gram-positivas (Herrero et al., 1996). La actividad se vio que estaba mediada por una molécula pequeña (≈ 3.5 kDa) de naturaleza peptídica, capaz de retener la actividad inhibitoria a diferentes pHs y resistir la ebullición, a la que se llamó plantaricina C (González et al., 1994). La purificación y secuenciación del extremo aminoterminal reveló la siguiente secuencia aminoacídica: NH₂-K-K-T-K-K-N-X-S-G-D-I- (González et al., 1994). La secuencia completa de la bacteriocina se obtuvo posteriormente mediante resonancia magnética nuclear (RMN), resultando ser un nuevo lantibiótico de 27 residuos aminoacídicos

con tres aminoácidos modificados: una dehidroalanina, una lantionina y tres β -metil-lantioninas (Turner et al., 1999).

En este trabajo damos cuenta de la secuencia y análisis del *locus* que codifica el gen estructural de la plantaricina C y los de la maquinaria metabólica que presumiblemente está implicada en su modificación postraduccional, inmunidad y secreción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Secuenciación genómica de *L. plantarum* LL441. Se utilizó ADN total de la cepa *L. plantarum* LL441 purificado para construir genotecas de un tamaño de 0.5 kpb que se sometieron posteriormente a secuenciación por los dos extremos en secuenciador Illumina. Las secuencias obtenidas se filtraron por calidad y se ensamblaron con el programa Velvet (Zervino et al., 2008).

Anotación genómica. La anotación genómica se llevó a cabo mediante el servidor RAST (Azid et al., 2008) y el análisis de homología proporcionado por el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, para la descripción de genes y operones específicos se consultaron las bases de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), Uniprot (<http://www.uniprot.org>) y COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la secuenciación genómica se obtuvieron 170 segmentos con tamaños comprendidos entre las 201 y 116.756 pb. El genoma de *L. plantarum* LL441

incluyó un total de 3.167.386 pb con un % GC del 44,52%. El servidor RAST identificó 2.917 genes. El gen estructural que codifica la bacteriocina se encontró en un segmento de 18.910 bp (Figura 1).

La región que codifica la plantaricina C (de unos 8,7 kpb) presenta una identidad nucleotídica del 91% con una parte del plásmido pPECL-6 de *Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344 cuyo genoma se ha hecho público recientemente (Pittet et al., 2012). La producción de bacteriocina por *P. claussenii*, sin embargo, no se conoce. En BAA-344, la región génica aparece flanqueada por secuencias de inserción, lo que sugiere una adquisición horizontal.

En *L. plantarum* LL441 por su parte, el *locus* de la plantaricina C parece estar formado por al menos seis *orfs* dispuestas en un único operón (en azul en la Figura 1). El primero de los genes codifica la proteína estructural de la bacteriocina, un péptido de 58 amino

deshidratación de serina y treonina; la región C-terminal, por su parte, parece catalizar la formación del anillo de las lantioninas. En los lantibióticos de tipo 1 (nisina y subtilina) aparece otra proteína modificadora, LanBC (Begley et al., 2009). Las bacteriocinas se sintetizan como péptidos inactivos que se activan por proteólisis durante la secreción, la cual se lleva a cabo por un transportador de tipo ABC. Son también transportadores de tipo ABC los que posibilitan la resistencia a la propia bacteriocina (inmunidad). En el *locus* de la plantaricina C aparecen cuatro *orfs* codificando componentes de transportadores de este tipo (Figura 1).

CONCLUSIÓN

Disponer de la secuencia genética de la región codificadora de la plantaricina C permitirá el estudio molecular de sus componentes y las funciones que cada uno de ellos tiene en el proceso de síntesis,

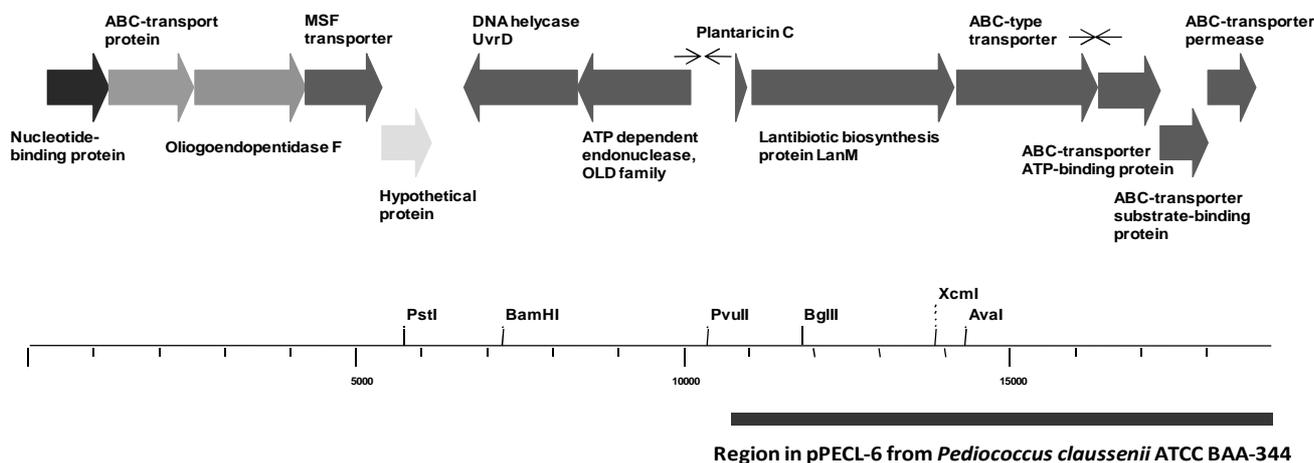


Figura 1.- Representación esquemática del *locus* de la plantaricina C, indicando la orientación y tamaño de las ORFs, la homología de las proteínas codificadas, y algunos sitios relevantes de restricción.

ácidos de los cuales 31 conforman el péptido señal de secreción y los otros 27 darán lugar a la forma procesada y activa de la bacteriocina.

El péptido señal de la plantaricina C (MKKNLMNSAEESGNGVLEELNNAQLGMISGG) parecer ser muy específico, dado que no presenta homología con regiones similares de otras proteínas (excepto con la proteína equivalente de pPECL-6).

Sin embargo, el motivo de la doble glicina (GG) antes del punto de corte es característico de muchas bacteriocinas de bacterias Gram-positivas y de sistemas de señalización celular.

Tras el gen estructural aparece un largo gen (*lanM*) que codifica la proteína que llevaría a cabo las modificaciones postraduccionales de la plantaricina C. LanM es característica de los lantibióticos de tipo 2 (mersacidina, cinamicina y lichenicidina). La región N-terminal de LanM está involucrada en la

modificación, transporte e inmunidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aziz et al. 2008. BMC Genomics 9:75.
 Begley et al. 2009. Appl. Environ. Microbiol., 75:5451-5460.
 EFSA. 2006. EFSA J., 314:1-16.
 González et al. 2006. Appl. Environ. Microbiol., 60:2158-2163.
 González et al. 1996. Appl. Environ. Microbiol., 62:2701-2709.
 Herrero et al. 1996. J. Appl. Bacteriol., 81:565-570.
 Pittet et al. 2012. Bacteriol., 194:1271-1272.
 Turner et al. 1999. Eur. J. Biochem., 264:833-839.
 Zerbino et al. 2008. Genome Res., 18:821-829.

Validación del nuevo método DryPlates®-XBC

Jorge Sanchis

Laboratorios MICROKIT, S.L. Madrid, España, Microkit@microkit.es

INTRODUCCIÓN

El nuevo sistema validado tiene grandes ventajas sobre el método clásico, al tratarse de placas preparadas pero deshidratadas (1 año de caducidad), que absorben en masa y en frío 1 ml de muestra (a diferencia de las placas preparadas clásicas), lo que ahorra el punto crítico de la fusión de agar del método tradicional para siembra en masa, así como mucha manipulación y tiempo de trabajo. Y tiene grandes ventajas sobre otros sistemas similares, al no necesitar aplicadores para homogeneizar la mezcla de muestra con el medio (por autodifusión natural de la muestra) y al incluir su soporte una fibra de malla muy fina, que permite obtener colonias con aspectos muy similares a los de las colonias crecidas en medios agarizados clásicos. Las DryPlates® minimizan la manipulación de la siembra en masa, permitiendo el paso de la muestra a la estufa, en sólo 10 segundos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre Septiembre y Octubre de 2013 se compara durante su diseño final un total de 99 muestras con cepas de referencia cuantitativas para el parámetro de detección y recuento de *Bacillus cereus*, siguiendo el método MICROKIT® mediante DryPlates®-XBC, con respecto al método oficial (Normas Técnicas oficiales vigentes para microbiología): Agar Mossel (PREP, MYP, ISO 7932, ISO 21871) y UNE 11133-2 sobre control de la fertilidad de los medios de cultivo cuantitativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento en placa de *B.cereus* en DryPlates®-XBC de MICROKIT® respecto al método de referencia.

Estudiamos los parámetros estándar de validación cuantitativa con lectura de resultados a las 18 h:

- Exactitud (recuperación relativa de un método respecto al otro)
- Precisión del método (repetitividad por triplicados + reproducibilidad mediante analistas y días diferentes)
- Rango de recuento (límites superior e inferior de cuantificación)

Tabla 1: Presentación de resultados comparativos.

CEPAS DE REFERENCIA EMPLEADAS: en todas las placas hay <i>B. cereus</i> y además un interferente o acompañante:	DRYPLATE X-BC Media N° colonias diana (azul con viraje del medio a fucsia)	placa 90mm Mossel Media N° colonias diana (céréas con viraje del medio a fucsia)	%RECUPE RACIÓN RELATIVA DryPlates®-XBC de MICROKIT® respecto a método dref.
<i>Aerococcus viridans</i>	55	34	162 %
<i>Aspergillus niger</i>	65	12	542 %
<i>Bacillus cereus</i> sin otras cepas	152	118	129 %
<i>Bacillus subtilis</i>	57	27	211 %
<i>Bacillus thuringiensis</i>	incont masas azules (sin viraje del medio a fucsia en 18h)	35	---
<i>Burkholderia cepacia</i>	58	13	446 %
<i>Candida albicans</i>	64	16	400 %
<i>Caulobacter vibroides</i>	48	26	185 %
<i>Citrobacter freundii</i>	52	15	347 %
<i>Clostridium perfringens</i>	48	18	267 %
<i>Clostridium sporogenes</i>	62	23	270 %
<i>Enterococcus faecalis</i>	81 y colonias verdes 24	20 y colonias no diana 10	405 %
<i>Escherichia coli</i>	60	17	353 %
<i>Klebsiella aerogenes</i>	78	12	650 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	62	12	517 %
<i>Listeria monocytogenes</i>	masa negruzca	masa distintos colores	---
<i>Listeria innocua</i>	65	20	325 %
<i>Listeria ivanovii</i>	62	17	365 %
<i>Listeria welshimeri</i>	masa negruzca	masa distintos colores	---
<i>Micrococcus luteus</i>	59	18	328 %
Mix Lactobacilos salvajes	65	13	500 %
<i>Proteus mirabilis</i>	34	23	148 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62	19	326 %
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	37	15	247 %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88	23	383 %
<i>Salmonella nottingham</i>	59	20	295 %
<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	81	12	675 %
<i>Salmonella enteritidis</i>	68 y colonias amarillas 63	15	453 %
<i>Serratia marcescens</i>	73	17	429 %
<i>Shigella sonnei</i>	50	16	312 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	51	20 y colonias amarillas 180	255 %
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	46	12	383 %
<i>Yersinia enterocolitica</i>	47	13	362 %

Se ha comprendido el rango de recuento en placa entre 32 y 152 colonias/placa. En él, la **exactitud** de las DryPlates®-XBC con respecto al Agar de

referencia es impresionante, superando en todos los casos el 100% de recuperación y obteniendo una media de $355,67 \pm 132,5$ % de recuento, lo cual se puede asegurar (no se trata de falsos positivos) al conocerse el valor inóculo de la cepa diana. Se concluye que el método DryPlates®-XBC es capaz de detectar hasta **3,5 veces más ufc de *Bacillus cereus*** que el método de referencia cuando hay cepas acompañantes y 1,3 veces más cuando se trata de cultivos puros.

Las réplicas realizadas tanto en triplicados de placas de ambos métodos como en repeticiones por parte de diferentes analistas y en diferentes días, no arrojan diferencias significativas entre ambos métodos, ya que la precisión depende más de otros factores que de los medios de cultivo: La **precisión es adecuada** tanto en repetibilidad como en reproducibilidad.

Los únicos **interferentes** que crecen en DryPlates®-XBC, pero siempre con colonias de colores diferentes a la diana (azul con halo fucsia en 18 h) son:

-*Bacillus thuringiensis*: colonias azules PERO medio salmón cuando no está presente *B. cereus*; mezcla de colonias azules y medio fucsia cuando está presente *B. cereus*. En el medio de referencia no se distinguen los dos tipos de colonias.

-*Enterococcus faecalis*: PERO colonias verdes y medio salmón cuando no está presente *B. cereus*; mezcla de colonias verdes y azules y medio fucsia cuando está presente *B. cereus*. En el medio de referencia también aparecen colonias atípicas.

-*Listeria monocytogenes* y *L. welshimeri*: PERO colonias negras y medio salmón cuando no está presente *B. cereus*; mezcla de colonias negras y azules y medio fucsia cuando está presente *B. cereus*. En el medio de referencia también aparecen colonias atípicas con ambas especies.

-*Salmonella enteritidis*: PERO colonias amarillas y medio salmón cuando no está presente *B. cereus*; mezcla de colonias amarillas y azules y medio fucsia cuando está presente *B. cereus*. En el medio de referencia no aparecen colonias atípicas de este microorganismo, pero sí de *Staphylococcus aureus*, con lo cual el número de interferentes es el mismo en ambos métodos; con la ventaja del método DryPlates®-XBC de distinguir perfectamente en todos los casos entre el microorganismo diana y el interferente, lo cual no ocurre en el método de referencia con *B. thuringiensis*, que implica falsos positivos.

De modo que no se puede hablar de interferentes que crean falsos positivos en el método DryPlates®-XBC, que demuestra así una **especificidad exclusiva**.

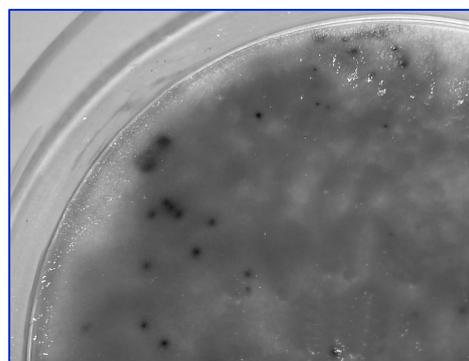
No han aparecido falsos negativos, lo que demuestra una **sensibilidad inclusiva** para el método DryPlates®-XBC.

Hay que ser prudentes no obstante a la hora de valorar el comportamiento de las Dry-Plates® XBC de MICROKIT® en algunas matrices, por ejemplo muy espesas, grasas, insolubles en agua o muy salinas.

Por todo ello, quedan VALIDADAS las Dry-Plates® XBC para detección y recuento de *Bacillus cereus*, ya que con sus datos de validación demuestran ser, no sólo la forma más cómoda y práctica de trabajar en microbiología, sino además la más fiable. Además, lo hacen como mínimo, tan bien como el método de referencia, demostrando una muy superior sensibilidad relativa, así como una mayor exactitud y economía que el método de referencia, en su implantación en los distintos laboratorios que los aplican. La mayor facilidad de uso de este método permite realizar muchas más muestras en menos tiempo, a la vez que se disminuye el número de puntos críticos del análisis y por tanto se aumenta su robustez incluso para usuarios poco acostumbrados a su manejo o a las técnicas microbiológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- UNE-EN ISO 7932: 1993, ISO 7932:2004 Microbiología. Guía general para el recuento de *Bacillus cereus*. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- UNE-EN-ISO 21871:2006 Microbiología de alimentos: Método horizontal para el recuento de números bajos de presuntos *B.cereus*
- ISO/TS 11133-2:2003 Microb.alim: Preparación y producción de medios de cultivo-Pruebas de rendimiento
- UNE-EN ISO 16140: Microbiología de los alimentos: Protocolo para la validación de métodos alternativos
- Sanchis, J. 2006 PRT-VAL-001 Protocolo MICROKIT para VALIDACIÓN en microbiología (69 páginas).
- Sanchis, J. 09/2008: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de alimentos, VALIDADOS mediante 10 años de ensayos intercomparativos SEI ALIMENTOS. XVI Congreso microbiología de alimentos. Córdoba, 9/2008.



DryPlates® XBC: en 6-18 horas, colonias azules y medio virado casi completamente del salmón al fucsia

Doble enriquecimiento simultáneo para detección de *Salmonella*

Jorge Sanchis

Laboratorios MICROKIT, S.L. Madrid, España, jorge@microkit.es

INTRODUCCIÓN

La Norma ISO 6579 para detección de *Salmonella* en alimentos promueve el uso de un pre-enriquecimiento revitalizador de 25 ml de muestra en 225 ml de Agua de Peptona Tamponada, seguido de un post-enriquecimiento selectivo en dos caldos (0,1 ml en 10 ml de Rappaport VS y 1 ml en 9 ml de MK Tetracionato), antes de pasar a las placas de agar selectivos, de los que uno es obligado (XLD Agar) y otro de elección del laboratorio usuario. Posteriormente se confirman las colonias sospechosas con diversas pruebas inmunológicas y bioquímicas.

En MICROKIT llevamos ya más de 15 años demostrando por intercomparación (servicio Seilalimentos) que ni el Agua de Peptona Tamponada ni el Rappaport VS son los medios ideales para el aislamiento en muchos alimentos de la gran gama de cepas que existen de *Salmonella spp.* Simplemente sustituyendo el Agua de Peptona Tamponada por Buffered Peptone Neutralizing Water (BPN), obtenemos muy superiores recuperaciones en todo tipo de microorganismos y en la mayoría de matrices alimentarias, dado que los inactivadores de conservantes que incorpora este diseño de MICROKIT permite neutralizar los conservantes típicos de la mayoría de alimentos, sean naturales (ajo, pimentón, pimienta, aromáticas, aceites esenciales, benzopirenos del humo...) o artificiales E200-E285 (sorbatos, benzoatos, propionatos, boratos, sulfitos, nitritos, nitratos, ácidos, nisina, natamicina, óxidos, hidróxidos, tocoferoles, lisozima...); también se inactivan los metabolitos del crecimiento de la flora acompañante, que impiden a la *Salmonella* manifestarse en muchas ocasiones en el Agua Peptonada Tamponada clásica. Y sustituyendo el Rappaport VS Broth por SS Broth (1 ml del pre-enriquecimiento en 9 ml de SS Broth y de MK Tetracionato), no se escapan cepas de *Salmonella* que, bien por estar subletales, bien por ser atípicas, dan falsos negativos en el primero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nos propusimos dar un paso más, acortando el tiempo de incubación, de las 18 h del pre-enriquecimiento más 18 h del post-enriquecimiento, a sólo 18 h en un enriquecimiento mixto. Los resultados preliminares en 2013, empleando Rappaport concentrado, añadido a los 225 ml de Buffered Peptone Water, para la incubación conjunta de 18 horas,

como promueven algunos métodos franceses, dieron resultados inaceptables, con numerosos falsos negativos para las 3 cepas de *Salmonella* empleadas y en casi todas las matrices alimentarias (se emplearon 20 de las más variadas, abarcando todo el abanico de matrices alimentarias).

En Mayo de 2014 se estudia de nuevo la sensibilidad (escasez de falsos negativos) en un nuevo método acortado de enriquecimiento de *Salmonella*, consistente en enriquecer los 25 g de alimento dopado con *Salmonella* en 225 ml de BPN a los que se añaden antes de la incubación, 18 ml de SS Broth concentrado [x5]. Tras incubar el conjunto sólo 18 h a 35°C, se estría en la superficie de placas de Cromosalm Agar y de XLD Agar, que se incuban otras 18 h para estudiar la aparición de colonias características.

Concretamente, añadiendo 18 ml de caldo SS concentrado [x5] al Buffered Peptone Neutralizing con la muestra; la mitad del SS Broth indicado a un duplicado; y la cuarta parte del SS Broth indicado a un triplicado. El experimento se realizó con tres cepas de *Salmonella* (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Nottingham*) inoculadas a muy baja concentración (<10 ufc/25 g) junto con un mix de flora acompañante a muy alto nivel: 10⁷ ufc de una mezcla de *Klebsiella aerogenes* como enterobacteria interferente, *Pseudomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* como Gram negativos oxidasa positivos, y *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus warneri* como Gram positivos. En matrices bastante desfavorables para las *Salmonella*, a causa de su bajo pH y presencia de conservantes fuertes: salsa rosa, salsa César, Ketchup y salsa de yogur, que habían reportado falsos negativos en el experimento de 2013 con el método BPW + Rappaport concentrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras las 18 h de este enriquecimiento mixto de BPN y SS Broth, ya había alerta de presencia de *Salmonella* en el 100% de los casos con 18 ml de SS Broth concentrado [x5], porque el caldo había virado a negro (los caldos menos concentrados tardaron en virar otras 18 h adicionales, por lo que no sirvieron de pre-alerta).

Se estrió el enriquecimiento en placas de XLD y de Cromosalm (el medio cromogénico para *Salmonella* de Microkit, base DCA) y se incubaron 18 h, de modo que el aislamiento costó exactamente 36 h desde la muestra (y sólo 18 h como presuntivo por viraje del caldo mixto a negro).

Todas las placas (el 100% de 60) dieron estría positiva para *Salmonella* (verde azulada en cromosalm y negra en XLD) en todas las matrices y para las 3 cepas. Sólo una placa en la salsa yogur obtuvo en Cromosalm crecimiento enmascarado de *Salmonella* (estría negra por la ingente cantidad de *Klebsiella*) pero fue detectada gracias al XLD. Además no es esperable en muestras naturales semejante concentración de enterobacterias acompañantes junto a tan bajísima concentración de *Salmonella*, ya que los niveles de ambas suelen estar en correlación.

Se concluye que el método de acortamiento del análisis de *Salmonella* a 18 h de pre + post enriquecimiento simultáneos en BPN + SS Broth, y 18 h de aislamiento en placa (Cromosalm y XLD Agar) puede aplicarse con la certeza de la detección de *Salmonella* spp. incluso en los peores casos (elevada flora interferente y acompañante, bajísimo nivel de *Salmonella*, matrices inhibitorias...).

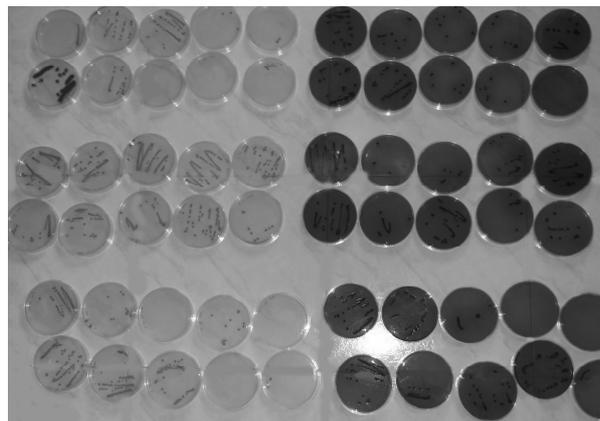
Además es un método muy económico.

Por todo ello animamos a las industrias a emplearlo para minimizar el gran coste que les supone la retención de 1-3 días adicionales de stock de producto terminado precisamente a la espera del informe de liberación del laboratorio a causa de la lentitud del método clásico de detección de *Salmonella*.

BIBLIOGRAFÍA

1992. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos.
1982. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del CENAN Instituto Nacional de Sanidad.
1989. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Instituto de Salud Carlos III. Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos. Corrie Allaert, Marta Escolá, Díaz de Santos, 2002
- DIRECTIVA EUROPEA 2073/2005 de 15 de Noviembre sobre Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 22.12.2005
- 2008 Recopilación de Normas microbiológicas de alimentos. Manuel Moragas (Ayuntamiento de Bilbao) y M^a Begoña de Pablo (Sanidad del Gobierno Vasco).
- ISO 7218. Microbiología de los alimentos. Reglas Generales para los análisis microbiológicos.
- ISO 6579. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella*.
- Norma ISO/TS 11133-2:2003 Microb. Alim: Preparación y producción de medios de cultivo-Pruebas de rendimiento
- UNE-EN ISO 16140: Microbiología de los alimentos: Protocolo para la validación de métodos alternativos

- ISO 5725: Precisión de los métodos de ensayo. Determinación de repetibilidad y reproducibilidad mediante intercomparativos
- Informes SEILALIMENTOS 1 a 58 (total 2.200 páginas), Laboratorios MICROKIT, Marzo-1999 a Junio-2013
- PRT-SEILA-001: Protocolo GLOBAL VALIDADO para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos SEILALIMENTOS) (42 páginas)
- PRT-VAL-001 Protocolo para VALIDACIÓN en microbiología (69 páginas)
- PRT-VAL-1+2, Idem, incluido CD con hojas de cálculo en Excel.
- 09/2008: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de alimentos, VALIDADOS mediante 10 años de ensayos intercomparativos SEILALIMENTOS. XVI Congreso microbiología de alimentos. Córdoba, 9/2008
- 05/2009: CONCLUSIONES DE LOS PROTOCOLOS MICROKIT PARA ALIMENTOS. Conclusiones sobre la validación de los protocolos MICROKIT optimizados para análisis microbiológico de alimentos frente a la normativa relacionada, mediante los ensayos intercomparativos Seilalimentos. Tecnicas de Laboratorio 341. Life sciences lab 5.
- 07/2009: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para análisis microbiológicos de alimentos. Alimentación, equipos y tecnología 245.
- 03-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. Validación de análisis de alimentos y esquema de trabajo. 12 pp. MICROKIT © 16-Julio-2009



Aproximaciones moleculares al análisis de BAL asociadas a la producción de “atole agrio”, bebida fermentada de maíz originaria de Tabasco (México)

A. Pérez¹, V. Illescas¹, P. Elizacuél¹, M. Nácher-Vázquez², C. Cárdenas³, G. Díaz³, J. Spinosa⁴, O. Reyes⁵, C. Wachter³, P.S. Cocconcelli⁶ y R. Aznar^{1,2}

¹Universidad de Valencia, Valencia, España, alba.perez@uv.es

²Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, España,

³Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.,

⁴Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México,

⁵Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, México,

⁶Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza-Cramona, Italy

Se determinó la composición de las poblaciones de bacterias lácticas (BAL) asociadas a la producción de atole agrio, un producto fermentado a base de maíz y originario de México, y su dinámica a lo largo de la fermentación, utilizando técnicas moleculares basadas en PCR, dependientes e independientes de cultivo. Se analizaron 13 muestras correspondientes a diferentes pasos del proceso de producción y se recuperaron un total de 234 presuntivas BAL que fueron identificadas mediante el análisis de los perfiles ISR-PCR y RAPD-PCR, PCR específica de especie y secuenciación del RNAr 16S. En paralelo, el ADN total de 10 muestras fue sometido a pirosecuenciación de la región hipervariable V3-V5 del RNAr 16S. Los resultados de identificación de los aislados de BAL revelaron la presencia de 8 especies diferentes. Mediante el análisis genómico se identificaron 53 especies de BAL, en su mayoría pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Weissella*, de ellas *Weissella confusa* (26,19%) y *Lactobacillus plantarum* (13,48%) aparecen como especies predominantes. Las muestras presentan la misma composición en géneros de BAL pero difieren en cuanto a abundancia relativa de géneros y especies. Las especies de BAL encontradas mediante técnicas independientes de cultivo apoyan su papel en las propiedades nutritivas y funcionales del atole, además los aislados permitirán realizar una selección de cepas con estas propiedades para la producción de alimentos funcionales.

INTRODUCCIÓN

El *atole agrio* es un producto fermentado a base de maíz originario de la región de Tabasco en México. Se produce mediante la fermentación de maíz joven molido, no nixtamalizado, en dos procesos paralelos: una fermentación sólida después de un paso de amasado, y una fermentación líquida por adición de agua al maíz molido. El atole constituye la base de alimentación de poblaciones indígenas y se le atribuyen propiedades nutritivas y funcionales, derivadas *a priori* de la fermentación del maíz. El estudio tanto del atole como de otros productos tradicionales fermentados andinos puede aportarnos información sobre nuevas poblaciones microbianas para su potencial utilización como cultivos iniciadores para mejorar la calidad nutricional y funcional de estos productos andinos. Es sabido que las poblaciones de bacterias lácticas (BAL) juegan un papel importante en las características finales del producto, por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la composición de las poblaciones de BAL asociadas a la producción de atole agrio y su dinámica a lo largo de ambas fermentaciones, utilizando técnicas moleculares basadas en PCR, dependientes e independientes de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación por técnicas dependientes de cultivo. Se analizaron 13 muestras correspondientes a diferentes pasos del proceso de producción: maíz molido después de añadir (tiempo 0 muestra A1), y a las 2h (A2), 4h (A4), 6h (A5), 12 h(A8) y 24h (A9), en ambas fermentaciones (sólida y líquida). A partir de las placas de recuento en medios MRS, MRS-maltosa, MRS-almidón e YPGL, se recuperaron un total de 234 colonias de BAL que fueron identificadas mediante el análisis de los perfiles ISR-PCR (Chenoll y col., 2003) y RAPD-PCR (Aznar y Chenoll., 2006; Chenoll y col. 2007) y PCR específica de especie. En este análisis también se incluyeron cepas de referencia procedentes de la CECT y los perfiles resultantes se identificaron por comparación con una base de datos previamente generada (IATA-UVEG) conteniendo perfiles correspondientes a 132 cepas de referencia. La adscripción de los *clusters* de aislados a una especie se confirmó mediante secuenciación del RNAr 16S de 1-3 cepas representativas del clúster. Estas secuencias se compararon con la base de datos del RDP.

Análisis de las poblaciones bacterianas mediante pirosecuenciación. El ADN extraído de 10 muestras (5 de la fermentación sólida y 5 de la líquida) fue sometido a pirosecuenciación de la región hipervariable V3-V5 del RNAr 16S (Sim y col., 2012), utilizando el secuenciador 454 FLX Titanium + (Roche) en las instalaciones de LifeSequencing (Valencia, Spain). Las secuencias fueron

analizadas por comparación con la base de datos del ARNr 16S del RDP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de identificación de los aislados de BAL revelaron la presencia de 8 especies, en orden de abundancia, *Pediococcus pentosaceus* (34,6%), *Weissella confusa* (30,7%), *Lactobacillus plantarum* (15,4%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (7,1%), *Lactobacillus brevis* (7,1%), *Lactococcus lactis* (2,6%), *Weissella paramesenteroides* (1,9%) y *Lactobacillus coryniformis* (0,6%).

El análisis mediante pirosecuenciación reveló que la fermentación líquida está dominada por miembros del género *Acetobacter* mientras que *Weissella* domina en la fermentación sólida. Se identificaron 53 especies de BAL, en su mayoría pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Weissella*, de ellas *W. confusa* (26,19%) y *Lb. plantarum* (13,48%) aparecen como especies predominantes en el proceso de elaboración de *atole* agrio.

Ambas aproximaciones de análisis muestran, en esencia, la misma composición en géneros de BAL. Sin embargo, difieren en la abundancia relativa de géneros y especies. El análisis de los aislados (Fig. 1) revela que *Pediococcus* es el género predominante durante la fermentación líquida, seguido por *Weissella* y *Lactobacillus*. Sin embargo, por pirosecuenciación (Fig. 2) el género predominante es *Lactobacillus*, seguido por *Weissella*. En la fermentación sólida encontramos una mayor abundancia del género *Weissella*, tanto por la aproximación mediante cultivo como por pirosecuenciación, mientras que *Leuconostoc* y *Lactococcus* son minoritarios en ambas fermentaciones.

De las especies identificadas por pirosecuenciación, se recuperaron por cultivo alrededor del 10% de las del género *Lactobacillus* detectadas en la fermentación sólida y 16% de la fermentación líquida. El porcentaje de recuperación de especies fue mayor en el caso de *Weissella* (29%) y *Leuconostoc* (25% en la fermentación sólida y 33% en la líquida). *Lactococcus* y *Pediococcus* presentaron la menor diversidad de especies recuperándose por cultivo entre el 33 y 100%. Los miembros del género *Enterococcus* y *Streptococcus* solo fueron detectados mediante el análisis por pirosecuenciación.

Las especies de BAL encontradas mediante técnicas independientes de cultivo apoyan su papel en las propiedades nutritivas y funcionales del *atole*. Por otro lado, disponer de los aislados permitirá realizar una selección de cepas en base a dichas propiedades, para

su aplicación en la producción de *atole* agrio u otros alimentos funcionales.

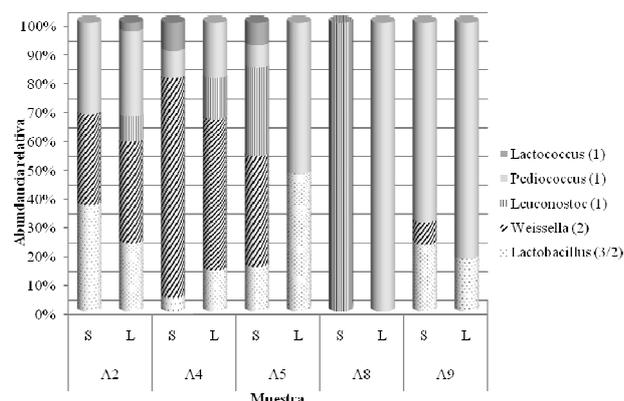


Figura 1: Abundancia de cada uno de los géneros de BAL encontrados mediante cultivo (S=sólido, L=líquido). Entre paréntesis, el número de especies encontradas en sólido y líquido o en ambas.

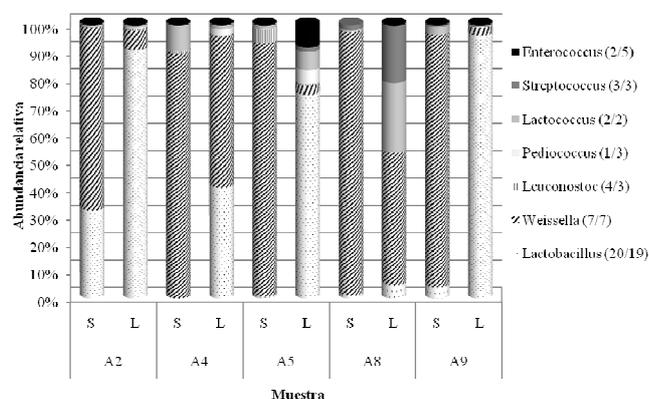


Figura 2: Abundancia de cada uno de los géneros de BAL encontrados mediante pirosecuenciación (S=sólido, L=líquido). Entre paréntesis, el número de especies encontradas en sólido y líquido.

BIBLIOGRAFÍA

- Aznar, R., Chenoll, E., 2006. Intraspecific diversity of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, and *Leuconostoc mesenteroides* associated with vacuum-packed meat product spoilage analyzed by randomly amplified polymorphic DNA PCR. *J. Food Prot.* 69, 2403-2410.
- Chenoll, E., Macian, M.C., Aznar, R., 2003. Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 546-556.
- Chenoll, E., Macián, M.C., Elizaquivel, P., Aznar, R., 2007. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* 102, 498-508.
- Sim K, Cox MJ, Wopereis H, Martin R, Knol J, et al. (2012) Improved Detection of Bifidobacteria with Optimised 16S rRNA-Gene Based Pyrosequencing. *PLoS ONE* 7(3): e32543. doi:10.1371/journal.pone.0032543

Detección mediante PCR en tiempo real de *Escherichia coli* productores de verocitotoxina (ECVT) en muestras de alimentos de la ciudad de Zaragoza

M. Asunción Lafarga, Julián Ezquerro, M. Pilar Martínez, Mercedes Navarro

Laboratorio de Microbiología. Instituto Municipal de Salud Pública. Zaragoza. malafarga@zaragoza.es

INTRODUCCIÓN

Los *E. coli* verocitotoxigénicos (ECVT), son agentes patógenos que pueden transmitirse por alimentos y causar diferentes síndromes, desde diarrea a colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico. El factor de patogenicidad más importante de estos microorganismos es la producción de potentes citotoxinas, llamadas verocitotoxinas (Vtx) o toxinas Shiga (Stx) indistintamente. Hay dos tipos, Vtx1 y Vtx2, con varios subtipos. Además los ECVT pueden albergar otros factores de virulencia como la intimina y hemolisina. Las cepas de ECVT pertenecen a un gran número de serogrupos O:H, los más importantes por la frecuencia y la gravedad de las enfermedades causadas, son el O157:H7 y el O157:H-. (EFSA, 2014). No obstante cualquier ECVT debe ser considerado como potencialmente patógeno, dependiendo además de factores relacionados con el tipo del alimento y de la susceptibilidad del huésped (ISO, 2012).

Hasta hace unos años, las técnicas de laboratorio estaban orientadas a la detección del serogrupo O157. Actualmente la utilización de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección de los genes de patogenicidad más importantes en los ECVT (ISO, 2012), y por tanto obtener datos sobre la contaminación por O157 y no O157 en los alimentos.

En el Laboratorio de Microbiología del Instituto Municipal de Salud Pública de Zaragoza, hemos investigado la presencia de *E. coli* productores de verocitotoxina mediante una técnica de PCR a tiempo real, en algunos de los grupos de alimentos más importantes como transmisores de este patógeno: productos cárnicos, quesos y vegetales frescos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Durante el año 2013 se han analizado para ECVT un total de 147 muestras de alimentos, recogidas en el comercio minorista y en obradores de charcutería. Por grupos de alimentos, 84 fueron muestras de productos cárnicos, 20 muestras de quesos frescos y 43 de frutas y hortalizas crudas listas para el consumo.

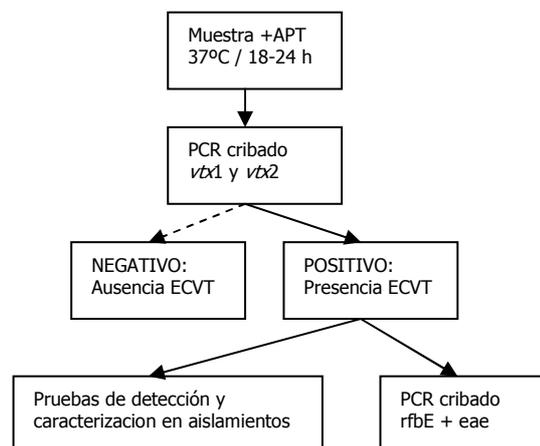


Figura 1. Cribado por PCR para *E. coli* productor de verocitotoxina (VTEC) y portador de genes de intimina (eae) y serogrupo O157(rfbE).

PCR. Hemos utilizado un método basado en la norma ISO 13136 (ISO, 2012), para los genes *vtx* y *eae*, limitando la detección de serogrupos al O157. La determinación se realiza en etapas sucesivas. En la primera, se hace un cultivo de la muestra en agua de peptona, comprobando por PCR en el extracto la presencia de los genes productores de verocitotoxinas. Ver fig. 1.

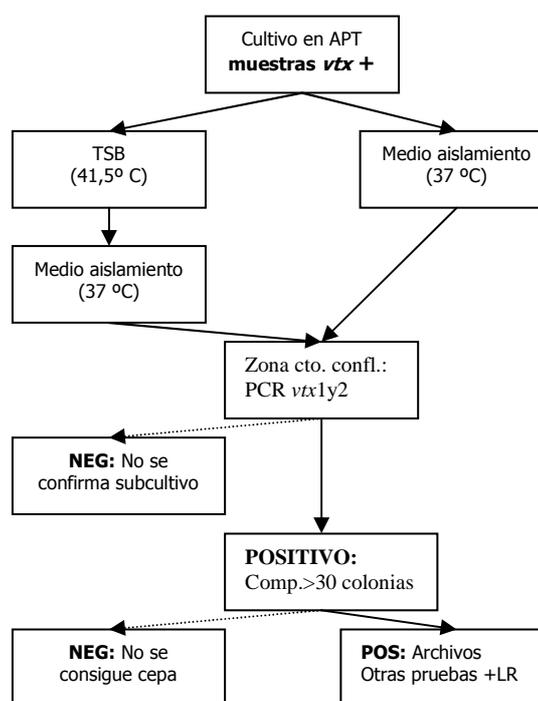


Figura 2. Pruebas de detección y caracterización de aislamientos.

En los extractos positivos, se hace una nueva PCR para los genes de la intimina (eae) y del serogrupo O157 (rfbE). Además, se subcultiva el APT en caldo tripton de soja (TSB) y en un agar cromógeno para *E. coli* y coliformes. De la zona de crecimiento confluyente, se hace nuevo extracto y detección de los *vtx1* y 2. Si se obtiene resultado positivo, se comprueban colonias aisladas (10-30), hasta obtener si es posible una cepa positiva. Fig. 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede verse en la tabla 1, 15 (19,23 %) de las muestras de productos cárnicos fueron positivas para alguno de los genes *vtx*. Todas las muestras de quesos y vegetales fueron negativas. La confirmación en el subcultivo se consiguió en el 80 % de los positivos.

Tabla 1. Resultados por grupos de muestras.

Grupo muestras	Total	Positivas	%
Productos cárnicos	78	15	19,23
Quesos frescos	26	0	0
Vegetales frescos	43	0	0
TOTAL	147	15	10,20

En la tabla 2 se desglosan los resultados por productos cárnicos. Es necesario tener en cuenta que se trata de muestras recogidas en obradores de charcutería, en los que la contaminación cruzada entre productos es posible.

Tabla 2. Resultados en las muestras de productos cárnicos.

Por especies animales	Total	Positivas	%
Porcino	26	8	30,77
Mezclas de porcino y bovino	25	6	24,00
Aves	22	1	4,55
Mezclas de porcino y ave	5	0	0,00
TOTAL	78	15	19,23

De las 15 muestras de productos cárnicos positivas para las toxinas Shiga, 11 lo fueron también para la intimina y 3 para el serogrupo O157. En la tabla 3 se desglosa el resultado por tipos de muestra y patrón de genes detectados.

Tabla 3. Patrón de genes positivos por grupo de producto.

Cerdo Sólo	cerdo +tern.	total	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	O157	eae
1	1	2	+	+	+	+
0	2	2	+	-	-	+
3	1	4	+	-	-	-
4	2	6	+	+	-	+
0	0	1	-	+	+	+

Aunque la comparación de resultados es difícil debido a la diversidad en el muestreo y en las técnicas

de detección utilizadas, en general, los resultados negativos obtenidos en las muestras de vegetales crudos y quesos frescos, coinciden con los nulos o bajos porcentajes de positivos en estos grupos de muestras, recogidos en la amplia revisión del Laboratorio de Referencia (Mora y col., 2011) en muestras de alimentos en nuestro país y también con los resultados que aparecen en los informes europeos (EFSA, 2013). Sin embargo, el porcentaje de positivos en nuestro estudio de productos cárnicos es comparativamente alto, seguramente porque la mayoría de los resultados recogidos en estas revisiones se refieren a muestras de canales en mataderos más que a productos en el sector minorista.

Aunque el número de casos de enfermedad humana por *E. coli* ECVT en nuestro país es pequeño, < 0,1 casos cada 100.000 habitantes por año (EFSA 2014; CNE 2013 y 2014), nos parece importante mantener la vigilancia, incluyendo muestras representativas de la cadena alimentaria en todas sus fases y muestras representativas de cada zona geográfica, por tratarse de un grupo de microorganismos que ha causado algunos de los brotes alimentarios más importantes (por número y gravedad de los afectados) de los últimos años (Mora y col., 2011).

BIBLIOGRAFÍA

- CNE, Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2011. Madrid, 2013. <http://publicaciones.isciii.es>.
- CNE, Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de información Microbiológica, 2012. Madrid, 2014. <http://publicaciones.isciii.es>.
- EFSA, European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 2013; 11(4):3129[250pp.].doi:10.2903 /j.efsa. 2013. 3129.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 2014; 12(2):3547, 312 pp.doi:10.2903 /j.efsa. 2014. 3547.
- ISO /TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (ECST) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
- Mora A, Herrera A, López C, Dahbi G, Mamani R, Pita JM, Alonso MP, Llovo J, Bernárdez MI, Blanco JE. 2011. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. Int Microbiol, 14(3):121-41.

Detección y cuantificación de células viables de *Brettanomyces bruxellensis* en vino por PMA-qPCR

Verónica Santos, Isabel Pardo y Sergi Ferrer

ENOLAB /ERI BioTecMed / IViSoCa Universitat de València, España

Veronica.Soaes-Santos@uv.es; Sergi.Ferrer@uv.es

La contaminación del vino por *Brettanomyces* es actualmente uno de los problemas con mayor relieve en el sector enológico ya que se considera que la presencia de esta levadura conlleva el detrimento de las características organolépticas del vino. Los métodos microbiológicos clásicos para el recuento de células viables en mosto y en vino requieren al menos de 10 días. En el presente estudio, se ha desarrollado un método rápido y fiable para detectar y cuantificar células viables de *Brettanomyces bruxellensis* por la incorporación de monoazida de propidio (PMA) a la técnica de PCR cuantitativa: PMA-qPCR. Los ensayos realizados confirman que esta metodología es muy rápida, robusta y reproducible.

INTRODUCCIÓN

Brettanomyces bruxellensis es una levadura contaminante aislada del vino y otras bebidas alcohólicas (Deak y col., 1996). En la industria vínica esta descrita como la principal levadura responsable de la formación de fenoles volátiles en el vino y además contribuye a la producción de aminas biógenas (Chatonnet y col., 1992 y Caruso y col., 2002).

Los métodos tradicionales para identificar estas levaduras se basan en técnicas de cultivo en placa, que tienen el inconveniente de ser tediosas y de conducir a resultados inconsistentes, debido principalmente a la dependencia de la condición fisiológica de los microorganismos (Divol y col., 2005). Para la detección selectiva de células vivas, se utilizan agentes intercalantes del DNA como la monoazida de propidio (PMA) para tratar la muestra previamente a la PCR cuantitativa (PMA-qPCR) (Rawsthorne y col., 2009 y Elizaquível y col., 2012). Por esta razón nos hemos propuesto utilizar la técnica de PMA-qPCR para detectar y enumerar células vivas y totales de *B. bruxellensis* en muestras de vino, con la intención de poder realizar un rápido y eficiente control de posibles alteraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas utilizadas y preparación de las suspensiones celulares. La cepa de *B. bruxellensis* DSMZ 70726 Se cultivó hasta obtener una concentración final de 1×10^8 células/mL en vino blanco y tinto previamente filtrados.

Tratamiento con PMA. Se utilizó una solución de PMA (Biotium) 20 Mm en dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac). El PMA se añadió a las diferentes suspensiones celulares a una concentración de $6 \mu\text{M}$. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 10 min y a continuación se fotoactivaron con PhAST Blue (GenIUL) durante 15 min.

Extracción de DNA. La extracción de DNA de las suspensiones celulares se realizó con el kit de extracción Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO).

PCR Cuantitativa. Se utilizaron los cebadores DBRUXF y DBRUXR descritos por Phister y Miles (2003). La mezcla de reacción (20 μL) contenía 0,2 μM de cada cebador, 1X Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) y 2 μL del DNA extraído. Para la amplificación se usó un termociclador C100™ Thermal Cycler, CFX96™ RealTime System (BioRad) con las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 15 min, 39 ciclos de amplificación de 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 1 min, terminando con 60 °C durante 5 s y 95 °C durante 5 s. Las amplificaciones se realizaron por triplicado. Los valores de *cycle threshold* (Ct) se calcularon mediante el *software* BioRadCFX Manager (versión 2.1; BioRad).

Construcción de rectas patrón. A partir de los cultivos en vinos blanco y tinto filtrados, se realizaron diluciones seriadas para conseguir concentraciones de células vivas desde 1×10^2 hasta 1×10^8 células/mL. Algunas suspensiones realizadas del mismo modo se trataron a 100 °C durante 30 min para la obtención de células muertas. Todas las suspensiones se amplificaron mediante PMA-qPCR y se construyeron rectas patrón.

Aplicación de qPCR y PMA-qPCR en vinos reales. Se inoculó la cepa de *B. bruxellensis* DSMZ 70726 en vinos reales tintos con 13 y 15 % de etanol (v/v) esterilizados por filtración, y se incubaron a 20 °C a lo largo de 20 días. Se evaluó la cinética de crecimiento de la levadura mediante el recuento de totales y viables, usando las técnicas de qPCR y PMA-qPCR respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comprobación de la validez del método.

Se evaluó la validez de la técnica de PMA-qPCR para identificar y cuantificar tanto células vivas como muertas de *B. bruxellensis* en muestras de vino blanco y tinto. Para ello, se construyeron rectas patrón aplicando esta técnica a suspensiones celulares de

diferentes concentraciones de células, tanto vivas como muertas, y obteniendo el respectivo valor de Ct para las mismas (Figura 1).

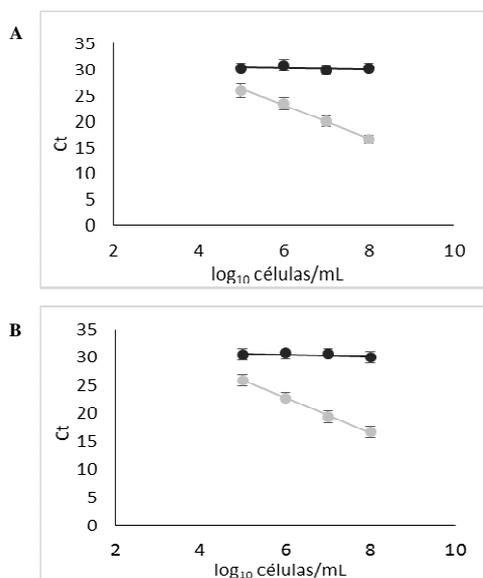


Figura 1 Rectas patrón generadas para evaluar la validez de la cuantificación de células vivas (puntos grises) y muertas (puntos negro) de *B. bruxellensis*, mediante PMA-qPCR, en vino blanco (A) y tinto (B). Los valores de Ct corresponden a la media de las 3 réplicas realizadas.

Para todas las suspensiones de células muertas, se obtuvo un Ct muy próximo a 30 (similar al obtenido para el control negativo), lo que indicó ausencia de amplificación en las mismas. Sin embargo, los valores de Ct para las diferentes suspensiones de células vivas oscilaron entre 15 y 27, obteniéndose una linealidad adecuada ($R^2=0,99$) en la cuantificación de concentraciones celulares entre 1×10^5 y 1×10^8 células/mL, tanto para vino blanco como tinto.

Por tanto, las rectas patrón obtenidas para ambos tipos de vino confirman la posibilidad de discriminar entre células vivas y muertas mediante PMA-qPCR, y además demostraron que permiten una buena cuantificación entre 1×10^5 y 1×10^8 células/mL directamente en vino.

Cinética de crecimiento de *B. bruxellensis* en vinos reales.

Las cinéticas de crecimiento obtenidas mediante qPCR y PMA-qPCR (Figura 2) revelaron que la concentración de células totales era superior a la de células viables en todos los casos. El crecimiento de *B. bruxellensis* resultó mayor en el vino con 13% de etanol que en el vino con 15%. En el vino con 13% la levadura comenzó a crecer a partir del tercer día mientras que en el vino con 15% no lo hizo hasta el noveno día. Además, en el vino con 13 °C la levadura logró alcanzar una población final diez veces mayor

que en el vino con 15% para el tiempo de incubación establecido.

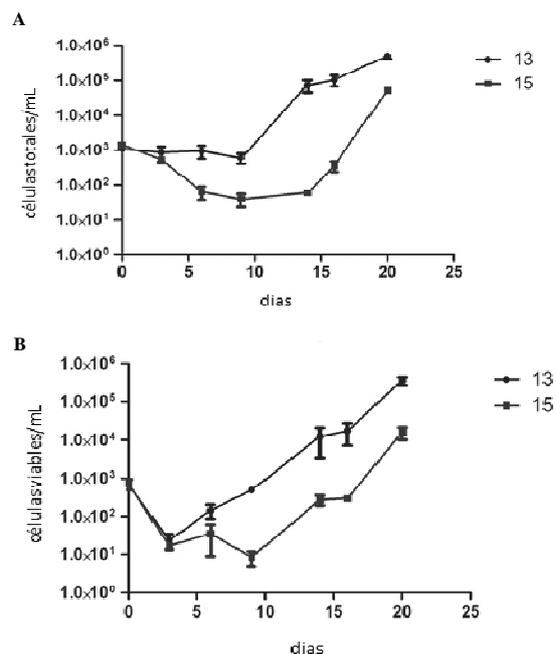


Figura 2 Cinética de crecimiento de *B. bruxellensis* en vino tinto con 13% y 15% de etanol (v/v), observada mediante qPCR (células totales) (A) y PMA-qPCR (células viables) (B).

Los resultados obtenidos confirman la efectividad de la técnica de PMA-qPCR para cuantificar al mismo tiempo células vivas y muertas de *B. bruxellensis* en vinos, resultando una excelente alternativa a los métodos clásicos (recuento en placa) por su rapidez y eficacia, permitiendo diferenciar las células realmente peligrosas (vivas) de las totales.

BIBLIOGRAFÍA

- Caruso, M. Fiore, C. Contursi, M. Salzano, G. Paparella, A. Romano, P. 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18:159-163.
- Chatonnet, P. Dubourdieu, D. Boidron, J. N. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46:463-468.
- Deak, T. Beuchat, L. 1996. Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, New York, N.Y.
- Divol, B. Lonvad-Funel, A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in *Botrytis*-affected wine. *J. Appl. Microbiol.*, 99:85-93.
- Elizaquível, P. Sánchez, G. Aznar, R. 2012. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables after inactivation by essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 159:115-906.
- Phister, T. G., Mills D. A. 2003. Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 7430-7434.
- Rawsthorne, H. Dock, C.N. Jaykus, L.A. 2009. PCR-Based method using Propidium Monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:293.

Identificación de levaduras aisladas de lacón crudo-curado mediante PCR-RFLP y secuenciación de la región ITS-5.8S.

M. Camino García-Fontán, Encarna Garrido-Bailón, Beatriz Fernández, Gloria García y Aida Cachaldora

Fundación Centro Tecnológico de la Carne. Avda. Galicia nº 4 - Parque Tecnológico de Galicia 32900. Ourense.
caminogarcia@ceteca.net

El objetivo de este trabajo fue identificar, mediante PCR-RFLP, levaduras aisladas de lacón crudo-curado con la finalidad de establecer esta técnica como un método rutinario de identificación para esta población microbiana. Para ello, se partió de un total de 151 aislados de levaduras procedentes de lacón crudo-curado que fueron identificados inicialmente mediante secuenciación de la región ITS-5.8S. Mediante esta técnica se consiguieron identificar seis especies pertenecientes a cinco géneros: *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Rhodospodium*. Conociendo las especies de partida, el siguiente paso fue su identificación mediante el análisis de restricción del gen rRNA 5.8S y los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). Después de la digestión con las enzimas de restricción, se obtuvieron nueve patrones de bandas diferentes; el primero se correspondió con las especies *D. hansenii* y *C. zeylanoides*, y el segundo con las especies *R. mucilaginosa* y *R. glutinis*; en ambos casos, y debido a las pequeñas diferencias existentes entre ellas en el número de pares de bases, podemos afirmar que esta técnica no fue capaz de discriminar entre estas especies por separado. El tercer patrón obtenido perteneció a *Cryptococcus curvatus*, a pesar de no coincidir el tamaño de los fragmentos de restricción con los propuestos por Esteve-Zarzoso (1999). Todos los aislados de levaduras, identificados por secuenciación como *C. deformans*, presentaron el mismo perfil de bandas. El quinto patrón de bandas se correspondió con el aislado identificado previamente como *Rhodospodium babjevae*. Finalmente, los cuatro patrones restantes se adscribieron a *Candida spp.*

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son uno de los grupos microbianos más abundantes en la superficie de productos cárnicos crudo-curados, como el lacón y el jamón, en las etapas más avanzadas de su proceso de elaboración (Fernández, 2011). Las especies de levaduras predominantes en el "lacón" pertenecen al género *Candida*, siendo *C. famata* la especie más frecuentemente aislada (Lorenzo y col., 2005).

De forma convencional, la identificación de levaduras se ha basado en criterios morfológicos y/o fisiológicos que se caracterizan por ser procedimientos largos y tediosos que implican la realización de multitud de ensayos para alcanzar resultados más o menos aceptables. Los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas técnicas más rápidas y fiables, como una alternativa a las pruebas tradicionales para la identificación de levaduras. Las técnicas más empleadas suelen basarse en el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción de las regiones ribosomales (RFLP, principalmente las regiones ITS-5.8S) y en la secuenciación de regiones ribosómicas, siendo las más comúnmente secuenciadas y comparadas los ITS (1 y 2), el IGS 18S, 5.8S y 26S del rDNA.

El objetivo de este trabajo fue identificar, mediante PCR-RFLP, levaduras aisladas de lacón crudo-curado

con la finalidad de establecer esta técnica como un método rutinario de identificación para esta población microbiana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se partió de un total de 151 aislados de levaduras procedentes de lacón crudo curado en diferentes etapas de secado-maduración (7, 14, 28, 56 y 84 días).

La extracción de ADN fue llevado a cabo empleando la metodología descrita por Fernández (2011). La región que incluye el gen 5.8S y las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 se amplificó por PCR en un termociclador (Mycycler, Biorad) empleando los cebadores universales específicos ITS1 y ITS4, directo y reverso. Las condiciones de la reacción de PCR aparecen especificadas en Fernández (2011).

Para la secuenciación, los productos de PCR amplificados fueron purificados con el kit Ultra Clean PCR Clean-Up. Posteriormente, se secuenciaron con el secuenciador capilar ABI 3730xl en la Unidad de Secuenciación de Análisis de Fragmentos de la Universidad de Santiago de Compostela. La comparación de secuencias se realizó con BLAST del GenBank, después de editar y recortar las secuencias con el editor de alineación de secuencias BioEdit, versión 7.0.0.

Para el análisis de restricción, alícuotas (10 µL) de los productos de la PCR se digirieron con 1 U de enzimas de restricción (*HhaI*, *HaeIII* y *HinfI*). Tanto los productos de amplificación como los fragmentos de restricción se analizaron por electroforesis horizontal y los tamaños de los fragmentos se valoraron por comparación con un marcador

de ADN (DNA ladder 100-1000 pb). Después de la electroforesis, los geles se fotografiaron en un transiluminador de luz UV (GelDoc Imagen, Biorad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de los 151 aislados de levaduras procedentes de lacón crudo curado por secuenciación de la región 5.8S-ITS, permitió clasificar 117 aislados como *D. hansenii*, 12 como *C. zeylanoides*, 8 como *C. deformans*, 4 como *Candida* spp., 6 como *Cryptococcus curvatus*, 2 como *Rhodotorula mucilaginosa*, 1 como *Rhodothorula glutinis* y 1 como *Rhodospiridium babjevae*.

Con este método, el 97% de los aislados fueron identificados a nivel de especie con un porcentaje de semejanza del 99-100%. El 3% restante, solamente pudo ser identificado a nivel de género (*Candida*), debido a la ausencia de secuencias 100% similares en la base de datos GENBANK.

Después de la digestión con las enzimas de restricción, los aislados de levaduras se agruparon en **9 patrones de bandas diferentes**. Los perfiles obtenidos para cada aislado fueron comparados con los diferentes perfiles descritos por otros autores (Villa-Carvajal y col., 2006; Guamán Burneo y Carvajal-Barriga, 2009). De los 9 patrones de bandas, cabe destacar que el análisis RFLP no fue capaz de discriminar entre las especies *D. hansenii* y *C. Zeylanoides*, debido a que son especies muy relacionadas filogenéticamente. Los patrones de bandas de levaduras con menos de 15 pb deberían de ser revelados con otros instrumentos de medida como la electroforesis capilar y no con electroforesis en gel de agarosa, tal y como muestra la **figura 1**. Un caso similar ocurrió con *R. mucilaginosa* and *R. glutinis* (datos no mostrados). Todos los aislados de levaduras identificados como *C. deformans*, mostraron el mismo perfil de bandas (**figura 2**). Ninguno de los trabajos consultados describe un patrón para esta especie por lo que consideramos que el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos en este estudio podrían ser usados para identificar esta levadura (**Tabla 1**).

Tabla 1: Tamaño, en pb, de los productos de PCR y fragmentos de restricción obtenidos con tres enzimas de restricción para *C. deformans*.

Especie de levadura	Fragmentos de Restricción (pb)			
	PCR	<i>HhaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
<i>Candida deformans</i>	380	216-164	380	171-109-93

A la vista de estos resultados, y a pesar de que la técnica PCR-RFLP no tuvo la suficiente sensibilidad para discriminar entre algunas especies de levaduras, podríamos señalar que se trata de una técnica de identificación rápida y económica que podría ser utilizada como análisis de rutina fiable para la identificación de levaduras, siempre y cuando los patrones de bandas obtenidos coincidan con los existentes en las bases de datos/bibliografía.

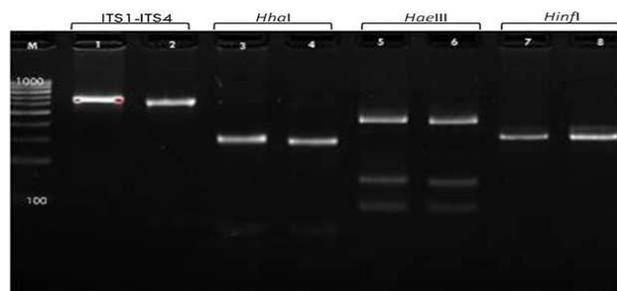


Figura 1. Tamaño en pb de los productos de PCR y fragmentos de restricción con las endonucleasas, de *D. hansenii* (líneas 1, 3, 5, 7) y *C. zeylanoides* (líneas 2, 4, 6, 8).

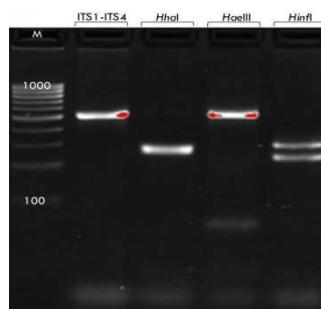


Figura 2. Tamaño en pb de los productos de PCR y fragmentos de restricción con las endonucleasas, de *C. deformans*.

BIBLIOGRAFÍA

- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Systemic Bacteriol.*, 49, 329-337.
- Fernández Gómez, Beatriz. 2011. Estudio mediante técnicas de biología molecular de la población de levaduras presentes en el Lacón crudo-curado durante la fase de secado-maduración. Proyecto Fin de Máster en Biotecnología. Universidad de Granada.
- Guamán-Burneo, C., Carvajal-Barriga, J. 2009. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum*, 14, 187-197.
- Lorenzo, J. M., García-Fontán, M. C., Franco, I., Carballo, J. 2005. Study of the yeast population during the manufacture of dry-cured "lacón". *Alimentaria*, 46-54.
- Villa-Carvajal, M., Querol, A., Belloch, C. 2006. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 171-181.

Desarrollo de un método de extracción de ARN fúngico en alimentos para detectar mohos viables mediante PCR.

Victoria Bernáldez, Alicia Rodríguez, Mar Rodríguez, María J. Andrade, Alberto Alía y Juan J. Córdoba

Higiene y Seguridad Alimentaria, Universidad de Extremadura, España, mvbernaldez@unex.es

En la superficie de los alimentos madurados y de aquellos que se someten a procesos de secado, puede desarrollarse una abundante población de mohos pertenecientes al género *Aspergillus*. Algunas de estas cepas pueden producir aflatoxinas, un metabolito secundario extremadamente tóxico. Es necesario disponer de métodos rápidos que permitan la detección temprana de mohos toxigénicos viables en dichos alimentos. Para este fin se puede utilizar la reacción en cadena de la polimerasa, pero previamente es necesario disponer de un método eficiente de extracción de ARN fúngico a partir de alimentos. El objetivo de este trabajo es desarrollar un método de extracción de ARN fúngico a partir de alimentos contaminados por mohos. Para el desarrollo de este trabajo se evaluaron seis combinaciones de ruptura de micelio fúngico (mortero u homogeneizador mecánico), tampones de extracción (TRI Reagent o tampones comerciales) y kits comerciales de extracción de ARN (E.Z.N.A.[®]Fungal RNA Mini Kit o RNeasy Mini Kit). Los mejores resultados en la extracción de ARN se consiguieron con el método que combina la utilización del mortero con nitrógeno líquido y el empleo del kit comercial RNeasy Mini Kit. Con este método se consiguieron también los mejores rendimientos en la detección mediante PCR. Este protocolo puede ser de gran utilidad en la monitorización o verificación de mohos toxigénicos viables en alimentos mediante PCR convencional o PCR en tiempo real.

INTRODUCCIÓN

En la superficie de los alimentos madurados (especialmente los productos cárnicos crudos-curados) y de aquellos que se someten a procesos de secado (especias, frutos secos, cereales y derivados) puede desarrollarse una abundante población de mohos pertenecientes al género *Aspergillus*. Dentro de este género, las especies *A. parasiticus* y *A. flavus* han demostrado su capacidad para producir aflatoxinas en un gran número de matrices alimentarias e incluso en la superficie de alimentos madurados, como ha sido previamente demostrado (Rodríguez y col., 2012). Estas micotoxinas son metabolitos secundarios altamente carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos, capaces de causar serios problemas en la salud de los consumidores.

Es necesario disponer de métodos rápidos que permitan la detección temprana de mohos toxigénicos viables en dichos alimentos. Para este fin se puede utilizar la reacción en cadena de la polimerasa que detecte ADNc obtenido tras la reacción de transcripción inversa (RT) del ARNm. Esto requiere disponer previamente de un método eficiente de extracción de ARN fúngico a partir de los alimentos, que pueda ser utilizado para la detección sensible mediante RT-qPCR. La mayoría de los métodos desarrollados para la extracción de ARN fúngico consiguen buenos rendimientos para determinadas especies de mohos y/o alimentos específicos (Ling y col., 2013). Sin embargo, no se ha desarrollado un

método eficaz para la extracción de ARN de mohos en cualquier matriz alimentaria.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de extracción de ARN de mohos válido a partir de distintas matrices alimentarias para la posterior detección sensible de mohos viables productores de aflatoxinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el objetivo de optimizar un método de extracción de ARN, se inocularon esporas (10^7 esporas/mL) de un moho productor de aflatoxinas (*A. parasiticus* CECT 2688) en cinco matrices alimentarias (jamón, té, cacahuete, trigo y pimentón). Posteriormente las muestras fueron incubadas en condiciones óptimas de crecimiento (humedad relativa 94% y 25 °C durante 7 días). Transcurrido este tiempo, se recogió el micelio en condiciones de esterilidad y se conservó a -80°C hasta su extracción.

1. Extracción de ARN. Se evaluaron un total de seis combinaciones de métodos físicos de ruptura del micelio (mortero u homogeneizador mecánico); químicos, con la utilización tampones de extracción (TRI Reagent o tampones comerciales); y kits comerciales de extracción de ARN (E.Z.N.A.[®]Fungal RNA Mini Kit o RNeasy Mini Kit) (Tabla 1). La concentración y calidad del ARN obtenido se determinó midiendo los ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ en un equipo Nanodrop. La integridad del ARN fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa.

2. Obtención de cDNA y PCR β -tubulina. El ARNm fue transcrito a cDNA mediante el kit comercial PrimeScript (Takara). La eficacia en la obtención de cDNA adecuado para PCR fue evaluada mediante PCR convencional basadas en el gen β -tubulina, empleando los cebadores

Bt2a y Bt2b diseñados en diferentes zonas exónicas, y el protocolo de PCR descrito por Glass y Donaldson (1995).

Tabla 1: Combinación de métodos de extracción de ARN evaluados

Método	Tipo de ruptura micelio	Tipo de purificación
1. TRI-Reagent	1a Mortero 1b Homogenizador mecánico Tampón TRI-Reagent	1a Lavados con isopropanol-etanol 1b Lavados con isopropanol-etanol
2. RNeasy Mini-Kit	2a Mortero 2b Homogenizador mecánico Tampón RLT	2a Reactivos RNeasy Mini Kit 2b Reactivos RNeasy Mini Kit
3. Fungal RNA Mini Kit	3a Morteo 3b Homogenizador mecánico Tampón RB	3a Reactivos Fungal ARN Mini-Kit 3b Reactivos Fungal ARN Mini-Kit

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las matrices alimentarias ensayadas, la mayor concentración de ARN se obtuvo con el método que combina la utilización del mortero con nitrógeno líquido y el empleo del kit comercial RNeasy Mini Kit (Figura 1).

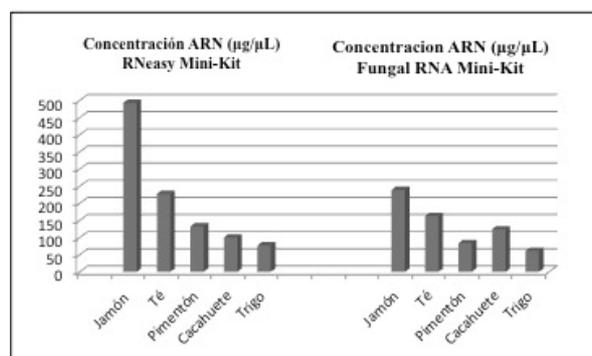


Figura 1: Comparativa entre las concentraciones de ARN total obtenidas mediante el kit RNeasy Mini Kit y el kit Fungal RNA en los alimentos ensayados.

El análisis de la calidad del ARN extraído mostró igualmente que con este método se obtuvo ARN de calidad superior a la encontrada con el resto de los métodos ensayados (Figura 2). Las variaciones en la cantidad de ARN extraído entre las distintas matrices alimentarias se debe probablemente a su diferente composición. Así, en el caso del trigo, los altos niveles de almidón determinan la disminución del rendimiento en la extracción (Wang y col., 2011). No obstante, en todas las matrices alimentarias ensayadas, la utilización del método que combina el mortero con nitrógeno líquido y el empleo del kit comercial RNeasy Mini Kit, permite obtener suficiente cantidad de ARN para ser detectada mediante PCR, como fue demostrado en su posterior reacción de RT a cDNA y PCR basado en el gen β -tubulina. Con esta RT-PCR

hubo amplificación del fragmento ADN genómico (486pb) así como del ADN complementario (273 pb) a partir del ARN obtenido de todas las matrices alimentarias con el método que combina la utilización del mortero con nitrógeno líquido y el empleo del kit comercial RNeasy Mini Kit (Figura 3). En conclusión, nuestro protocolo puede ser de gran utilidad en la detección de mohos toxigénicos viables en alimentos mediante PCR convencional o PCR en tiempo real.

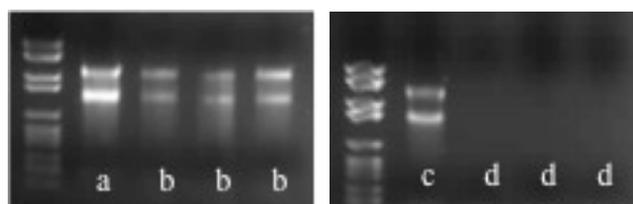


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de ARN fúngico extraído a partir de té inoculado mediante el método que combina el mortero y el empleo del kit RNeasy Mini-Kit: (a) ARN extraído a partir de la cepa *A. parasiticus* CECT 2688 como control positivo; (b) ARN extraído a partir de las muestras de té y mediante protocolo que combina el mortero y la utilización del tampón TRI-Reagent; (c) ARN extraído a partir de la cepa *A. parasiticus* CECT 2688 como control positivo; (d) ARN extraído a partir de muestras de té.

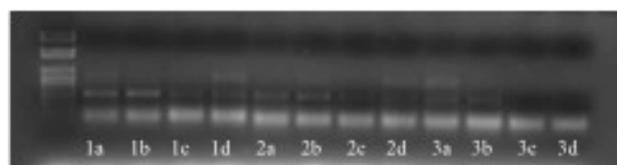


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de la PCR para el gen de la β -tubulina obtenidos a partir del ADNc transcrito a partir de ARN fúngico de distintos alimentos: (1) pimentón; (2) cacahuete; (3) jamón. Los métodos utilizados en la extracción de ARN que combinaron diferentes métodos de ruptura y purificación fueron: (a) mortero + Fungal RNA Mini Kit; (b) mortero + RNeasy Mini Kit; (c) Homogenizador mecánico + Fungal RNA Mini-Kit; (d) Homogenizador mecánico + RNeasy Mini Kit.

BIBLIOGRAFÍA

- Glass, N., Donaldson, G. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *ascomycetes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1323-1330.
- Ling, Z., Zhike, Z., Shunquan, L., Tingting, Z., Xianghui, Y. 2013. Evaluation of six methods for extraction of total RNA from loquat. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*. 41:313-316.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, I., Martín, A., Córdoba, J.J. 2012. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiol.*, 31:89-99.
- Wang, G., Wang, G., Zhang, X., Wang, F., Song, R. 2013. Isolation of high quality RNA from cereal seeds containing high levels of starch. *Phytochemical Analysis*. 23:159-163.

Desarrollo de la aplicación informática BioRCA 1.4 para el estudio de la estructura de los *biofilms* bacterianos

Rosa Capita^{1,2}, Félix Riesco-Peláez³, Laura Buzón-Durán² y Carlos Alonso-Calleja^{1,2}

¹ Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España, rosa.capita@unileon.es

² Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, España

³ Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Sistemas y Automática, Universidad de León, España

La presencia de *biofilms* es un fenómeno indeseable en el contexto de la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria. En la mayoría de las investigaciones la caracterización cuantitativa de las imágenes tridimensionales de los *biofilms* se realiza considerando de forma conjunta todas las células presentes. Se ha desarrollado una aplicación informática (BioRCA 1.4) que permite estimar, por separado para las células vivas no dañadas, dañadas subletalmente e inactivadas, los parámetros estructurales de los *biofilms* bacterianos. Se caracterizaron los *biofilms* producidos por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en ausencia de biocidas y en presencia de concentraciones subinhibitorias de cloruro de benzalconio (CB), fosfato trisódico (FTS) e hipoclorito sódico (HIP). Los *biofilms* formados en presencia de FTS presentaron los menores valores de biovolumen ($18.783,70 \pm 18.967,86 \mu^3$ vs $179.721,03 \pm 111.806,57 \mu^3$; $P < 0,01$) y porcentaje de superficie cubierta ($47,09 \pm 25,75\%$ vs $94,64 \pm 11,89\%$; $P < 0,001$). Los porcentajes de células inactivadas fueron más elevados ($P < 0,01$) en los *biofilms* formados en presencia de HIP ($28,16 \pm 8,38\%$) y de FTS ($15,95 \pm 3,47\%$) que en los producidos en ausencia de biocidas o en presencia de CB (media de $8,29 \pm 5,97\%$). La utilidad de la aplicación desarrollada radica en la posibilidad de analizar por separado las células vivas no dañadas, dañadas subletalmente e inactivadas, hecho de gran interés teniendo en cuenta que las implicaciones negativas de los *biofilms* varían en función del grado de viabilidad de las células que los constituyen.

INTRODUCCIÓN

La presencia de películas microbianas (*biofilms*) en las plantas de procesado de alimentos es un fenómeno indeseable en el contexto de la Seguridad Alimentaria, al incrementar el riesgo de contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos. Además, la capacidad para formar películas está considerada como un importante factor de virulencia en los microorganismos responsables de infecciones humanas, habiéndose observado que el 80% de todas las infecciones bacterianas están asociadas a *biofilms* (Steenackers y col., 2012).

En investigaciones previas se ha puesto de manifiesto que la exposición de las células bacterianas a dosis subinhibitorias de biocidas (situación frecuente en la Industria Alimentaria) puede modificar la capacidad de las bacterias para formar *biofilms* (Capita y col., 2014). En la mayoría de los estudios la caracterización cuantitativa de las imágenes tridimensionales de los *biofilms* se realiza considerando conjuntamente todas las células presentes y habitualmente no se analizan por separado las células vivas no dañadas, dañadas subletalmente e inactivadas, hecho que sería de gran interés dadas las diferentes implicaciones que estos grupos de células tienen en el ámbito de la Salud Pública.

Si bien las cepas de MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) se asocian principalmente con infecciones nosocomiales, también pueden causar

problemas fuera del ámbito hospitalario por el consumo o manipulación de alimentos contaminados, habiéndose descrito infecciones por esta causa incluso en adultos sanos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Los objetivos de este trabajo han sido: 1) desarrollar un programa informático específico para el estudio de los *biofilms* bacterianos que permita la estimación de los parámetros estructurales en base al grado de viabilidad de las células que los forman y 2) estudiar la influencia de la exposición a dosis subinhibitorias de diferentes biocidas de uso alimentario en la estructura de los *biofilms* formados por MRSA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó la metodología descrita con anterioridad (Capita y col., 2014). Los *biofilms* de la cepa MRSA48 (de origen cárnico) se formaron en ausencia y presencia de los biocidas (MIC/2) cloruro de benzalconio (CB), fosfato trisódico (FTS) e hipoclorito sódico (HIP). Para la tinción de las células se usaron los colorantes Syto9 y yoduro de propidio (LIVE/DEAD® BacLight™; Invitrogen).

La adquisición de las imágenes (6 repeticiones) se realizó con ayuda de un microscopio láser confocal de barrido Nikon Eclipse TE 2000-U (Nikon Instruments Inc.). Para el procesado de las imágenes se utilizó el programa informático BioRCA 1.4, desarrollado por nuestro grupo de investigación utilizando el entorno IDE (*Integrated Development Environment*) Lazarus. Los parámetros estimados fueron biovolumen (μm^3 ; volumen ocupado por las células en el campo observado $-14.161 \mu\text{m}^2$),

porcentaje de superficie cubierta, coeficiente de rugosidad (estimación de la variación en el grosor del *biofilm*), y altura máxima del *biofilm* (μm ; determinada directamente en función del número de secciones ópticas de $1\ \mu\text{m}$ en el eje z).

Los parámetros estructurales de los *biofilms* se estimaron por separado para las células vivas no dañadas, dañadas subletalmente e inactivadas. La agrupación de las células según su grado de viabilidad se realizó fijando umbrales para la fluorescencia roja y verde en base a las correlaciones observadas previamente entre los biovolúmenes y los recuentos obtenidos por siembra en placa. El análisis estadístico de los datos (ANOVA, prueba de rango múltiple de Duncan) se realizó con ayuda del programa informático Statistica 8.0 (Statsoft Ltd.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran las imágenes tridimensionales representativas de los *biofilms* producidos en cada una de las condiciones estudiadas.

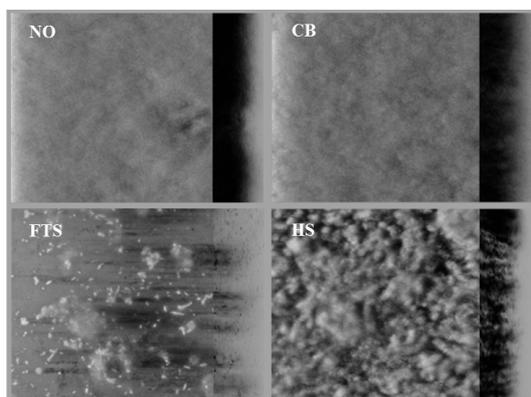


Figura 1: Imágenes tridimensionales de los biofilms producidos por la cepa MRSA48 en ausencia de biocidas (NO) o en presencia de cloruro de benzalconio (CB), fosfato trisódico (FTS) o hipoclorito sódico (HS).

En la Figura 2 y la Tabla 1 se muestran los principales parámetros estructurales cuantitativos de los *biofilms*. La exposición a FTS redujo la capacidad de las células para formar *biofilm*. Así, los *biofilms* formados en presencia de FTS presentaron los menores valores de biovolumen ($18.783,70 \pm 18.967,86\ \mu^3$ vs $179.721,03 \pm 111.806,57\ \mu^3$; $P < 0,01$) y porcentaje de superficie cubierta ($47,09 \pm 25,75\%$ vs $94,64 \pm 11,89\%$; $P < 0,001$). Los porcentajes de células inactivadas fueron mayores ($P < 0,01$) en los *biofilms* producidos en presencia de HIP ($28,16 \pm 8,38\%$) y de FTS ($15,95 \pm 3,47\%$) que en los formados en ausencia de biocidas o en presencia de CB ($8,29 \pm 5,97\%$).

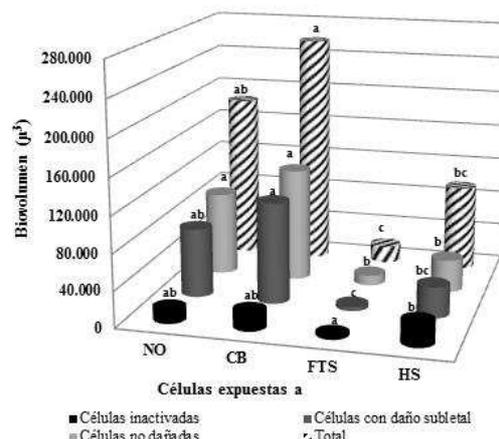


Figura 2: Biovolumen (μm^3) correspondiente a los distintos grupos de células en *biofilms* formados en ausencia de biocidas (NO) o en presencia de concentraciones subinhibitorias de cloruro de benzalconio (CB), fosfato trisódico (FTS) o hipoclorito sódico (HS). Las columnas que, dentro de un mismo tipo de células, comparten alguna letra no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Tabla 1: Parámetros estructurales de los *biofilms* formados por la cepa MRSA48 obtenidos con el programa BioRCA 1.4.

	FORMACIÓN DEL BIOFILMS EN PRESENCIA DE			
	NO	CB	FTS	HS
A	99,71±0,45a	99,60±0,62a	47,09±25,75b	86,62±17,30a
B	98,54±2,84a	99,20±1,23a	38,54±23,47b	73,97±21,92c
C	88,94±12,59a	87,80±18,50a	18,21±17,85b	58,30±24,03c
D	63,72±11,37a	44,67±45,44ab	16,71±16,97b	67,99±21,47a
E	33,67±2,80ab	43,33±6,98a	29,83±11,70b	33,67±9,87ab
F	19,33±2,58a	25,83±2,48b	16,83±5,98a	17,33±1,97a
G	25,50±2,95ab	31,17±4,40a	20,00±8,90b	26,00±9,70ab
H	8,50±1,52a	8,67±4,84a	10,33±4,13a	18,33±4,08b
I	0,281±0,093a	0,265±0,171a	0,594±0,166b	0,537±0,152b
J	0,318±0,074a	0,296±0,116a	0,518±0,152b	0,496±0,060b
K	0,428±0,065ab	0,414±0,193a	0,468±0,185ab	0,611±0,118b
L	0,415±0,022ab	0,234±0,185c	0,307±0,151ac	0,505±0,043b

Biofilms producidos por la cepa MRSA48 en ausencia de biocidas (NO) o en presencia de cloruro de benzalconio (CB), fosfato trisódico (FTS) o hipoclorito sódico (HS). Porcentaje de superficie cubierta por el *biofilm* (A); porcentaje de superficie cubierta por las células vivas no dañadas (B), con daño subletal (C) e inactivadas (D); altura máxima del *biofilm* (E); altura máxima correspondiente a las células vivas no dañadas (F), con daño subletal (G) e inactivadas (H); rugosidad del *biofilm* (I); rugosidad correspondiente a las células vivas no dañadas (J), con daño subletal (K) e inactivadas (L). Los valores que, dentro de una misma fila, comparten alguna letra no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

BIBLIOGRAFÍA

- Capita, R., Alonso-Calleja, C. 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53:11-48
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilms, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:1268-1280.
- Steenackers, H, Hermans, K, Vanderleyden, J, De Keersmaecker, SCJ. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45:502-531.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido subvencionado por la Junta de Castilla y León (103/LE11/11) y el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-29645).

SESIÓN II: La seguridad alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde distintas perspectivas I.

La Seguridad Alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde la perspectiva de los Sistemas Sanitarios de Salud

Rosa del Campo

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS). rosacampo@yahoo.com

La OMS define a las toxiinfecciones alimentarias como aquellas enfermedades que pueden ser atribuidas al consumo de un alimento específico, o a una sustancia que se le ha incorporado, a su contaminación a través de recipientes o en proceso de preparación y distribución. Un brote se define como un incidente en el cual 2 o más personas presentan una misma enfermedad después de la ingestión del mismo alimento o después de la ingestión de agua de la misma fuente y donde la evidencia epidemiológica implica al alimento o el agua como fuente de la enfermedad. Los principales patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias son por orden de relevancia clínica y frecuencia: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, Norovirus, *Escherichia coli* O57:H7, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica* y *Shigella* spp. Con respecto al tipo de alimento que suele causar estas infecciones destacan las carnes de pollo, cerdo y ternera, los alimentos procesados, los huevos y los lácteos.

Se estima que en todo el mundo las toxiinfecciones alimentarias afectan a 60-80 millones de personas cada año y en el año 2005 causaron 1,8 millones de muertes. En la Unión Europea en 2012 se recogieron datos de 5.363 brotes alimentarios, con un total de 55.453 pacientes implicados, 5.118 hospitalizaciones y 41 defunciones. Los principales agentes causales implicados en los brotes alimentarios de los que se conoce el origen siguen siendo *Salmonella*, seguido por toxinas bacterianas, virus y *Campylobacter*. Los alimentos implicados en este tipo de brotes fueron en primer lugar los huevos y ovoproductos, seguidos por las mezclas de varios alimentos, pescado y productos de la pesca. También se produjeron 16 brotes relacionados con el agua, producidos por calicivirus, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Cryptosporidium parvum* y rotavirus.

La Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA) y el Centro Europeo de la Prevención de Enfermedad y el Control (ECDC) han emitido en 2014 un informe con los registros de los 27 países de la Unión Europea sobre las toxiinfecciones alimentarias y zoonosis del año 2012. La campylobacteriosis fue la zoonosis más frecuente con 214.268 casos confirmados, principalmente por contaminación de carne de pollo. Se ha detectado un

descenso de los casos de salmonelosis, 91.034 casos confirmados en 2012; mientras que el número de listeriosis aumentó a 1.642. El número de toxiinfecciones por *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) alcanzó los 5.671 casos. En lo que respecta a nuestro país, se notificaron 447 brotes en el sistema de declaración de brotes de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, de los que 225 fueron producidos por *Salmonella*.

Más de la mitad de las toxiinfecciones alimentarias pasan desapercibidas por ausencia de síntomas, o son cuadros muy benignos que se resuelven solos en pocos días. En muchas de las ocasiones está en relación con la dosis infectiva mínima (concentración de microorganismo que debe alcanzarse para causar la toxiinfección) y con la respuesta inmunitaria del paciente. Cada patógeno está a su vez relacionado con un cuadro clínico diferente; mientras que Norovirus causa cinco veces más morbilidad que *Salmonella*, esta sin embargo es responsable de muchas más hospitalizaciones debido a la gravedad de los síntomas que provoca. Así mismo, el agente causal que mayor tasa de letalidad tiene es *Salmonella*. La infección por *Listeria* puede provocar poca morbilidad pero en cambio es el tercer agente causante de muerte y el séptimo de hospitalización.

Aparte de los síntomas digestivos clásicamente asociados con las toxiinfecciones alimentarias, existen otros cuadros clínicos como los síntomas neurológicos y parálisis muscular causados por *Campylobacter* (Síndrome de Guillain-Barré), el Síndrome Hemolítico-Urémico que ocurre en muy baja proporción de infecciones por *E. coli* O57:H7, y los retrasos mentales causados por la infección de *Listeria monocytogenes* y *Toxoplasma gondii* durante el período gestacional.

En los registros epidemiológicos se recogen los datos de morbi/mortalidad de estas infecciones y también de los denominadores de pérdida de días y de calidad de vida (DALY y QALY). Sin embargo existen otros problemas sanitarios asociados a estas infecciones que muy rara vez se tienen en cuenta. Tras los procesos diarreicos, comienza un proceso de reposición de la microbiota intestinal y como muchas veces coincide con el paciente ingresado en un centro sanitario, éste puede ser colonizado por los llamados “clones hospitalarios de alto riesgo”, causantes de

infecciones severas y numerosas complicaciones nosocomiales. A su vez, muchos de estos clones pueden albergar determinantes moleculares de resistencia a los antibióticos que pueden propiciar un fallo terapéutico en un proceso infeccioso posterior. Este es el caso de *C. perfringens*, que además de ser un patógeno alimentario está causando brotes nosocomiales en todo el mundo con alta tasa de resistencia a antibióticos y frecuentes recidivas. Recientemente se ha sugerido el trasplante de heces de un familiar cercano como el método más efectivo para combatir esta infección.

Dentro de la definición de toxiinfección alimentaria podría tener cabida también las zoonosis que se derivan del consumo de alimentos relacionados con el ganado. Así, existen numerosos estudios que demuestran el paso de linajes bacterianos desde los animales al ser humano, como por ejemplo *Staphylococcus aureus* ST398, pero también de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos vehiculizados en elementos genéticos móviles.



Rosa del Campo Moreno obtuvo el grado de Doctor en Medicina y Cirugía en 1998 en la Universidad de Zaragoza. Desde 1999 ha trabajado como investigadora en la Comunidad Autónoma de Madrid, formando parte del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal y del Instituto de Salud Carlos

III-FIS, en este último en calidad de investigador "Miguel Servet". Actualmente realiza su actividad investigadora en el Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Biomédicas. Sus intereses investigadores se centran en el estudio de las interacciones entre los microorganismos probióticos y la flora intestinal, las aplicaciones de las técnicas de metagenómica y la resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

Es autora de más de 60 artículos científicos en revistas internacionales de impacto, ha dirigido 8 tesis doctorales, ha colaborado en diversos congresos nacionales e internacionales con más de 200 comunicaciones y ha participado en numerosos proyectos de investigación públicos y privados. Es miembro del comité editorial de la revista *Microbial Drug Resistance* y del comité directivo del Grupo de Alimentos de la SEM.

La Seguridad Alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde la perspectiva de los investigadores

Miguel A. Asensio

Higiene y Seguridad Alimentaria, Universidad de Extremadura, España, masensio@unex.es

La investigación en microbiología aporta una base sólida a la seguridad alimentaria, identificando agentes patógenos y sus toxinas, estudiando su incidencia en los alimentos y diseñando nuevos procedimientos para controlar el riesgo en distintas etapas de la cadena alimentaria. El conocimiento generado en los centros de investigación ha contribuido al avance del sector productivo, mediante el diseño de nuevos procesos y productos en la industria.

La seguridad alimentaria figura entre los retos sociales de la estrategia europea del Horizonte 2020, en la que se incluyen no solo soluciones basadas en la tecnología, sino también la innovación no tecnológica y la organizativa. Las líneas de investigación de la Unión Europea en el ámbito de la alimentación se centran en asegurar una dieta sana y segura, incluyendo aspectos que se abordan desde la microbiología, como la evaluación de la contaminación microbiana a lo largo de la cadena alimentaria y de la exposición a este tipo de peligros, la innovación en materia de seguridad alimentaria, así como mejores normas de seguridad alimentaria e innovaciones en la dieta que conduzcan a una mejora de la salud y el bienestar.

La situación de la seguridad alimentaria en España es similar a la de otros campos de la ciencia, encontrándose demandas de masa crítica, colaboración entre grupos especializados, necesidad de participar en proyectos de carácter interdisciplinar, colaboración internacional, etc. Comparte con otros campos científicos las necesidades que se identifican en los objetivos específicos del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016, entre los que se incluye la innovación y la transferencia de conocimiento y de resultados al sector productivo. El éxito en la transferencia del esfuerzo en investigación mejora con la participación directa de las empresas en el diseño de los objetivos, particularmente en la explotación de nuevas tecnologías, ya sea a través de empresas implicadas en procesos de innovación y de base tecnológica o bien a través de centros y parques tecnológicos.

Sin embargo, la aplicación de estos objetivos a la seguridad alimentaria cuenta con algunos aspectos particulares. El flujo de conocimiento de los centros de investigación a las empresas no siempre resulta plenamente satisfactorio, porque las soluciones

desarrolladas mediante una actividad investigadora a veces no se pueden aplicar fácilmente, ya sea por cuestiones técnicas, comerciales, legales o de otro tipo. Al mismo tiempo, la seguridad alimentaria es uno de los factores limitantes en el desarrollo de nuevos productos o procesos, especialmente en los que se reducen o se incorporan ingredientes que limitan el desarrollo microbiano y en los que se modifican los tratamientos que destruyen o inhiben microorganismos.

Los límites o las exigencias mínimas de seguridad alimentaria para estas modificaciones se deben basar en el análisis del riesgo, evaluando los posibles efectos perjudiciales a partir de datos e información científica. Las autoridades sanitarias, como responsables de la gestión del riesgo, deben establecer estas exigencias, bien como el objetivo de seguridad alimentaria para el alimento en el momento del consumo o como objetivos de rendimiento en determinadas etapas del procesado. Es decir, deben definir el nivel de control que se espera para un proceso o un producto de forma cuantitativa y verificable. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con muchos compuestos químicos, no suele disponerse de estos objetivos en forma explícita para los microorganismos. Además, aunque la finalidad sea siempre asegurar la inocuidad y el valor nutritivo, los criterios de las autoridades sanitarias pueden variar según el país e incluso la comunidad autónoma.

Los operadores de las empresas alimentarias que elaboran los nuevos productos o aplican los tratamientos deben seleccionar las medidas de control para cumplir los objetivos de rendimiento para los microorganismos de interés, bien mediante buenas prácticas higiénicas y el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico, o mediante criterios de rendimiento, del proceso, del producto o de aceptación. La falta de precisión en los objetivos de seguridad alimentaria o de rendimiento dificulta la innovación en la industria, porque la empresa debe validar los procesos, demostrando a satisfacción de la autoridad sanitaria que sus medidas de control son eficaces para lograr esos objetivos.

Además de la falta de precisión en los objetivos, la validación de las medidas de control se encuentra con la dificultad de tener que considerar la variabilidad tanto de los valores iniciales de contaminación como de la sensibilidad de las distintas cepas de un

microorganismo patógeno o de distintos microorganismos. A pesar de la gran cantidad de datos que se obtienen regularmente con los análisis para los controles oficiales y para la verificación de los programas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico, es muy escasa la información disponible de la frecuencia real de la incidencia de microorganismos patógenos y sus toxinas en las distintas fases de la cadena alimentaria. También se complica la validación por la incertidumbre asociada a los análisis microbiológicos, debida a la distribución heterogénea de los microorganismos patógenos en las materias primas y a la diversidad de sus estados fisiológicos, incluyendo formas esporuladas, viables no cultivables, etc. Con los nuevos productos o procesos, cuando la bibliografía no ofrece datos en idénticas condiciones, suele resolverse realizando pruebas de inoculación (*challenge tests*) en los que se procesa el alimento inoculado con cepas del microorganismo de elección que hayan originado brotes por alimentos, preferiblemente las más resistentes a la medida de control, y a niveles superiores a los que se hayan obtenido nunca en el alimento. Esto exige una eficacia de las medidas de control que no se corresponde con un adecuado análisis del riesgo, el cual debe constituir la base de las decisiones relativas a la seguridad alimentaria.

Por lo tanto, la comunidad científica debe persuadir a las autoridades sanitarias para que establezcan los límites o exigencias en materia de seguridad alimentaria de forma explícita, incluyendo objetivos de rendimiento obtenidos mediante un riguroso análisis del riesgo para las etapas críticas en el procesado de alimentos. También sería conveniente unificar las exigencias entre los distintos mercados, dentro y fuera de la UE. Por último, sería muy útil disponer de los numerosos datos que se obtienen regularmente sobre la incidencia de los peligros microbianos a lo largo de la cadena alimentaria.



Miguel Ángel Asensio Pérez es Licenciado en Veterinaria y Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (1986). Tras realizar una estancia post-doctoral en el *Food Research Institute* de Bristol, ha desarrollado su actividad docente e investigadora en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura. Es Catedrático de

Higiene y Seguridad Alimentaria en la Facultad de Veterinaria de Cáceres, de la que fue Decano (1997 a 2001).

Su actividad investigadora se ha orientado al estudio de la población fúngica de los productos cárnicos madurados, tanto para seleccionar cepas con efectos deseables como para detectar y prevenir la formación de micotoxinas. Ha sido Presidente de la Junta Directiva del Grupo de Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología (de 2000 a 2008) y ha participado como consultor de la *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*. Actualmente es asesor científico del Servicio de Innovación en Productos de Origen Animal (SiPA) y miembro del Instituto de Productos Cárnicos (IProCar) de la Universidad de Extremadura.

Actividades recientes de la EFSA sobre riesgos biológicos en seguridad alimentaria

Pablo Romero

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italia. Pablo.RomeroBarrios@efsa.europa.eu

La seguridad de los alimentos es una de las principales prioridades en Salud Pública a nivel nacional, comunitario e internacional. Según se recoge en el Reglamento CE 178/2002, la principal misión de la EFSA es el *facilitar asesoramiento científico y apoyo científico y técnico de cara a la labor legislativa y política de la Unión Europea en todos aquellos ámbitos que, directa o indirectamente, influyan en la seguridad de los alimentos para consumo humano o animal. La Agencia facilitará información independiente acerca de todos los temas comprendidos en estos ámbitos así como tomará parte en la comunicación de riesgos.*

Uno de los elementos principales en la estructura de la EFSA son los paneles (o comités) científicos, responsables de gran parte de proporcionar el asesoramiento científico. Cada uno de los nueve paneles científicos de la EFSA opera en la evaluación de riesgos en un ámbito definido de la seguridad alimentaria, entre los cuales se encuentran: peligros biológicos, peligros químicos, salud y bienestar animal, sanidad y protección vegetal, aditivos y sustancias utilizados en alimentos para consumo animal, organismos modificados genéticamente, y nutrición. Los paneles están constituidos por científicos independientes de toda Europa y en algunos casos de fuera de Europa, previa convocatoria pública de manifestaciones de interés.

La Comisión Europea, el Parlamento Europeo, o las autoridades nacionales competentes, en calidad de gestores del riesgo, encargan regularmente a la EFSA la elaboración de un dictamen, también llamado opinión científica, sobre un tema dentro del ámbito de actuación de la agencia. Internamente en EFSA se decide qué panel es el más adecuado para tratar dicha cuestión. A continuación se describirá la misión principal del panel científico sobre peligros biológicos (BIOHAZ), su procedimiento de trabajo y se ofrecerá un breve resumen de sus opiniones científicas relativas a las zoonosis transmitidas por los alimentos, e higiene y microbiología de los alimentos.

El panel científico BIOHAZ proporciona opiniones científicas sobre los peligros biológicos relativos a la seguridad de los alimentos y a las enfermedades transmitidas por los alimentos (incluyendo las encefalopatías espongiformes transmisibles), microbiología, higiene de los alimentos y sobre la gestión de residuos y subproductos animales. La

formación y experiencia de los miembros del panel incluyen higiene de los alimentos, tecnología de los alimentos, microbiología de los alimentos, salud pública, sanidad animal, parasitología, virología, zoonosis, inspección de carnes, epidemiología y encefalopatías espongiformes transmisibles.

Los gestores de riesgos que solicitan una opinión científica sobre un tema determinado, definen el problema en cuestión proporcionando información de referencia sobre las bases legales y el objeto de dicha consulta, seguido de la identificación de cuestiones concretas (los llamados "términos de referencia"), que deben ser contestados en el ejercicio de evaluación de riesgos. También se establece una fecha límite para la finalización de la opinión científica. En general, y dependiendo del tipo de pregunta, las opiniones científicas se estructuran de acuerdo con cuatro principios bien establecidos para la evaluación de riesgos microbiológicos: la identificación del peligro, la evaluación de la exposición, la caracterización del peligro y la caracterización del riesgo, aunque no todas las opiniones contienen necesariamente los cuatro elementos.

El panel BIOHAZ inicia la evaluación del riesgo asignando la tarea a un grupo de trabajo permanente o bien establece un grupo de trabajo específico *ad hoc*, según convenga. Los grupos de trabajo están formados por miembros del panel y por otros expertos invitados previa valoración de sus méritos científicos en el área. Un representante de la Comisión Europea también participa en las reuniones de trabajo en calidad de observador. Hay que tener en cuenta que la comunicación entre el evaluador de riesgos (EFSA) y el gestor de riesgos (Comisión Europea) empieza antes de la presentación de la consulta al panel y continúa durante todo el proceso de evaluación del riesgo. Por ejemplo, que la pregunta sea clara y comprensible, la aceptabilidad del plazo y la disponibilidad de una información de referencia adecuada forman parte de las conversaciones previas a la presentación formal de la consulta al panel y al inicio de la evaluación de riesgos. También se producen otras interacciones informativas que incluyen conversaciones con otras partes interesadas durante el desarrollo de la opinión. El grupo de trabajo puede, por ejemplo, pedir más información a la Comisión, a los Estados Miembros o a otras fuentes (asociaciones empresariales, etc.). Por otra parte, a

medida que se desarrollan las conversaciones y se recibe la información, la consulta puede reformularse o revisarse. El grupo de trabajo elabora un anteproyecto de su opinión científica para que sea considerado por el Panel BIOHAZ, que es responsable del resultado final, y en concreto de aceptar las conclusiones y recomendaciones. En algunos casos, el anteproyecto de opinión científica sale a consulta pública y los comentarios recibidos de todas las partes interesadas se tienen en cuenta durante la discusión y la posterior adopción del documento por parte del panel. Por último, la opinión científica adoptada se publica en el sitio web de la EFSA y se hace un comunicado de prensa si se considera oportuno.

Desde que en el año 2003 se establecieron y se pusieron en funcionamiento los paneles científicos de la EFSA hasta el día de hoy, el panel BIOHAZ ha publicado aproximadamente 175 opiniones científicas. Dejando aparte los temas referentes a las encefalopatías espongiformes transmisibles, las consultas que ha recibido el panel y para las que ha emitido opiniones científicas pueden clasificarse en los siguientes temas:

- Para un peligro dado (por ejemplo: *Clostridium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Salmonella*), la identificación de las categorías de productos alimentarios y/o de los procesos de fabricación y preparación de los mismos que pueden suponer un riesgo para la salud humana. Un ejemplo de opinión científica en esta línea fue publicado en el 2011: una opinión científica sobre la resistencia causada por cepas bacterianas productoras de cefalosporinas de amplio espectro en alimentos.

- Para un producto alimentario concreto, la identificación de los peligros microbiológicos asociados. Por ejemplo, la opinión científica valorando el riesgo causado por patógenos en alimentos de origen no animal, publicada en el 2013.

- La evaluación de los métodos de inspección de las carnes de distintas especies animales. Las opiniones más recientes fueron publicadas en el 2001 (inspección de cerdos), 2012 (de aves), y 2013 (cuatro opiniones sobre rumiantes y otras especies).

- La evaluación de métodos/medidas de control, p. ej. la opinión sobre *Campylobacter* en carne de pollo: opciones de control y objetivos de funcionamiento a distintos niveles de la cadena de producción, publicada en el 2011.

- Evaluación de riesgos de un determinado peligro a lo largo de toda la cadena alimentaria, p. ej. *Salmonella* en la producción porcina y en la carne de cerdo, publicada en el 2010.

- Evaluación de riesgos como parte de procesos de homologación, por ejemplo la evaluación de la

eficacia de sustancias que se van a utilizar para descontaminar las superficies de productos de origen animal. Por ejemplo, la evaluación de la eficacia del ácido láctico para eliminar contaminación de la superficie de cortes o canales de vacuno, publicada en el 2011.



Pablo Romero obtuvo la Licenciatura en Veterinaria en 1994 (especialidad en Bromatología, Sanidad y Tecnología de los Alimentos) y la de Ciencia y Tecnología de los Alimentos en 1996, ambas en la Universidad de Zaragoza. En 2004 obtuvo un título de Máster en Epidemiología en la Universidad de Guelph, Canadá.

En 1997 se trasladó al Reino Unido, donde trabajó como inspector veterinario en varios mataderos y salas de despiece. Se incorporó a los servicios oficiales veterinarios en el año 2000, y estuvo involucrado en el control de diversos brotes epidémicos animales (fiebre aftosa, peste porcina y encefalopatía espongiforme bovina). Posteriormente ha trabajado en Canadá e Indonesia como epidemiólogo veterinario, en temas de salud pública, como la seguridad alimentaria y el control de la gripe aviar.

Desde 2009 trabaja en la *European Food Safety Authority* (EFSA), donde ha sido responsable de la coordinación de varios grupos de trabajo del Panel de expertos en Peligros Biológicos acerca de la inspección de la carne, transmisión de scrapie por transferencia de embriones y la conservación de huevos. En la actualidad está trabajando en un proyecto sobre herramientas para la priorización de peligros biológicos.

La Seguridad Alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde la perspectiva de las industrias agroalimentarias

Blanca Jáuregui Arbizu

Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA). bjaregui@cnta.es

INTRODUCCIÓN

A excepción de los sectores basados en procesos fermentativos, para muchas empresas agroalimentarias, microbiología es sinónimo de problemas. A menudo las mejoras en procesos o el esfuerzo analítico dedicado a verificaciones y controles microbiológicos tienen como objetivo evitar estos problemas.

CNTA, como entidad que presta servicios tecnológicos avanzados a más de 500 empresas del sector agroalimentario, ha acumulado en los últimos treinta años una importante experiencia en lo que refiere a las demandas en cuestiones microbiológicas de las empresas con el único objetivo de dar solución a estos problemas. A continuación se expondrán algunos datos sobre tipología de análisis realizados en CNTA con referencia a su estratificación por matrices alimentarias, analíticas realizadas etc, que reflejan lo que las empresas solicitan de forma rutinaria a un centro tecnológico en materia de microbiología.

En esta presentación también se presentan los datos obtenidos mediante encuesta a técnicos responsables de calidad y seguridad alimentaria en varias empresas agroalimentarias representativas de distintos subsectores.

MICROBIOLOGÍA EN CNTA

A partir de la base de datos LABWARE-LIMS de gestión de resultados de laboratorio implantado en CNTA desde 2012, se realizó una consulta en la que se seleccionaron aquellas muestras con determinaciones microbiológicas en un período aproximado de dos años y medio (entre el 1 de Enero de 2012 y el 14 de Mayo de 2014).

Del total de 92098 muestras analizadas en CNTA, 32803 tenían alguna determinación microbiológica, lo que supone el 36 % del total de muestras que se manejaron en CNTA durante ese periodo.

En lo que se refiere a los análisis más demandados se observa un cumplimiento muy próximo a la regla 80:20 de Pareto. Más del 80 % de las determinaciones pertenecen a 22 análisis microbiológicos. Cabe destacar que casi un 30 % de todos los análisis realizados corresponden a las determinaciones de estabilidad de conservas. La distribución por matrices alimentarias es más dispersa debido al elevado número de descripciones de producto disponibles.

La mayor parte de la actividad microbiológica en CNTA se origina en las necesidades analíticas de las empresas en cumplimiento con la legislación o sus propios requisitos de autocontrol por clientes, o normas de calidad tipo IFS ó BRC, por ejemplo. Sin embargo, en algunas ocasiones es preciso profundizar en las causas que han provocado algún tipo de alteración microbiológica detectada en los análisis de rutina.

A este respecto cada vez son más frecuentes las situaciones en las que se deben realizar estudios de índole multidisciplinar para dilucidar las causas de las alteraciones.

LOCALIZACIÓN DE LOS PROBLEMAS MICROBIOLÓGICOS EN LA INDUSTRIA

En colaboración con los Departamentos de microbiología y seguridad alimentaria de CNTA, se elaboró una encuesta de 20 preguntas con el objetivo de conocer en qué localización se encuentran las preocupaciones microbiológicas de las empresas alimentarias y otros aspectos generales no vinculados a una localización concreta.

En la encuesta se solicitó la valoración por parte técnicos de amplia experiencia en empresas alimentarias sobre:

- Recepción e inicio del proceso productivo
- Transformación
- Expedición y venta
- Temas horizontales

Las respuestas obtenidas se han agrupado de forma cualitativa para determinar las localizaciones más frecuentes de las preocupaciones microbiológicas de las empresas.



Blanca Jaúregui se licenció en Ciencias Biológicas por la Universidad de Navarra en 1990 y obtuvo el título de Master en Mejora Genética Vegetal por el Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza en 1993. Obtuvo el grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universitat de Barcelona en 1998, tras lo cual realizó una estancia como investigadora

postdoctoral en el Institut National de Recherche Agronomique (INRA) (1998-1999). En 2000 se incorporó al Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA), primero como responsable del Departamento de Biotecnología, y posteriormente como Responsable del Departamento de Aguas (2005).

En CNTA ha trabajado como investigador responsable en 8 Proyectos de I+D del programa PROFIT de investigación aplicada, en los campos de biotecnología y análisis de aguas, siempre en colaboración con empresas agroalimentarias. Ha representado a CNTA en diversos comités técnicos vinculados al análisis alimentario a nivel nacional (AEN 34/SC4 GT11, OGMs) e internacional (CEN/TC 275 WG11, OGMs; CEN/TC 275 WG12, alérgenos), y ha colaborado en foros técnicos nacionales y europeos en colaboración con el sector de aguas envasadas. Desde Enero de 2013 es Directora de I+D+i en CNTA, desarrollando la coordinación de los investigadores del Centro en torno a cinco ejes temáticos: ingredientes alimentarios de valor, generación de nuevos productos, procesos y packaging, nuevas tecnologías de conservación, microbiología industrial y producción alimentaria sostenible

SESIÓN III: La seguridad alimentaria y la Microbiología de los Alimentos desde distintas perspectivas II.

Betalactamasas de espectro extendido en alimentos: prevalencia y estudio filogenético de cepas de *Escherichia coli*

Elena Ojer-Usoz, David González y Ana Isabel Vitas

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas. Departamento de Microbiología y Parasitología
Universidad de Navarra, España. eojeruso@alumni.unav.es

Como consecuencia del elevado uso de betalactámicos en clínica humana y en veterinaria se ha detectado la emergencia de resistencias a estos antibióticos en microorganismos de la familia de las *Enterobacteriaceae*, siendo la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) el mecanismo de resistencia predominante. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de cepas productoras de BLEE en diferentes grupos de alimentos y realizar el estudio filogenético de las cepas de *E. coli* aisladas. Se analizaron un total de 580 muestras de alimentos de diversos orígenes: vegetales ($n=306$), quesos ($n=34$), pescados ($n=34$), carnes frescas (pollo $n=56$; cerdo $n=57$; ternera $n=56$) y cárnicos cocidos loncheados ($n=37$). Los resultados mostraron que la carne de pollo presenta un elevado riesgo de transmisión de cepas BLEE (presencia en el 87,5% de las muestras) y que *E. coli* es la especie predominante (87,5% de 116 cepas resistentes a cefpodoxima). La caracterización molecular por PCR y secuenciación mostró que *bla*_{CTXM-1} y *bla*_{CTXM-14} eran los genes predominantes, seguidos de *bla*_{SHV-12} y *bla*_{TEM-42}. Finalmente, la PCR triple (*chuA*, *yjaA*, *tspE4C2*) determinó como filogrupos predominantes A y B1. Estos resultados muestran la amplia diseminación de *E. coli* productoras de BLEE en alimentos y especialmente en carnes y derivados cárnicos, por lo que son necesarios más estudios para conocer las vías de diseminación de estas resistencias.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos resistentes a antibióticos son unos de los mayores problemas de salud pública en la actualidad. Debido al elevado uso de betalactámicos en el tratamiento de infecciones en humanos y en animales, se ha observado un aumento de la resistencia a estos compuestos en microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* y especialmente en *Escherichia coli*. El principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos es la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas son de codificación plasmídica y en los últimos años han evolucionado mediante mecanismos de mutación, que suponen una rápida adquisición de resistencias y una gran capacidad de diseminación (Gniadkowski, 2008). Las betalactamasas de tipo CTX-M son las más extendidas en la actualidad, y en la última década se ha producido un aumento de las BLEE de tipo CTX-M-15 en España y en toda Europa (Livermore y col., 2007). Diversos estudios muestran la presencia de enterobacterias productoras de BLEE (E-BLEE) en muestras clínicas, ambientales y de alimentos; sin embargo el último informe de la OMS señala la importancia de integrar los sistemas de vigilancia para comparar datos de resistencias en distintos nichos ecológicos (WHO, 2014). El objetivo de este estudio ha sido determinar la prevalencia de E-BLEE en diferentes grupos de alimentos y realizar el estudio filogenético de las cepas de *E. coli* aisladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre 2010 y 2012 se muestrearon 22 puntos de venta de alimentos distribuidos por toda la geografía navarra. Se analizaron un total de 580 muestras de diversos orígenes: vegetales ($n=306$), quesos ($n=34$), pescados ($n=34$), carnes frescas (pollo $n=56$; cerdo $n=57$; ternera $n=56$) y cárnicos cocidos loncheados ($n=37$).

Para determinar la presencia de E-BLEE se realizó un enriquecimiento en caldo EE Mossel (Difco) y un aislamiento en el medio Chrom ID ESBL (Biomerieux), que selecciona las cepas resistentes a cefpodoxima. Las colonias sospechosas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas (Gram, catalasa, oxidasa, galerías API).

El estudio de susceptibilidad antibiótica se llevó a cabo mediante test de disco combinado, sinergia de doble disco y se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias mediante un método automatizado (Siemens NM37).

La caracterización molecular de los genes implicados en estas resistencias (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA}) se realizó mediante PCR y secuenciación. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos GenBank y la web de betalactamasas (<http://www.lahey.org/Studies/>)

La determinación de grupos filogenéticos se realizó mediante una PCR triplex que detecta 3 genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2*; y que permite clasificar cada cepa en un grupo filogenético A, B1, B2 y D (Clermont y col., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que en el 19,3% de las muestras se encontraron E-BLEE, siendo la carne de pollo el alimento que presenta un riesgo más elevado de transmisión de estas cepas (Tabla 1), ya que están presentes en el 87,5% de las muestras analizadas.

E. coli es la especie predominante (87,5%), el resto de cepas aisladas pertenecieron a los siguientes géneros: *Enterobacter cloacae* (n=7), *Proteus mirabilis* (n=2), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *Enterobacter spp.* (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=1), *Proteus vulgaris* (n=1), *Serratia liquefaciens* (n=1) y *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1).

Tabla 1: Presencia de E-BLEE por grupos de alimentos

CATEGORÍAS DE ALIMENTOS	N MUESTRAS ANALIZADAS	N MUESTRAS POSITIVAS BLEE (%)
Vegetales	306	14 (4,6)
Quesos	34	0
Pescados	34	0
Carnes frescas pollo	56	49 (87,5)
Carnes frescas cerdo	57	22 (38,6)
Carnes frescas ternera	56	23 (41,1)
Cárnicos cocidos loncheados	37	1 (2,7)
Total	580	112 (19,3)

El estudio de sensibilidad antibiótica confirmó la resistencia a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam en el 100% de las cepas. Además, se observaron porcentajes de resistencias superiores al 60% frente a ampicilina/sulbactam, ciprofloxacino, moxifloxacino, y tetraciclinas (Figura 1). Sin embargo, el 100% de las cepas fueron sensibles a carbapenemes, amikacina y tigeciclina.

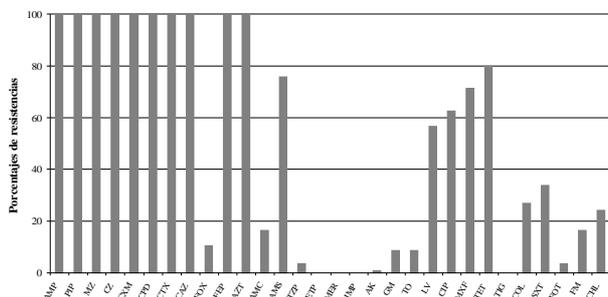


Figura 1: Porcentajes de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas (ampicilina, AMP; piperacilina, PIP; mezlocilina, MZ; cefazolina, CZ; cefuroxima, CXM; cefpodoxima, CPD, cefotaxima, CTX; ceftazidima, CAZ; cefoxitina, FOX; cefepime, FEP; aztreonam, AZT; amoxicilina/clavulánico, AMC; ampicilina/sulbactam, AMS; piperacilina/tazobactam, TZP; ertapenem, ETP, meropenem, MER; imipenem, IMP; amikacina, AK; gentamicina, GM; tobramicina, TO; levofloxacino, LV; ciprofloxacino, CIP; moxifloxacino, MX; tetraciclina, TET; tigeciclina, TIG; colistina, COL; cotrimoxazol, SXT; fosfomicina, FOT; nitrofurantoína, FM; cloranfenicol, CHL).

La caracterización molecular mostró que *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-14} son los genes predominantes (Figura 2), seguidos de *bla*_{SHV-12} y *bla*_{TEM-42}. A diferencia de lo descrito en otros estudios, no se han aislado cepas portadoras de *bla*_{CTX-M-15} (Livermore y col., 2007). Finalmente, se observó que el grupo filogenético A fue predominante en carnes frescas de pollo (55,56%) y en vegetales (43%), mientras que el filogrupo B1

está principalmente presente en carnes de cerdo (60%) y de ternera (33,33%) (Figura 3).

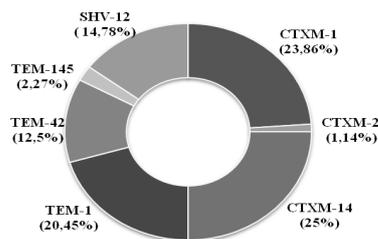


Figura 2: Genes de betalactamasas detectados en cepas de *E. coli*.

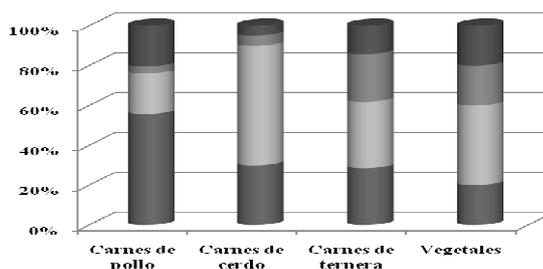


Figura 3: Distribución filogenética de las cepas de *E. coli* aisladas en los distintos grupos de alimentos.

Además se observó que las cepas portadoras de genes *bla*_{CTXM-1} se asocian al filogrupo B1 y las cepas portadoras de *bla*_{CTXM-14} a los filogrupos A y B1. Por el contrario, en muestras clínicas las cepas *bla*_{CTXM-1} se asocian al filogrupo A (Leistner y col., 2014).

En conclusión, la presencia de *E. coli* productoras de BLEE en alimentos, y especialmente en productos cárnicos, subraya la necesidad de estudios más exhaustivos para controlar su diseminación a través de la cadena alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol., 66:4555-4558.

Gniadkowski, M., 2008. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. Clin. Microbiol. Infect., 14 (Suppl. 1):11-32.

Leistner, R., Sakellariou, C., Gürntke, S., Kola, A., Steinmetz, I., Kohler, C., Pfeifer, Y., Eller, C., Gastmeier, P., Schwab, F. 2014. Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* from bloodstream infection. Infect Drug Resist., 7:57-62.

Livermore, D.M., Cantón, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N., 2007. CTXM: changing the face of ESBLs in Europe. J. Antimicrob. Chemother., 59 (2):165-174.

WHO, World Health Organization, 2014. Antimicrobial Resistance: Global report on surveillance. (www.who.int/drugresistance).

Presencia y caracterización genotípica de *Staphylococcus* meticilina resistentes aislados a partir de queso fresco

Fanny Herrera Arias¹, Jesús Santos Buelga²

¹ Departamento de Microbiología, Universidad de Pamplona, Colombia, fannyh@unipamplona.edu.co

² Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España

Se analizaron 68 cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivas aisladas a partir de 100 muestras de queso fresco elaborado en Pamplona (Colombia). Se determinó la presencia de los siguientes genes mediante PCR: *mecA*, *coa* y los correspondientes a las principales enterotoxinas que puede producir esta bacteria, además se estudió la posible multiresistencia fenotípica frente a los principales antibióticos empleados en clínica; finalmente se realizó la caracterización molecular de estas cepas. Se detectó la presencia del gen *mecA* en 12 del total de cepas analizadas, el 92% de estas cepas evidenció resistencia frente a la oxacilina, penicilina y resistencia intermedia frente a la vancomicina. Todas las cepas demostraron la presencia del gen *coa* con una muy baja heterogeneidad; en el 42% de las cepas se detectó la presencia del gen para la enterotoxina B. La digestión del gen *coa* con cada una de las enzimas, *CfoI* y *AluI*, mediante PCR-RFLP arrojó dos perfiles de restricción diferentes entre las cepas.

INTRODUCCIÓN

Se considera que *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes causales de intoxicaciones alimentarias en el mundo y es el patógeno más frecuentemente asociado a quesos elaborados con leche cruda (Cretenet y col., 2011). Su gran capacidad de adquirir elementos exógenos por transferencia horizontal, tanto dentro de la especie como con otras especies, le permite ser un patógeno exitoso y adaptarse fácilmente al medio y a los agentes antimicrobianos, mediante la adquisición de factores de resistencia a antibióticos codificados por plásmidos, secuencias de inserción y transposones; dicha resistencia ha agudizado el problema mundial de las infecciones por esta bacteria.

Se estima que los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) causaron más de 150.000 casos en el 2010 en la Unión Europea (Doyle y col., 2012); en Colombia, los casos de MRSA adquiridos en la comunidad (CA) se incrementaron de 1% en el 2001 a 5,4% en el 2006 (Vanegas y col., 2012).

Hasta la fecha, se han reportado algunos brotes de origen alimentario por MRSA (FBA-MRSA), siendo el origen de estos brotes manipuladores infectados; adicionalmente, se ha reportado el aislamiento de cepas MRSA a partir de alimentos, de origen animal, principalmente (Doyle y col., 2012).

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de cepas MRSA en muestras de queso fresco elaborado en Pamplona (Colombia) y realizar la caracterización genotípica de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas. Se analizaron 68 cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivas aisladas a partir de 100 muestras de queso fresco elaborado en Pamplona (Colombia).

Susceptibilidad frente a antibióticos. A partir de cultivos de las cepas de 24 h en TSB, se realizó una siembra de forma masiva sobre la superficie del agar Mueller-Hinton. Se colocaron sobre la siembra anterior, discos con los siguientes antibióticos: azitromicina, ciprofloxacina, claritromicina, clindamicina, cloramphenicol, eritromicina, gentamicina, levofloxacina, lomefloxacina, nitrofurantoina, norfloxacina, ofloxacina, oxacilina, penicilina G, rifampicina, teicoplanina, tetraciclina, trimetoprim y vancomicina. Cada placa fue incubada a 37°C/24h. Se realizó la interpretación de los resultados según los parámetros del CLSI (2011).

Detección de genes por PCR. A partir de cepas crecidas en caldo Tripticasa de Soja, incubadas a 37°C/24h, se realizó la extracción del ADN empleando InstaGene. Partiendo de 3 µL del ADN aislado, se llevó a cabo la PCR, para esto, se emplearon los pares de cebadores correspondientes para cada gen a una concentración final de 1 mM y una MasterMix comercial. Los genes amplificados fueron *coa* (coagulasa), *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* (enterotoxinas a-e) y *mecA* (resistencia a la meticilina, utilizando los cebadores y las condiciones de amplificación previamente descritas (Linaje y col., 2012).

Ensayos de PCR-RFLP. Partiendo del amplificado del gen *coa* se estableció el tamaño de cada uno de los fragmentos amplificados mediante la utilización del GelAnalyzer. Se realizó la digestión de cada amplificado con 2U de las enzimas *CfoI* y *AluI* incubando a 37°C/6h. Se separaron los fragmentos digeridos en un gel de agarosa al 1,5% a 100V durante 1h. Finalmente, se analizaron los patrones de bandas obtenidos mediante el software GelCompar v6.1, empleando el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de genes que codifican factores de virulencia.

Se detectó la presencia del gen *mecA* en 12 (17,6%) de las cepas analizadas, que procedían de 9

muestras diferentes. En un estudio similar, Shanehbandi y col. (2014), detectaron este gen en el 21% de cepas de *S. aureus* aisladas de quesos tradicionales de Irán; en Colombia se aislaron 3,0% MRSA a partir de muestras de carne molida y crema de leche (Vanegas y col., 2012). Nuestro estudio se trata de la primera descripción de MRSA en queso en Colombia.

En el 42% de las cepas se detectó la presencia del gen para la enterotoxina estafilocócica B (ESB), siendo este estudio, el primer reporte de este tipo en Colombia. El hecho de detectar el gen para la ESB, provee mayor evidencia para soportar que las cepas MRSA puedan estar involucradas en brotes de intoxicaciones alimentarias.

Susceptibilidad frente a antibióticos.

En el 92% de las cepas *mecA* positivas, se evidenció resistencia frente a la oxacilina, penicilina y resistencia intermedia frente a la vancomicina; frente a los otros antibióticos ensayados, todas las cepas mostraron idéntico patrón de sensibilidad. Los estafilococos resistentes a la oxacilina deben considerarse resistentes a todos agentes antimicrobianos β -lactámicos actualmente disponibles a excepción de las recientes cefalosporinas con actividad anti-MRSA (CLSI, 2011).

La presencia de MRSA en las muestras puede ser debida al uso indiscriminado de antibióticos en el ganado; la resistencia a la metilina es ocasionada por el gen *mecA* el cual codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a) con una baja afinidad por β -lactámicos (Vanegas y col., 2012); *S. aureus* puede adaptarse rápidamente a la presión selectiva de los antibióticos y obtener la resistencia a la metilina por adquisición de este gen (Intrakamhaeng y col., 2012).

Todas las cepas MRSA demostraron la presencia del gen *coa*; al determinar su tamaño mediante la utilización del software GelAnalyzer, la variación del tamaño fue de 530 a 600 pb.

Los ensayos de PCR-RFLP con *CfoI* y *AluI* arrojaron dos perfiles diferentes entre las cepas MRSA (Figura 1), aunque el número de bandas fue pequeño (2-3 bandas), por lo que su poder de discriminación no es muy elevado y no permite poner de manifiesto diferencias genéticas entre cepas aisladas de las mismas muestras.

La alta prevalencia de cepas resistentes a la metilina detectadas en este estudio, debe ser considerada como un potencial riesgo para la salud de los consumidores, especialmente para personas inmunocomprometidas en quienes esta bacteria puede llegar ser letal; por todo lo anterior, deben implementarse las medidas necesarias para evitar la

futura propagación de MRSA a la población, haciendo énfasis en la implementación de Buenas Prácticas Higiénicas y en la supervisión de la utilización de antibióticos.

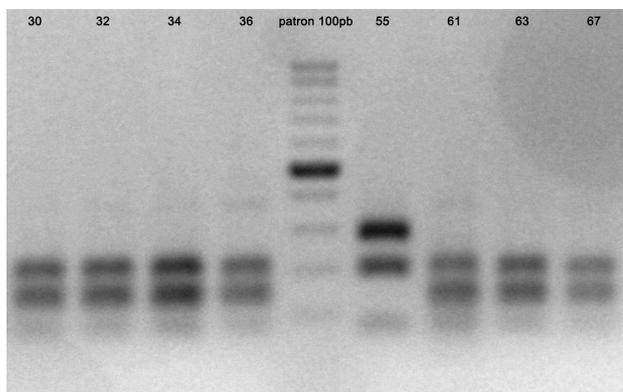


Figura 1: Ejemplo de patrón de restricción obtenido en las cepas MRSA empleando *AluI*. 30-67: cepas MRSA.

BIBLIOGRAFÍA

- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y. 2011, Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. Dairy Sci Technol., 91:127–150.
- Doyle, M., Hartmann, F., Lee A. 2012, Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? Anim Health Res Rev., 13:157–180.
- Intrakamhaeng, M., Komutarin, T., Pimpukdee, K., Aengwanich W. 2012, Incidence of Enterotoxin-Producing MRSA in Bovine Mastitis Cases, Bulk Milk Tanks and Processing Plants in Thailand. J. Anim. Vet. Adv., 11: 655-661.
- Linage, B., Rodríguez-Calleja, J., Otero, A., García-López, M., Santos, J. 2012, Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewe milk. J Dairy Sci, 95:1639–1644.
- Shanehbandi D, Baradaran B, Sadigh-Eteghad S, Zarredar H. 2014, Occurrence of Methicillin Resistant and Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Traditional Cheeses in the North West of Iran. ISRN Microbiology., 2014, Article ID 129580, 5 pages.
- Vanegas, C., Moreno, J., Ramos, V., Chirivi, J., Garzón, A., Arévalo, S., Martínez, M., Gardeazábal, P., Baquero, C. 2012, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Colombian Foods. Bio., 2: 61-67.

Uso de bacteriófagos como bioconservantes frente a *Listeria monocytogenes* en zumos de frutas

Márcia Oliveira¹, Maribel Abadias², Isabel Alegre¹, Pilar Colás¹ e Inmaculada Viñas¹

¹ *Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat de Lleida, Xarxa-Poscosecha, Centro Agrotecnio, Lleida*
marcia.oliveira@tecal.udl.cat

² *IRTA, XaRTA-Poscosecha, Fruitcentre, Lleida*

El objetivo de este estudio fue investigar la eficacia del fago LISTEX P100 frente a *L. monocytogenes* en zumos de fruta con diferentes valores de pH y acidez (melón, pera y manzana) almacenados a 10°C durante 8 días. En los zumos no tratados con el fago e incluso a temperatura de refrigeración, se observó que *L. monocytogenes* creció en zumo de melón, sobrevivió en zumo de pera y decreció en zumo de manzana. En los zumos tratados con el fago, se observó una mayor eficacia en el zumo de melón seguido del de pera, pero no se observó ningún efecto en el de manzana. La baja efectividad del fago en el zumo de manzana fue debida, posiblemente, al bajo pH ya que, cuando el pH del zumo de manzana se modificó a valores superiores (similar al del zumo de pera) la concentración del fago se mantuvo y la población de *L. monocytogenes* se redujo. La eficacia de los fagos en los alimentos con bajo pH se puede mejorar mediante el uso de una mayor concentración de éstos o el desarrollo de fagos mutantes tolerantes a bajo pH. La persistencia de los fagos es un parámetro importante para poder ser aplicado como un protector o conservante o como un aditivo alimentario para controlar el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria en la industria alimentaria y de bebidas.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un organismo ubicuo en el medio ambiente y puede ser aislado en el suelo, en el agua, en la vegetación y en las heces del ganado. Ha estado implicada en varios brotes de toxiinfecciones alimentarias relacionadas con el consumo de frutas y hortalizas. El más reciente (octubre de 2011) afectó a un total de 146 personas y causó 30 muertes en los EEUU debido a melón contaminado (CDC, 2011).

La bioconservación o control biológico es un método que puede mejorar la seguridad de los alimentos y alargar la vida útil a través del uso de microorganismos o de sustancias antimicrobianas que algunos producen. Los microorganismos utilizados como agentes de biocontrol deben poseer una elevada actividad antagónica, ser seguros para la salud humana y no tener ningún efecto adverso sobre la calidad sensorial y nutricional del producto. Entre los métodos de bioconservación se encuentran los bacteriófagos o fagos, que son virus que invaden células bacterianas específicas, alteran su metabolismo y las lisan sin comprometer la viabilidad de la microbiota presente. Los fagos son los microorganismos más abundantes en nuestro medio ambiente y están presentes en grandes cantidades en el agua y en los alimentos (Brussow y Hendrix, 2002). Están también presentes en el sistema gastrointestinal presentando una alternativa natural, no tóxica y viable para el control de varios patógenos humanos (Greer, 2005). El objetivo de este estudio fue investigar la eficacia del fago LISTEX P100 (Micareos Food Safety,

The Netherlands) para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en zumos de fruta con diferentes valores de pH y acidez (melón, pH 5,8; pera, pH 4,6 y manzana, pH 3,7) almacenados a 10 °C durante 8 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizó una mezcla de tres cepas de *L. monocytogenes*: serotipo 1a (CECT 4031), serotipo 4a (CECT 940) y serotipo 4b (CECT 4032); y una preparación del fago Listex P100 (Micareos Food Safety, The Netherlands) a una concentración de 10¹¹ ufp/mL aproximadamente. Las frutas, manzana (Golden Delicious), pera (Conference) y melón (Piel de Sapo), se lavaron y desinfectaron con etanol al 70 %, se pelaron y cortaron. Los zumos de fruta se prepararon con una licuadora, se filtraron utilizando lana de vidrio y se esterizaron a 115 °C durante 10 min. Treinta mililitros de cada zumo se inocularon a una concentración final de 1×10⁵ ufc/mL de *L. monocytogenes* y 1×10⁸ pfu/mL de fago. Los zumos se conservaron a 10 °C durante 8 días.

La población inicial de *L. monocytogenes* y del fago se determinaron por triplicado en el momento inicial y después de conservación. Para determinar la población de *L. monocytogenes* y del fago, una alícuota de cada zumo se diluyó en peptona salina y se sembró en medios selectivos, Palcam y BHI (brain-heart infusion agar), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se observó que incluso a temperaturas de refrigeración, *L. monocytogenes* creció en el zumo de melón, sobrevivió en el de pera y decreció en el de manzana. La concentración inicial de *L. monocytogenes* en los zumos de frutas no tratadas fue de alrededor de 5,3 log ufc/mL. En el

zumo de melón, el patógeno creció considerablemente durante el período de almacenamiento, llegando a 8,7 log ufc/mL después de 8 días de almacenamiento. En el zumo de pera, el patógeno se mantuvo constante durante el período de almacenamiento con una concentración aproximada de 5,0 log ufc/mL. En el zumo de manzana, la población de *L. monocytogenes* disminuyó aproximadamente 2 log durante el tiempo de conservación (Figura 1).

El fago fue más efectivo en el zumo de melón seguido del de pera y no tuvo ningún efecto en el de manzana (datos no mostrados). La mayor reducción de la población de *L. monocytogenes* (8,0 log ufc/mL), se observó en melón siendo la población final del patógeno de 0,6 log ufc/mL. Además, el fago fue también eficaz en zumo de pera, con una reducción entre 2,1 y 2,8 log ufc/mL durante el tiempo de almacenamiento, siendo la concentración final de *L. monocytogenes* de 3,0 log ufc/mL, aproximadamente. No se observó ningún efecto del tratamiento con el fago en el zumo de manzana, *L. monocytogenes* sobrevivió durante el periodo de almacenamiento con concentraciones entre 5,0 y 3,0 log ufc/mL (Figura 1).

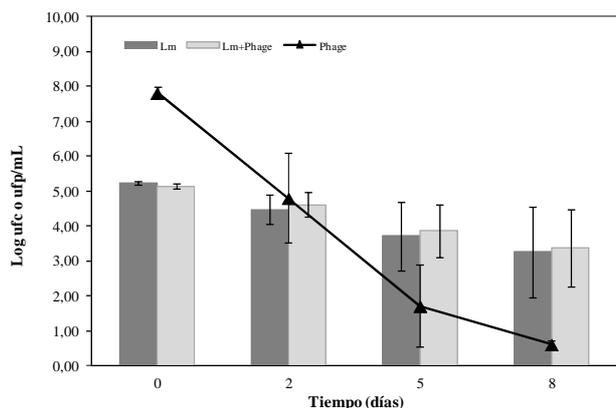


Figura 1: Población de *L. monocytogenes* (log ufc/mL) y del fago (log ufp/mL) en zumo de manzana (pH 3,7) a 10 °C.

La población del fago se mantuvo constante en los zumos de melón y pera durante el período de almacenamiento, con una concentración entre 7,9 y 7,4 log ufp/mL (datos no mostrados). Por el contrario, la concentración del fago se redujo rápidamente en el zumo de manzana con una disminución de 7 log después de 8 días de almacenamiento (Figura 1).

La baja efectividad del fago en el zumo de manzana fue debida, posiblemente, al bajo pH, ya que la concentración del fago decreció por debajo de 2,0 log ufp/mL tras 5 días a 10 °C. Sin embargo, cuando el pH del zumo de manzana se modificó a valores superiores (similar al del zumo de pera, pH 4,8) la

concentración del fago se mantuvo y la población de *L. monocytogenes* se redujo (Figura 2).

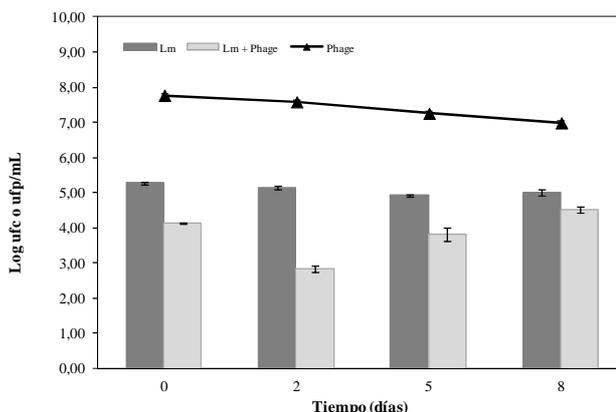


Figura 2: Población de *L. monocytogenes* (log ufc/mL) y del fago (log ufp/mL) en zumo de manzana (pH ajustado a 4,8) a 10 °C.

Además del pH, otras consideraciones a tener en cuenta en la relación fago-huésped incluyen otras propiedades fisicoquímicas del alimento, la presencia de otros microorganismos, la actividad del fago en un sustrato sólido o en biofilms, la emergencia de bacterias mutantes resistentes, y la concentración del fago y del huésped necesarios para permitir la replicación (Hudson y col., 2005). La eficacia de los fagos en los alimentos con bajo pH se puede mejorar mediante el uso de una mayor concentración de éstos o el desarrollo de fagos mutantes tolerantes a bajo pH. La persistencia de los fagos es un parámetro importante para poder ser aplicado como un protector o conservante o como un aditivo alimentario para controlar el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria en la industria alimentaria y de bebidas.

Estos resultados destacan que LISTEX P100 podría evitar el crecimiento de patógenos en zumos de frutas con alto pH durante el almacenamiento a 10 °C.

BIBLIOGRAFÍA

- Brussow, H., Hendrix, R. W. 2002, Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, 108:13-16.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2011, Investigation update: Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen farms, Colorado. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html> (consultado 16.04.2012).
- Greer, G. G. 2005, Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Protect*, 68:1102-1111.
- Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G., Greening, G. 2005, Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J Food Protect*, 68:426-437.

Agradecimientos. Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto AGL-2010-19385).

Efecto inhibitor de metabolitos y compuestos fenólicos de extractos de arándano rojo frente a la adherencia de *E. coli* uropatógena

Adelaida Esteban Fernández, Pedro J. Martín-Álvarez, Begoña Bartolomé, M. Victoria Moreno-Arribas y Dolores González de Llano

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM). C/Nicolás Cabrera 9, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, España, adelaida.e.fernandez@cial.uam-csic.es

La actividad antiadherente frente a *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) del arándano rojo se ha estudiado ampliamente, encontrándose que las proantocianidinas de tipo A son los componentes mayoritariamente responsables de esta actividad. Sin embargo, las evidencias científicas sugieren que estos efectos beneficiosos podrían deberse a los metabolitos formados a su paso por el tracto gastrointestinal. Durante el desarrollo de este trabajo se ha evaluado la capacidad de las proantocianidinas y de los metabolitos fenólicos originados a partir de las mismas, de inhibir la adherencia de UPEC a células humanas de epitelio de vejiga. Para ello, se optimizó un método *in vitro* que permite estudiar la adherencia de *E. coli* a células T24 de epitelio de vejiga, aplicándose al estudio de 15 compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos, fenoles simples y flavan-3-oles, así como extractos de arándano rojo y pepita de uva. También se evaluó la capacidad inhibitoria de la adherencia de muestras de orina de mujeres sanas recogidas antes y tras una ingesta aguda de un complemento alimenticio de arándano rojo rico en proantocianidinas de tipo A.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) constituyen una de las afecciones más comunes a nivel mundial, siendo *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) responsable del 70-90% de los casos (Hilbert y col., 2008). El tratamiento más empleado hasta ahora para combatir las ITUs, el uso de antibióticos, presenta un problema importante ya que las bacterias adquieren resistencia a los mismos.

Con la búsqueda de nuevas profilaxis ha ido adquiriendo cada vez más importancia el empleo de sustancias antiadherentes. La actividad antiadherente frente a UPEC de los extractos fenólicos del arándano rojo se ha estudiado ampliamente, encontrándose que las proantocianidinas de tipo A parecen ser los componentes mayoritariamente responsables de esta actividad. Sin embargo, las evidencias científicas sugieren que estas estructuras no alcanzan *in vivo* el uroepitelio, por lo que los efectos beneficiosos podrían deberse más a los metabolitos formados a su paso por el tracto gastrointestinal, principalmente por acción de la microbiota del colon. Por ello, se ha evaluado la actividad inhibitoria de la adherencia de los metabolitos fenólicos de extractos de arándano rojo frente a la cepa *E. coli* ATCC®53503.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las soluciones fenólicas. Se ensayaron soluciones de 15 compuestos fenólicos preparadas a concentraciones de 100, 250 y 500 µM, y de 200, 500 y 1000 µg/ml en el caso de los extractos fenólicos de arándano rojo y pepita de uva (Vitaflavan®). Estos compuestos se disolvieron en PBS con 0,01% de DMSO.

Muestras de orina humanas. Las muestras de orina proceden de 3 mujeres voluntarias sanas que siguieron una dieta baja en polifenoles durante los 2 días previos y los 2 días del ensayo, y en el 2º día fueron sometidas a una ingesta aguda de un complemento alimentario de arándano rojo rico en proantocianidinas de tipo A (Urell®). Las muestras de orina se recogieron en dos periodos de tiempo por día.

***E. coli* uropatógena.** *E. coli* ATCC®53503TM se creció a 37°C O/N en medio líquido TSB y se diluyó hasta un tamaño de inóculo de 10⁸ ufc/ml.

Células T24. Se empleó la línea celular ATCC®HTB-4TM de epitelio de vejiga humana. Las células se crecieron y mantuvieron en medio McCoy's 5A suplementado con 10% FBS, en una atmósfera de 5% CO₂ y 37°C. Para la realización del ensayo de adherencia las células se sembraron a una concentración de 5.10⁵ células/ml en placas M24.

Ensayo de adherencia. El cultivo de *E. coli* (10⁸ UFC/ml) se incubó con el mismo volumen de extracto compuesto fenólico u orina durante 1 h a 37°C en agitación. Posteriormente, se lavó la monocapa celular con PBS y se cubrió con la solución de UPEC y compuesto fenólico o con solución de PBS (control). Tras 1 h de incubación a 37°C y 5% CO₂, se procedió al lavado de la monocapa celular con PBS para eliminar las bacterias no adheridas y se despegaron las células con tripsina-EDTA al 0,05%. Finalmente se llevó a cabo el recuento bacteriano mediante diluciones seriadas en solución salina 0,9% en placas de TSA, que se incubaron O/N a 37°C.

Ensayo de actividad antimicrobiana. Se llevó a cabo siguiendo el método de García-Ruiz y col. (2011).

Ensayo de citotoxicidad. Se llevó a cabo empleando el método colorimétrico del MTT (Mossmann, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos y extractos fenólicos. Los resultados obtenidos muestran un marcado aumento de la inhibición de la adherencia de UPEC tras la incubación de éstas con proantocianidinas A2 (PACs), alcanzando una inhibición significativa ($p < 0,05$) del 51,3% a la concentración de 500 μM . Sin embargo, no se ha observado disminución de la adherencia bacteriana en el caso de las proantocianidinas B2 o (-)-epicatequina. Esto concuerda con los datos que encontramos en la bibliografía, donde esta capacidad inhibitoria de la adherencia se atribuye exclusivamente a las PACs, debido a los dobles enlaces moleculares que presentan (Howell y col., 2010).

En el caso de los fenoles simples, el 1,2-dihidroxibenceno (catecol/pirocatecol) presenta un efecto inhibitorio de la adherencia estadísticamente significativo en todas las concentraciones ensayadas. Los ácidos benzoicos (benzoico, vainillínico y 3,4-dihidroxifenilacético) muestran patrones de inhibición de la adherencia similares, alcanzando valores superiores al 29%. Al contrario, otros ácidos benzoicos como el gálico, fenilacético y 3-(3-hidroxifenil)-propiónico muestran un efecto inhibitorio dosis-dependiente, siendo estadísticamente significativo a 500 μM . Estos resultados confirman el potencial de estos metabolitos fenólicos, en algunos casos igual o incluso mayor que el de las PACs, en la profilaxis frente a las ITUs. Es de esperar que los conjugados de estos ácidos, que se encuentran en la orina, posean también actividad inhibitoria de la adherencia frente a UPECs.

El resto de metabolitos no presentaron efecto inhibitorio significativo. Esto es posiblemente debido a que la actividad inhibitoria de los metabolitos depende del grado de biodisponibilidad, condicionado a su vez por el grado de polimerización y estructura.

En el caso de los extractos de arándano rojo y pepita de uva, no se observó actividad inhibitoria de la adherencia significativa, hecho previamente observado por Stapleton y col. (2012). Estos resultados sugieren que la actividad inhibitoria de la adherencia de los metabolitos fenólicos es mayor que la de sus precursores.

Ninguno de los compuestos ni extractos fenólicos ensayados presentaron actividad citotóxica ni antimicrobiana a las concentraciones ensayadas.

Orinas humanas. En el caso de las orinas humanas tampoco se observó actividad antimicrobiana frente a *E. coli*. Respecto a la capacidad para inhibir la adherencia de UPEC, se observaron grandes diferencias interindividuales (Figura 1), lo que concuerda con los datos de la

bibliografía (Stapleton y col., 2012). Exclusivamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en presencia de la orina tras la ingesta del arándano rojo respecto de la orina control en un caso. Debido a los amplios intervalos de confianza interindividuales, no puede excluirse un efecto protector frente a las ITUs.

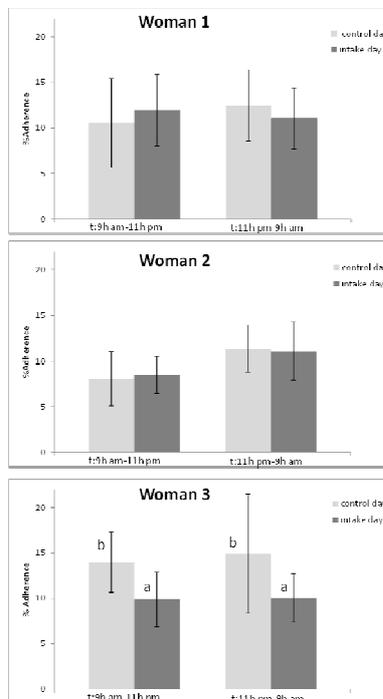


Figura 1: Efecto de las orinas humanas, recogidas antes y después de la ingesta de arándano rojo, sobre la adherencia de *E. coli* ATCC®53502™ en células T24.

BIBLIOGRAFÍA

- García-Ruiz A., Moreno-Arribas M.V., Martín Álvarez P.J., Bartolomé B. 2011, Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 145:426-31.
- Hilbert D.W., Pascal K.E., Libby E.K., Mordechai E., Adelson M.E., Trama J.P. 2008, Uropathogenic *Escherichia coli* dominantly suppress the innate immune response of bladder epithelial cells by a lipopolysaccharide- and Toll-like receptor 4-independent pathway. *Microbes Infect.*, 10:114-121.
- Howell A.B., Botto H., Combesure C., Blanc-Potard A., Gausa L., Matsumoto T., Tenke P., Sotto A., Lavigne J. 2010, Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study. *BMC Infect. Dis.*, 10:94.
- Mosmann T. 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method.*, 65:55-63.
- Stapleton A.E., Dziura J., Hooton T.M., Cox M.E., Yarova-Yarova Y., Chen S. 2012, Recurrent urinary tract infection and urinary *Escherichia coli* in women ingesting cranberry juice daily: a randomized controlled trial. *Mayo Clin. Proc.*, 87:143-50.

Evaluación de la degradación de aminas biógenas por un extracto enzimático de *Penicillium citrinum* CIAL 274,760 en vinos a escala piloto de bodega

Irene Gil-Sánchez, Carolina Cueva, Begoña Bartolomé y M. Victoria Moreno-Arribas

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, CEI UAM+CSIC, C/ Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, España, victoria.moreno@csic.es

El vino, como otros productos de origen fermentativo, no está exento de riesgos y contaminaciones de origen microbiano. Entre ellos, la presencia de elevadas concentraciones de aminas biógenas es uno de los aspectos de mayor preocupación desde el punto de vista de la seguridad y calidad sanitaria de los vinos. En concentraciones elevadas, las aminas biógenas pueden ocasionar efectos adversos en personas sensibles, y además constituyen un problema durante las transacciones comerciales de los vinos a determinados países. Este estudio se centra en una nueva alternativa para eliminar las aminas biógenas una vez formadas en el vino, basada en la adición de extractos enzimáticos obtenidos de hongos aislados del viñedo, con capacidad de degradar las principales aminas biógenas (histamina, tiramina y putrescina) presentes en los vinos. El principal objetivo del estudio residió en optimizar la eficacia y especificidad del proceso para su posterior aplicación a escala industrial. Para ello, se utilizó un vino tinto en su etapa de elaboración, en concreto, después de la fermentación maloláctica, y tres extractos enzimáticos procedentes de la cepa de *Penicillium citrinum* CIAL 274,760 (CECT 20782), cuya actividad enzimática se indujo por crecimiento del hongo en un medio mínimo en presencia de histamina, tiramina y putrescina, respectivamente, de acuerdo con el procedimiento desarrollado en la patente PCT/S2012/070694. El extracto enzimático que mejores resultados proporcionó fue el obtenido por incubación del hongo en presencia de putrescina. El empleo de este extracto en un ensayo piloto en bodega permitió degradar un 21,5 % de la putrescina, un 16 % de la histamina, y un 10% de la tiramina presentes en el vino, sin que se observaran cambios significativos en la composición química del vino, en lo que se refiere a compuestos del aroma y polifenoles. Por otro lado, el estudio toxicológico de los extractos fúngicos confirmó la ausencia de la micotoxina ocratoxina A.

INTRODUCCIÓN

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, que se forman durante los procesos metabólicos de algunos microorganismos.

Estos compuestos se encuentran en la mayoría de los alimentos fermentados. En el caso del vino se han descrito hasta un total de 25 aminas diferentes, presentes desde niveles traza hasta valores de 130 mg/L. En concentraciones elevadas, algunas aminas biógenas como la histamina o tiramina, producen efectos adversos en individuos sensibles, y además, su presencia implica barreras en la exportación de vino a algunos países. Debido a estos motivos, las bodegas buscan soluciones eficaces para eliminar estos compuestos del vino.

Estudios previos han evidenciado la eficacia de extractos enzimáticos procedentes de hongos aislados de la vid (Cueva y col., 2011), lo que permitió el desarrollo de un procedimiento basado en el empleo de extractos enzimáticos de la cepa *Penicillium citrinum* CIAL-247,470 con capacidad para degradar aminas biógenas en vinos a escala de laboratorio (Patente PCT/S20127070694). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la aptitud tecnológica de los extractos enzimáticos de *P. citrinum* CIAL-247,470, para degradar las aminas biógenas histamina,

tiramina y putrescina, en vinos durante su elaboración industrial a escala de bodega.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizó un vino tinto joven de la variedad Tempranillo, y tres extractos enzimáticos procedentes de *P. citrinum* CIAL-247,470 cuya actividad enzimática se indujo mediante el crecimiento del hongo en un medio mínimo (Yeast Carbon Base) en presencia de histamina, tiramina y putrescina (extractos A, B y C respectivamente), de acuerdo con el procedimiento desarrollado en la Patente PCT/S20127070694. Se optimizaron las principales variables para la aplicación de los extractos a las condiciones propias de la bodega, estableciéndose una temperatura de incubación de 16°C, un tiempo de incubación de 42 h., supresión de HCl, y mínima relación volumen extracto enzimático/vino (1:9, v/v).

La determinación de aminas biógenas de los vinos tratados con los extractos enzimáticos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) (Marcobal y col., 2005).

La determinación de la ocratoxina A (OTA) de los extractos enzimáticos se llevó a cabo según el método de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV-MA-AS315-10). El análisis de los compuestos fenólicos, en el vino tratado, se llevó a cabo mediante UPLC-DAD-ESI-TQ MS, según el método descrito por Sánchez Patán y col. (2011). Por último, el análisis de los compuestos volátiles

se llevó a cabo mediante la técnica de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza acoplada (HS-SPME-GC-MS), según el método descrito por Rodríguez-Bencomo y col. (2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se comprobó que los extractos obtenidos por crecimiento de *P. citrinum* CIAL-247,470 en presencia de histamina, tiramina y putrescina, presentaban capacidad enzimática para degradar dichas aminas, con independencia de la amina utilizada para inducir la actividad enzimática.

El siguiente paso fue analizar la presencia de la ocratoxina A en los extractos enzimáticos, para determinar si en las condiciones de obtención del extracto, el metabolismo del hongo podría derivarse hacia la producción de esta micotoxina. Los resultados mostraron ausencia total de ocratoxina A en todos los extractos enzimáticos.

Una vez confirmada la capacidad de los extractos fúngicos para degradar las aminas biógenas en medios de cultivo y la inocuidad de los mismos, se comprobó la eficacia de los extractos enzimáticos en el vino de estudio, de acuerdo a las especificaciones técnicas de la Patente PCT/S20127070694; es decir, tras incubar el vino con el extracto a 35°C durante 18 h., y detener la reacción con ácido clorhídrico (HCl) 1M. Los resultados obtenidos mostraron que los tres extractos fúngicos degradaban las tres aminas biógenas presentes en el vino, aunque los porcentajes variaban en función de la amina utilizada para inducir los extractos, siendo el extracto C el más eficaz. A continuación, se procedió a optimizar algunas de las condiciones de aplicación de los extractos enzimáticos al vino de estudio, con el fin de mejorar la eficacia tecnológica del proceso a escala de bodega.

Las nuevas condiciones a ensayar fueron: supresión de la adición de HCl, temperatura de incubación próxima a la de la bodega (16°C) y mayor tiempo de incubación (48h). En dichas condiciones, de nuevo, el extracto C (obtenido por inducción de putrescina) obtuvo los mejores resultados, siendo capaz de degradar el 68% de putrescina, el 52% histamina y 42% de tiramina.

El último de los parámetros optimizados fue la relación volumen extracto enzimático/vino. En todos los ensayos anteriores la proporción utilizada, de acuerdo a la patente, fue 1:2 (v/v) (extracto/vino), pero teniendo en cuenta que en el sector enológico el empleo de esta proporción es inviable, se procedió a optimizar la mezcla en una proporción 1:9 (v/v). El ensayo se realizó solo con el extracto C (Figura 1).

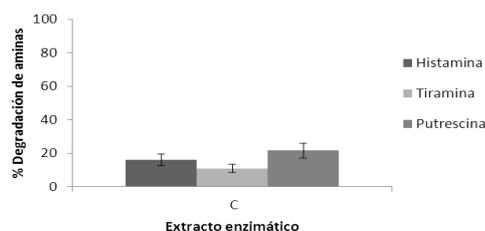


Figura 1: Porcentaje de degradación de las aminas biógenas en vino tinto tratado con el extracto enzimático inducido con putrescina (C) a 16°C durante 42 horas de incubación.

Como era de esperar, al disminuir el volumen del extracto descendió el porcentaje de degradación de las aminas biógenas. En las condiciones ensayadas el porcentaje de eliminación de la putrescina fue del 21.5%, el de la histamina del 16%, y por último, la tiramina se degradó un 10%. Cabe destacar que el descenso que se observa es proporcional a la disminución del volumen de extracto utilizado.

Por último, antes de poder aplicar los extractos a escala industrial, se comprobó que la adición de los mismos no producía modificaciones en la composición y características del vino. Con esta finalidad, se analizó la composición fenólica y volátil del vino tratado con los extractos enzimáticos en las condiciones optimizadas, y los resultados mostraron que la adición de los extractos enzimáticos no suponía grandes variaciones en la composición del vino que dieran lugar a cambios evidentes en su calidad organoléptica.

BIBLIOGRAFÍA

- Cueva, C., García- Ruíz, A., González-Rompinelli, E., Bartolome, B., Martín-Álvarez, P.J., Salazar, O., Vicente, M.F., Bills, G.F., Moreno-Arribas, M.V. 2012, Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potencial use in winemaking. *J. Appl. Microbiol.*, 112:672-682.
- Marcobal, A., Polo, M.c., Martínez-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V. 2005, Biogenic amines content of red Spanish wines: Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wine. *Food Res. Int.*, 38:387-394.
- Patente PCT/S2012/070694. Moreno-Arribas, M.V., Cueva, C., Bartolomé, B., García-Ruíz, A., González-Rompinelli, E., Martín-Álvarez, P.J., Salazar, O., Vicente, M.F.; Bills, G.F. 2012. Extractos enzimáticos de hongos de la vid que degradan aminas biógenas en vinos. Oficina española de patentes y marcas.
- Rodríguez-Bencomo, J.J., Muñoz-González, C., Andújar-Ortiz, I., Martín-Álvarez, P., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.A. 2011, Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *J. Sci. Food Agric.*, 91:2484-2494.
- Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé, B. 2011, Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *J. Agric. Food Chem.*, 59:2241-2247.

Efecto de la radiación UV-A y UV-B en *Aspergillus* aislados de viñedos españoles

Esther García-Cela, Antonio José Ramos, Vicente Sanchís y Sonia Marín

Applied Mycology Unit, Food Technology Department, University of Lleida, UTPV-XaRTA, Agrotecnio Center, Av. Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain. vsanchis@tecal.udl.cat

La radiación recibida en los diferentes países europeos promediada para el período 1983-2005 muestra elevados valores de irradiación en la cuenca Mediterránea. Un posible incremento de la radiación UV podría promover la presencia de micotoxinas en cultivos, afectando a la seguridad alimentaria. El propósito de este trabajo fue estudiar los posibles efectos derivados de la exposición a elevada radiación ambiental UV-A ($1,7 \pm 0,1$ mW/cm²) y UV-B ($0,1 \pm 0,1$ mW/cm²) por separado *in vitro* en la supervivencia de conidios de seis especies de *Aspergillus* sección *Circumdati*, sección *Flavi* y sección *Nigri*. También se evaluó el efecto en el desarrollo fúngico y en la capacidad productiva de ocratoxina A (OTA) de *A. carbonarius*. Durante la incubación, la viabilidad de los conidios disminuyó a lo largo del tiempo, más significativamente cuando se incluyeron periodos de radiación UV. Conidios con pigmentación más oscura fueron más resistentes a ambas radiaciones. En *A. carbonarius*, las radiaciones UV-A y UV-B redujeron el diámetro de la colonia un 16,8-35,3 %, la biomasa fúngica seca un 53,3-77,2 % y la acumulación de OTA un 81,9-97,0 %.

INTRODUCCIÓN

La radiación recibida en los diferentes países europeos promediada para el período 1983-2005 muestra elevados valores de irradiación en la cuenca Mediterránea. Específicamente, España es el país europeo que recibe, en promedio, la mayor cantidad de radiación sobre una superficie horizontal, y que muestra los mayores contrastes, gradientes radiativos y complejidad en la distribución de dicha energía (AEMET, 2012). El Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) ha señalado que las variaciones en la radiación UV-B pueden tener relevantes consecuencias en las interacciones de las plantas con plagas y enfermedades, afectando a la seguridad y a la calidad de los alimentos (WMO, 2010).

La infección fúngica de los cultivos puede derivar en podredumbres así como en la posible acumulación de micotoxinas en los alimentos. Se ha sugerido que la producción de aflatoxinas puede constituir una estrategia de los mohos para prevenir daños ocasionados por la radiación UV (Cary y Ehrlich, 2006). De confirmarse esta afirmación un posible incremento de la radiación UV podría promover la presencia de micotoxinas en cultivos, afectando a la seguridad alimentaria.

El propósito de este trabajo, fue estudiar los posibles efectos derivados de la exposición a elevada radiación ambiental UV-A ($1,7 \pm 0,1$ mW/cm²) y UV-B ($0,1 \pm 0,1$ mW/cm²), por separado, en la supervivencia de conidios de dos aislados de seis especies de *Aspergillus* sección *Circumdati* (*A. westerdijkiae* y *A. ochraceus*), sección *Flavi* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) y sección *Nigri* (*A. carbonarius* y *A.*

tubingensis), así como en el desarrollo miceliar y en la capacidad productora de ocratoxina A (OTA) de tres aislados de *A. carbonarius*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Supervivencia de conidios. Para el estudio de supervivencia, se prepararon suspensiones de conidios (10^6 conidios/mL) de cada aislado en Tween-80[®] (0,05% p/v). Alícuotas (5 mL) de estas suspensiones fueron filtradas a vacío a través de membranas estériles de acetato de celulosa (0,45 μ m, \varnothing 25 mm) que retenían los conidios, y posteriormente depositadas en placas Petri (\varnothing 50 cm) que se incubaron durante una noche a 37 °C para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente fueron incubadas durante 15 días en las condiciones descritas en la figura 1. Cada 5 días (5°, 10° y 15°) dos membranas irradiadas y dos no irradiadas fueron sumergidas en 100 mL de peptona salina (0,1% p/v) y agitadas durante 90 s en un homogeneizador. Seguidamente se sembraron diluciones seriadas en DRBC y se incubaron a 25 °C. Transcurridos dos días se procedió a hacer el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Desarrollo fúngico y producción de OTA. Para el estudio del desarrollo fúngico y producción de OTA, se prepararon suspensiones de conidios (10^5 conidios/mL) de cada aislado de *A. carbonarius* y se inocularon 5 μ L centralmente en medio sintético de uva. Transcurridos 7 días de incubación bajo luz UV se cuantificó el crecimiento fúngico (diámetro de colonia y biomasa fúngica), así como la producción de OTA mediante HPLC. Los conidios/micelios irradiados y no irradiados se incubaron en paralelo en las mismas condiciones en dos incubadoras refrigeradas (Mettmert ICP-600, Reino Unido) (Figura 1).

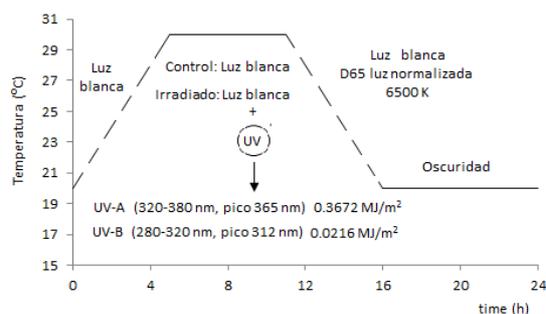


Figura 1: Condiciones diarias de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia de conidios

En este trabajo se ha evaluado la tolerancia a la radiación UV de los conidios pertenecientes a aislados de tres secciones de *Aspergillus*: sección *Circumdati* (pigmentada principalmente de amarillo), sección *Flavi* (verde) y sección *Nigri* (negro). Durante la incubación la viabilidad de los conidios disminuyó a lo largo del tiempo, aumentando significativamente cuando se incluyeron periodos de radiación UV (Figura 2). Los conidios con la coloración más clara (amarilla), mostraron una relevante pérdida de viabilidad tanto si se irradiaban como si no. De hecho, transcurridos 5 días de incubación, cuando no existían diferencias significativas comparadas con el primer día en los controles, se apreciaron diferencias significativas debido a la radiación en la sección *Circumdati* bajo ambas radiaciones ensayadas, mientras que en las secciones *Nigri* y *Flavi* se observaron pérdidas significativas de viabilidad de los conidios después de 10-15 días. Asimismo, se observaron diferencias interespecíficas dentro de las secciones, siendo *A. parasiticus* más sensible que *A. flavus* a la radiación UV-A y B, y *A. tubingensis* más sensible que *A. carbonarius* a la radiación UV-B. Estas diferencias pueden ser debidas a los diferentes grosores de las paredes de los conidios. El efecto de la radiación UV-A y UV-B no se comparó ya que se aplicaron diferentes niveles de intensidad. Sin embargo, aunque la dosis de UV-B aplicada fue inferior se observaron niveles comparables de supervivencia, lo que evidencia que ésta radiación es más perjudicial, seguramente debido a su longitud de onda más corta.

Desarrollo fúngico y producción de OTA.

Transcurridos 7 días, las radiaciones UV-A y UV-B inhibieron el incremento en diámetro de la colonia un 16,8-35,3 %, la biomasa fúngica seca un 53,3-77,2 % y la acumulación de OTA un 81,9-97,0 %. Además se observó una inhibición significativa de la capacidad micotoxigénica. Si bien ambas radiaciones afectaron al crecimiento fúngico y a la apariencia de la colonia, la radiación UV-B alteró notablemente la morfología

mostrando una zona central esporulada más compacta que el resto de la colonia, caracterizada por hifas largas y carentes de conidióforos. Solo se observaron diferencias significativas en la densidad de la colonia en colonias irradiadas bajo luz UV-B.

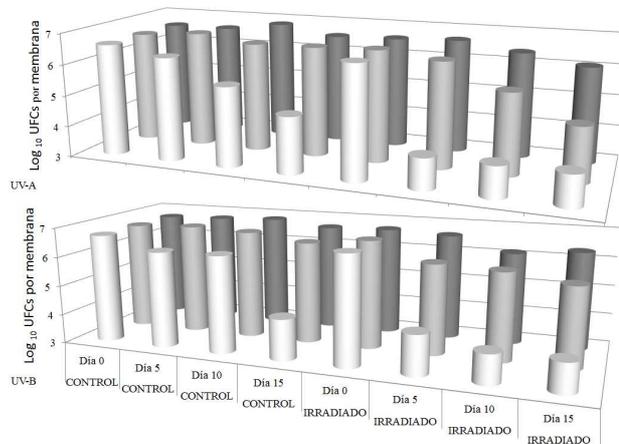


Figura 2: Supervivencia media de los conidios agrupados por secciones a lo largo del tiempo: *Nigri* ●, *Flavi* ○ y *Circumdati* ○

Los resultados obtenidos en laboratorio muestran que un incremento en la radiación UV en campo puede conducir a una reducción en los niveles de OTA en los productos vegetales, aunque hay que destacar que la degradación de las micotoxinas a otros metabolitos debido a la radiación UV no ha sido considerada en este estudio. No obstante, la supervivencia de los conidios bajo luz UV y, por tanto, la presencia de hongos *per se*, representa un riesgo importante, porque pueden darse condiciones favorables para la producción de toxinas en etapas posteriores a la cosecha.

BIBLIOGRAFÍA

- AEMET, 2012, Agencia Española de Meteorología. Atlas de radiación solar en España utilizando datos del SAF de clima de EUMETSAT. Agencia Estatal de Meteorología. http://www.aemet.es/documentos/es/serviciosclimaticos/datos_climatologicos/atlas_radiacion_solar/atlas_de_radiacion_2404_2012.pdf Consulted 03/2013
- Cary, J.W., Ehrlich, K.C., 2006, Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: Molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathol.*, 162:167-177.
- WMO, 2010, World Meteorological Organization, Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2010, Global Ozone Research and Monitoring Project-Report No. 52, 516 pp., Geneva, Switzerland.

Agradecimientos. Gobierno español, proyecto AGL2010-22182-C04-01. Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya (AGAUR) y European Social Fund for the financial support.

Resistencia a biocidas y antibióticos en cepas procedentes de alimentos ecológicos adaptadas a crecimiento en presencia de triclosan

Elena Ortega, Rebeca Gadea, Miguel Ángel Fernández-Fuentes, Rubén Pérez Pulido y Antonio Gálvez

Área de Microbiología, Universidad de Jaén, España, eortega@ujaen.es

El tratamiento repetido con biocidas en la industria alimentaria puede seleccionar la implantación de cepas tolerantes a los mismos e incluso incrementar la incidencia de cepas resistentes a antibióticos clínicamente relevantes. En el presente estudio se ha adaptado a crecimiento una colección de bacterias aisladas de alimentos ecológicos en presencia de concentraciones crecientes de triclosan. Seguidamente se ha determinado su co-resistencia a otros biocidas, así como a antibióticos de uso clínico. De 76 cepas sensibles a este biocida incluidas en el estudio, un total de 39 (51,3%) se adaptaron a crecimiento en concentraciones crecientes de triclosan. De entre los biocidas ensayados, la mayor tolerancia tras la presión selectiva inducida por la presencia de triclosan se obtuvo para la clorhexidina (87%), seguida de cloruro de benzalconio y hexaclorofeno. En cuanto a los antibióticos, 21 cepas vieron incrementada su resistencia a sulfametoxazol, 18 a ampicilina o a ceftazidima, 15 a cefotaxima, 5 a la combinación sulfametoxazol/trimetoprim y 2 cepas a ácido nalidíxico.

INTRODUCCIÓN

Los biocidas juegan un papel fundamental en el control de microorganismos potencialmente patógenos, pero 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, incluso incrementar la incidencia de cepas resistentes a antibióticos clínicamente relevantes (Capita y col., 2013). En este contexto no se conoce aún qué tipo de alimentos pueden representar un mayor riesgo, siendo los alimentos ecológicos de especial interés no sólo por su valor añadido sino también por sus diferencias en los métodos de producción. Tampoco se conocen las consecuencias del contacto repetido de los microorganismos con los biocidas en cuanto a su tolerancia a otros agentes, a la vez que la resistencia a los antimicrobianos en bacterias transmitidas por los alimentos se reconoce como un importante problema de Salud Pública.

La aplicación de concentraciones inferiores a las recomendadas, unida a la insuficiente limpieza de las superficies antes de la desinfección, puede reducir significativamente la eficacia de los desinfectantes. En tales condiciones, las bacterias están expuestas a concentraciones sub-letales de estos agentes, pudiendo esto conducir a la aparición de resistencias en bacterias inicialmente susceptibles (Davidson y col., 2002).

Los fenoles y cresoles, así como sus derivados clorados, además de actuar sobre diversas dianas celulares pueden inducir una pérdida de compuestos intracelulares bacterianos. Biocidas como el triclosan son ampliamente utilizados para prevenir la contaminación bacteriana en el procesamiento de alimentos y/o en entornos clínicos (McDonnell y col.,

1999; Møretø y col., 2011). A concentraciones bajas, el triclosan inhibe una reductasa dependiente de NADH, pero a concentraciones superiores presenta también efectos sobre la membrana. Estas alteraciones en la estructura y función de la membrana, causadas por algunos biocidas, pueden afectar seriamente a la tolerancia de estas bacterias frente a otros antimicrobianos, incluidos los antibióticos.

En el presente estudio se ha adaptado a crecimiento en concentraciones crecientes de triclosan una colección de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas aisladas de alimentos ecológicos. Seguidamente se ha determinado su co-resistencia a otros biocidas, así como a antibióticos de uso clínico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados bacterianos y condiciones de crecimiento. Se seleccionaron un total de 76 aislados bacterianos sensibles a triclosan, procedentes de alimentos ecológicos y pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium* y *Pantoea*.

Las cepas se conservaron a -80°C en caldo BHI (Scharlab, Barcelona, España) adicionado de un 20% de glicerol. Para la preparación de inóculos, las cepas se incubaron durante 15 h en caldo BHI a 37°C.

Adaptación a triclosan. Las cepas se adaptaron a crecimiento en presencia de concentraciones crecientes del biocida triclosan de acuerdo con la técnica descrita por To y col. (2002). Las concentraciones finales de biocida empleadas fueron las siguientes: 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 µg/ml, 1, 2, 5 y 10 mg/ml.

Determinación de la sensibilidad a biocidas y antibióticos. Se determinó la sensibilidad a los biocidas triclosan, bromuro de didecildimetilamonio, cetrimida, hexaclorofeno, clorhexidina, cloruro de hexadecilpiridinio y cloruro de benzalconio, y para los antibióticos ampicilina, cefotaxima y ceftazidima, ciprofloxacino, imipenem, la

combinación de trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, ácido nalidíxico (para *Salmonella*), penicilina y oxaciclina. Estos antimicrobianos fueron seleccionados como representantes de los principales grupos de antibióticos empleados en clínica humana.

En cuanto a la resistencia a los antibióticos, las pruebas preliminares se realizaron mediante ensayo en gota sobre placas de Müller-Hinton suplementadas con antibiótico, de acuerdo con las recomendaciones para cada grupo bacteriano del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron por el método de microdilución en placas de microtitulación de 96 pocillos (CLSI, 2012). Para ello, se incubaron a 37°C durante 24 horas diluciones seriadas en medio TSB de los biocidas o los antibióticos objeto de estudio con suspensiones ajustadas a 10⁵ UFC/ml de cultivos estacionarios de las cepas procedentes de alimentos ecológicos. La CMI se consideró la menor concentración del compuesto antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de dichas cepas, determinada por lectura de la densidad óptica a 595 nm en un lector de placas iMark (BioRad, Madrid).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 76 cepas sensibles a triclosan incluidas en el estudio, un total de 39 (un 51,3%) se adaptaron a crecimiento en concentraciones crecientes del biocida, incrementando su concentración CMI entre 2 y 2000 veces respecto a la cepa inicialmente sensible. A continuación se determinó la tolerancia de estas cepas adaptadas frente a otros biocidas y antibióticos clínicamente relevantes. De entre los biocidas ensayados, la mayor tolerancia tras la presión selectiva inducida por el crecimiento en presencia de triclosan se obtuvo para la clorhexidina (un 87% de las cepas adaptadas a crecimiento en presencia de triclosan vieron incrementada su CMI frente a este biocida entre 2 y 18 veces), seguida de cloruro de benzalconio (un 69% de las cepas vieron incrementada su CMI entre 2 y 300 veces) y hexaclorofeno (con un 61% de las cepas que aumentaron su CMI entre 2 y 30 veces). Incrementos notables de las CMI frente a cetrimida, cloruro de didecildimetilamonio y cloruro de hexadecil-piridinio se detectaron también en porcentajes algo menores de las cepas adaptadas a crecimiento en presencia de triclosan.

Respecto a la sensibilidad de estas cepas frente a antibióticos clínicamente relevantes, un total de 21 cepas vieron incrementada su resistencia a sulfametoxazol, 18 a ampicilina o a ceftazidima, 15 a cefotaxima, 5 a sulfametoxazol/trimetoprim y 2 cepas a ácido nalidíxico. Para los antibióticos imipenem, tetraciclina y ciprofloxacino sólo se detectó una cepa en cada caso que vio incrementada su resistencia al agente antimicrobiano tras contacto con triclosan.

Ninguna de las cepas analizadas vio disminuida la resistencia frente a los biocidas ensayados, si bien 10 cepas presentaron CMI menores frente a cefotaxima tras contacto con triclosan, 6 cepas vieron disminuida su resistencia frente a ceftazidima y 5 frente a ampicilina.

La adaptación de cepas sensibles a biocidas al crecimiento en presencia de estos compuestos puede estar mediada por la expresión de genes para bombas de exporte, así como por cambios en las propiedades de la superficie celular, composición de ácidos grasos y cambios morfológicos. Este estudio pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables del desarrollo de resistencias a biocidas, así como si dichos mecanismos pueden conllevar la selección de cepas resistentes a antibióticos de uso clínico habitual. También ayudará a establecer medidas de control sobre el empleo de determinados biocidas a nivel doméstico e industrial y permitirá evaluar mejor los riesgos de transmisión de cepas resistentes a través de la cadena alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013, Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53, 11–48.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 9th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI publication M7-A9.
- Davidson, P.M., Harrison, M.A., 2002, Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technol.*, 56 (11), 69–78.
- McDonnell, G., Russell, R., 1999, Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12 (1), 147–179.
- Møretrø, T., Høiby-Pettersen, G.S., Habimana, O., Heir, E., Langsrud, S., 2011, Assessment of the antibacterial activity of a triclosan-containing cutting board. *Int. J. Food Microbiol.*, 146 (2), 157–162.
- To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W. 2002, Postadaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5258–5264.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía).

Inactivación de microorganismos patógenos en jamón cocido mediante tratamientos combinados de bioconservantes y altas presiones

Margarita Medina, Raquel Montiel e Izaskun Martín-Cabrejas

Dpto. Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, España, mmedina@inia.es

Los productos cárnicos RTE (ready-to-eat) pueden contaminarse con microorganismos patógenos durante su preparación industrial, principalmente durante el loncheado o empaquetado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto individual y combinado de las altas presiones y tres bioconservantes, reuterina (Reu), sistema lactoperoxidasa (LPS) y lactoferrina (LF) sobre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* O157:H7, inoculadas a aprox. 5.1-5.8 log ufc/g en la superficie de jamón cocido conservado a 4 y 10°C durante 35 d. Reu exhibió un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante 7 d a 4°C, así como un potente efecto bactericida sobre *Salmonella* y *E. coli* durante los 35 d de ensayo, tanto en refrigeración a 4°C como en condiciones de abuso de temperatura. LPS en jamón cocido tuvo un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante 7 d a 4°C y un efecto bactericida sobre *Salmonella* y *E. coli* durante 21 y 35 d, respectivamente. La combinación de Reu y LPS con alta presión (450 MPa/5 min) mostró un efecto antimicrobiano sinérgico frente a *L. monocytogenes*, impidiendo su crecimiento durante las 5 semanas de ensayo a 4°C. Estos tratamientos combinados también evitaron el crecimiento de los dos patógenos Gram-negativos ensayados, observándose valores muy bajos tras 35 d a 4 y 10°C.

INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos RTE (ready-to-eat) pueden contaminarse con microorganismos patógenos durante su preparación industrial, principalmente durante el loncheado o empaquetado (Lin y col., 2006; Myers y col., 2013). El jamón cocido, por sus propiedades intrínsecas, permite el crecimiento de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* O157:H7, que pueden suponer un riesgo para la salud de los consumidores si alcanzan dosis infectivas. En los últimos años se ha potenciado el interés por la aplicación combinada de varios sistemas de conservación con el fin de minimizar la presencia de microorganismos patógenos en alimentos RTE. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto individual y combinado de las altas presiones (HP) y 3 bioconservantes, reuterina (Reu), sistema lactoperoxidasa (LPS) y lactoferrina (LF) sobre *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7 inoculadas artificialmente en la superficie de jamón cocido conservado a 4 y 10°C durante 35 d.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se prepararon muestras de 20 g de jamón cocido y se contaminaron con las cepas *L. monocytogenes* INIA 2530, *S. Enteritidis*, CECT 4300, 4396 y 4155, y *E. coli* O157:H7 CECT 4972 a aproximadamente 5.1-5.8 log ufc/g. Se aplicaron tratamientos de Reu purificada (16 mM), LPS (2.8 U/g de LP bovina, 40 µg/g de KSCN y 10 µl de H₂O₂), LF (0.1%), HP (450 MPa/5 min) y tratamientos combinados de HP y Reu, LPS o LF. Las muestras se envasaron a vacío y se mantuvieron 35 d a 4 y 10°C. Los recuentos de *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli*

O157:H7 se realizaron en placas de agar Palcam, *Salmonella Shigella* agar (SSA) y agar Violeta Rojo Bilis (VRBA), respectivamente. El ensayo se realizó por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los recuentos iniciales de *L. monocytogenes* (5.36 log ufc/g) aumentaron 2.25 y 2.45 unidades logarítmicas durante 35 d de refrigeración a 4 y 10°C, respectivamente (Tabla 1). Inicialmente, el tratamiento de HP redujo los niveles de *L. monocytogenes* 1.6 log ufc/g, pero no evitó la recuperación del patógeno durante la refrigeración, que alcanzó valores similares al control tras 35 d a 4 y 10°C. Reu mostró un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante 7 y 1 d a 4 y 10°C, respectivamente. LPS resultó bactericida con reducciones de hasta 2 unidades logarítmicas mientras que LF no inactivó al patógeno. La combinación de Reu y LPS con HP aumentó significativamente ($P < 0.05$) la reducción alcanzada por los tratamientos individuales. Tras 35 d a 4°C, los recuentos de *L. monocytogenes* en jamón cocido tratado con Reu y HP fueron 3.95 unidades logarítmicas inferiores a los observados en las muestras control. Asimismo, la combinación de LPS y HP mantuvo los recuentos inferiores a 2 unidades logarítmicas.

El tratamiento de HP redujo los niveles iniciales de *S. Enteritidis* (5.84 log ufc/g) por debajo del límite de detección (< 1 log) (Tabla 2). Reu y LPS mostraron un efecto bactericida sobre el patógeno durante los 35 d de ensayo a 4 y 10°C. LF no afectó a la supervivencia de *Salmonella*. La combinación de los

antimicrobianos con HP mantuvo los recuentos del patógeno inferiores a 1 unidad logarítmica durante 35 d a 4°C. A 10°C, únicamente la combinación de LPS y HP mantuvo los niveles de *Salmonella* por debajo del límite de detección.

Tabla 1: *L. monocytogenes* (log ufc/g) en jamón cocido tratado con Reu (16 mM), LPS (2.8 U/g), LF (0.1%), HP (450 MPa/5min) y sus combinaciones, mantenido a 4 y 10°C durante 35 d.

		1 d	7 d	21 d	35 d	
4°C	Control	5.30 ^{ca}	6.26 ^{eb}	7.76 ^{dc}	7.61 ^{cc}	
	HP	4.52 ^{ca}	4.84 ^{cdAB}	5.35 ^{cb}	7.49 ^{cc}	
	Reu	5.25 ^{ca}	5.41 ^{deA}	7.50 ^{db}	7.70 ^{cb}	
	HP+Reu	3.51 ^{ba}	3.04 ^{ba}	3.34 ^{ba}	3.66 ^{ba}	
	LPS	3.62 ^{ba}	3.80 ^{bcA}	4.49 ^{bcA}	6.97 ^{cb}	
	HP+LPS	1.88 ^{aa}	1.58 ^{ab}	1.61 ^{aa}	1.33 ^{aa}	
	HP+LF	5.28 ^{ca}	6.26 ^{eb}	8.08 ^{dc}	7.97 ^{cc}	
	HP+LF	4.60 ^{ca}	4.89 ^{da}	4.90 ^{ca}	7.24 ^{cb}	
	10°C	Control	5.77 ^{da}	8.28 ^{deB}	7.81 ^{cb}	7.81 ^{bb}
		HP	4.57 ^{ca}	6.22 ^{cb}	7.59 ^{cc}	7.73 ^{bc}
Reu		5.53 ^{da}	8.15 ^{deB}	7.68 ^{cb}	8.01 ^{bb}	
HP+Reu		3.17 ^{ba}	4.16 ^{aba}	6.27 ^{bb}	7.26 ^{bb}	
LPS		3.05 ^{ba}	4.67 ^{bb}	7.47 ^{cc}	7.72 ^{bc}	
HP+LPS		2.12 ^{aa}	3.40 ^{ab}	3.23 ^{ab}	3.77 ^{ab}	
LF		5.89 ^{da}	8.67 ^{ec}	8.14 ^{cbC}	7.59 ^{bb}	
HP+LF		4.29 ^{ca}	7.06 ^{cb}	8.03 ^{cb}	7.33 ^{bb}	

*Medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente (P<0.05) para una misma temperatura. Medias en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente (P<0.05).

Tabla 2: *S. Enteritidis* (log ufc/g) en jamón cocido tratado con Reu (16 mM), LPS (2.8 U/g), LF (0.1%), HP (450 MPa/5min) y sus combinaciones, mantenido a 4 y 10°C durante 35 d.

		1 d	7 d	21 d	35 d
4°C	Control	5.55 ^{ca}	5.51 ^{ca}	5.32 ^{ca}	5.00 ^{ca}
	HP	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}
	Reu	5.47 ^{cc}	4.64 ^{bb}	4.02 ^{baB}	3.84 ^{ba}
	HP+Reu	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}
	LPS	2.79 ^{bb}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	3.08 ^{bb}
	HP+LPS	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}
	LF	5.55 ^{ca}	5.64 ^{ca}	5.44 ^{ca}	5.04 ^{ca}
	HP+LF	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}
10°C	Control	5.80 ^{da}	5.73 ^{ca}	6.25 ^{ca}	6.07 ^{ba}
	HP	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	1.70 ^{abA}	2.69 ^{abA}
	Reu	5.46 ^{ca}	5.25 ^{ca}	4.67 ^{ca}	4.82 ^{abA}
	HP+Reu	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	1.35 ^{aa}
	LPS	3.02 ^{ba}	4.00 ^{ba}	3.90 ^{bcA}	2.30 ^{abA}
	HP+LPS	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}
	LF	5.76 ^{cdA}	5.67 ^{ca}	6.02 ^{ca}	6.10 ^{ba}
	HP+LF	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	1.70 ^{abA}	2.27 ^{abA}

*Medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente (P<0.05) para una misma temperatura. Medias en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente (P<0.05).

Los recuentos iniciales de *E. coli* O157:H7 (5.13 log ufc/g) se redujeron más de 4 unidades logarítmicas con el tratamiento de HP (Tabla 3). La aplicación individual de Reu y LPS mostró un efecto bactericida sobre *E. coli* durante los 35 d de ensayo a 4 y 10°C, mientras que LF no afectó significativamente a la supervivencia del patógeno. Todos los tratamientos combinados mantuvieron los recuentos inferiores a 1 log ufc/g durante 35 d a 4°C. A 10°C, esta reducción sólo se consiguió con la combinación de Reu y LPS con HP.

Tabla 3: *E. coli* O157:H7 (log ufc/g) en jamón cocido tratado con Reu (16 mM), LPS (2.8 U/g), LF (0.1%), HP (450 MPa/5min) y sus combinaciones, mantenido a 4 y 10°C durante 35 d.

		1 d	7 d	21 d	35 d	
4°C	Control	5.01 ^{ba}	5.25 ^{ca}	5.17 ^{ca}	4.98 ^{ca}	
	HP	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	
	Reu	4.39 ^{bc}	3.78 ^{bb}	3.42 ^{baB}	3.28 ^{ba}	
	HP+Reu	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	
	LPS	1.27 ^{aA}	1.24 ^{aA}	< 1 ^{aA}	1.39 ^{aA}	
	HP+LPS	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	
	LF	4.74 ^{baB}	5.53 ^{cc}	5.32 ^{cbC}	4.62 ^{ca}	
	HP+LF	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	
	10°C	Control	6.25 ^{cb}	5.84 ^{baB}	5.70 ^{caB}	5.05 ^{ca}
		HP	< 1 ^{aA}	1.45 ^{aA}	1.50 ^{aA}	2.42 ^{ba}
Reu		4.69 ^{ba}	4.88 ^{ba}	5.32 ^{ca}	4.68 ^{ca}	
HP+Reu		< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	
LPS		1.45 ^{aA}	1.70 ^{aA}	1.15 ^{aA}	< 1 ^{aA}	
HP+LPS		< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	< 1 ^{aA}	
LF		5.86 ^{ca}	6.19 ^{ba}	6.01 ^{ca}	5.44 ^{ca}	
HP+LF		< 1 ^{aA}	1.30 ^{aA}	3.45 ^{bb}	2.35 ^{abB}	

*Medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente (P<0.05) para una misma temperatura. Medias en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente (P<0.05).

El empleo de HP junto con otros métodos de conservación puede proporcionar mayor protección que los tratamientos individuales frente a los microorganismos patógenos y evitar su recuperación durante la refrigeración de los alimentos RTE. Reu en combinación con HP inactivó el desarrollo de *L. monocytogenes* en salmón ahumado durante 35 d a 4°C (Montiel y col., 2014). La combinación de HP y LPS ha mostrado mayor eficacia en la inactivación de microorganismos patógenos (García-Graells y col., 2003) que la combinación de HP con lisozima, nisina u otras bacteriocinas. En el presente trabajo, los tratamientos combinados de Reu y LPS con HP inactivaron el crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón cocido durante 35 d a 4°C. Asimismo, estos tratamientos evitaron el desarrollo de *S. Enteritidis* y *E. coli* O157:H7, observándose valores inferiores a 1.5 log ufc/g tras 35 d a 4 y 10°C.

BIBLIOGRAFÍA

- García-Graells, C., Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C. M., Michiels, C. W. 2003, The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of food-borne bacteria. *Int J Food Microbiol*, 81, 211–221.
- Lin, C. M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C. B., Meyer, J. D., Hall, P. A., et al. 2006, Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*, 69, 71–79.
- Myers, K., Montoya, D., Cannon, J., Dickson, J., Sebrank, J. 2013, The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. *Meat Sci*, 93, 263–268.
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Gaya, P., Medina, M. 2014, Reuterin and high hydrostatic pressure treatments on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and effect on the characteristics of cold-smoked salmon. *Food Bioprocess Technol*. DOI 10.1007/s11947-014-1287-9.

Comportamiento de las esporas de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina

M^a del Camino García, Rosa Ana Menéndez, Eugenia Rendueles y José Javier Sanz

ICTAL, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España, mc.garcia@unileon.es

El objetivo del presente ensayo fue evaluar el comportamiento y la supervivencia de las esporas de *Clostridium sporogenes*, considerado como un microorganismo homólogo no toxigénico de *Clostridium botulinum*, al simular una contaminación de las materias primas durante el proceso de elaboración de la cecina. Para ello fueron inoculadas cinco babillas con dos concentraciones iniciales distintas, 10^2 esporas/g y 10^5 esporas/g, de la cepa 892 CECT de *Clostridium sporogenes*. Posteriormente se siguieron las especificaciones establecidas por la IGP “Cecina de León” para el proceso de elaboración de las cecinas. Fueron evaluados siete puntos de muestreo a lo largo de todo el proceso, en los cuales se realizaron análisis microbiológicos por técnicas clásicas para la detección de *Clostridium sporogenes* en medio TPGY, identificaciones de las colonias por la técnica de PCR y valoraciones del pH y la actividad de agua en cada punto. Los resultados obtenidos indican que en la fase de asentamiento se produjo un momento crítico en el cual fue observada la mayor disminución del número de esporas viables. También se observaron diferencias en cuanto a los recuentos obtenidos para las dos concentraciones de esporas, pues para una concentración de partida baja no fueron recuperadas esporas viables a partir de la fase de asentamiento, cuando se partió de 10^5 esporas/g, solo en el último muestreo no se obtuvieron recuentos. Basándonos en estas observaciones concluimos que la contaminación inicial de las piezas de babilla con esporas de *Clostridium sporogenes* es controlada, especialmente durante la fase de asentamiento, por la condiciones propias del proceso de elaboración, no recuperándose células viables del microorganismo inoculado al final de siete meses de elaboración.

INTRODUCCIÓN

La cecina es una salazón cárnica, ahumada y curada, del despiece de los cuartos traseros del ganado vacuno mayor (BOE, 1994). El objetivo del presente ensayo fue evaluar el comportamiento y la supervivencia de esporas de *Clostridium sporogenes*, considerado como un microorganismo homólogo no toxigénico de *Clostridium botulinum*, al simular una contaminación de la materia prima durante el proceso de elaboración de la cecina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente experimental fueron empleadas cinco babillas (B), las cuales fueron previamente analizadas para conocer su calidad microbiológica y sus características iniciales de pH y actividad de agua. Dichas babillas fueron inoculadas con esporas de *Clostridium sporogenes* de la cepa 892 de la CECT. Para la obtención de una elevada concentración de esporas se utilizó el procedimiento establecido por Mah y col. (2008).

En el proceso de elaboración de las cecinas fueron seguidos los pasos establecidos por la IGP “Cecina de León” (BOE, 1994). Las inoculaciones fueron realizadas en pequeños cortes que se realizaron en el lado izquierdo de la cara anterior de cada babilla con concentración final 10^2 esporas/g y en el lado derecho con una concentración final de 10^5 esporas/g. Fueron utilizadas dos concentraciones distintas de esporas con el fin de conocer la evolución de las mismas cuando la contaminación inicial es baja, que sería la condición más probable (Hyytiä y col., 1999), y

cuando se simula una contaminación inicial elevada (Bell y col., 2005). Tras la inoculación fueron tomadas las muestras correspondientes al tiempo cero de análisis. Posteriormente se procedió al salado de las piezas cárnicas mediante frotamiento con una mezcla 1/1 de sal marina y preparado “Parkers jam” (sal, azúcar, nitrato potásico, nitrito potásico y ácido ascórbico). Los otros tiempos en los que los análisis microbiológicos fueron realizados quedan recogidos en la Tabla 1. Dos de las cecinas fueron ahumadas (B1 y B3) y las otras tres no.

Tabla 1: Condiciones del proceso de elaboración de la cecina (BOE, 1994).

ETAPA DE LA ELABORACIÓN	CONDICIONES	PUNTOS DE MUESTREO
Perfilado		t_0
Salado	2,5 días, 1°C, 85 % HR	
Lavado		t_1
Asentamiento	40 días, 7 °C, 78 % HR	t_2 a 20 días, t_3 a 40 días
Ahumado	14 días, 12 °C, 80 % HR	t_4 final de ahumado
Secado	5 meses, disminuyendo temperatura 7 °C a 12 °C 75 % HR	t_5 mitad secado t_6 final secado

Los análisis microbiológicos de cada punto de muestreo consistieron en la toma de la muestra de un punto de inoculación, de aproximadamente 10 g, para la que se calculó el volumen correspondiente de caldo TPGY (50 g de triptona, 5 g de peptona, 4 g de dextrosa, 20 g de extracto de levadura y 1 g de tioglicolato sódico) con el que fue homogeneizada. Diluciones decimales de cada homogeneizado fueron sembradas por duplicado en TPGY

agar, y las placas fueron incubadas en jarras de anaerobiosis a 30 °C durante 3 días. En cada punto de muestreo también fueron realizadas mediciones del pH de cada una de las cecinas y de la actividad de agua de la cecina considerada como reserva (B2).

Ante los cambios en la morfología de las colonias en los últimos puntos de muestreo, fueron realizados análisis mediante la técnica de PCR para confirmar su pertenencia a la especie *Clostridium sporogenes*, mediante cebadores y protocolo de Le Bourhis y col. (2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la evolución del pH durante el proceso de elaboración quedan recogidos en la figura 1. La actividad de agua de la cecina reserva presentó la siguiente evolución: 0.947, 0.966, 0.957, 0.961, 0.942 y 0.930. Los resultados de la evolución de los inóculos con distintas concentraciones de esporas de *Clostridium sporogenes* quedan recogidos en las figuras 2 y 3.

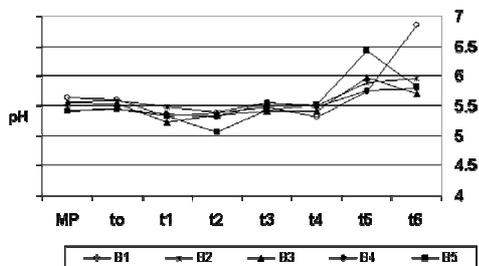


Figura 1: Evolución pH durante proceso de elaboración de las cecinas. B, babilla; MP, materia prima

En los resultados de la evolución del pH podemos observar que éste permanece estable durante todo el proceso de elaboración, con un ligero incremento al final. En el caso de las babillas 1 y 5 podemos observar incrementos anormales que se corresponden con ligeras alteraciones de las mismas, ya que la babilla 1 dio muestras de putrefacción y la babilla 5 se presentó contaminación con ácaros.

Por lo que respecta a la evolución de los inóculos, podemos observar que hay un punto crítico durante la fase de asentamiento en el cual se produce el mayor descenso en el número de esporas viables para ambas concentraciones de inóculo. Nuevamente se observa que en las cecinas que sufrieron alteraciones durante el proceso de elaboración, B1 y B5, la disminución de las esporas viables es más paulatina que en el resto de las cecinas. En el caso de una elevada contaminación inicial no es hasta el final del proceso de elaboración cuando se produce la total desaparición de esporas viables de *Clostridium sporogenes*.

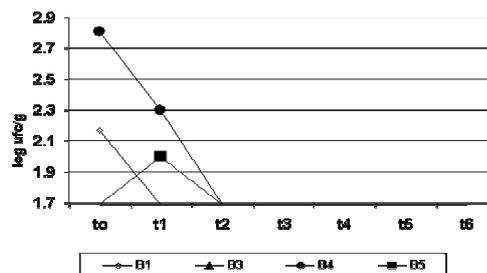


Figura 2: Evolución del inóculo de 10² esporas/g de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina.

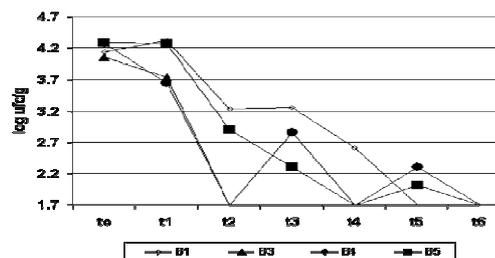


Figura 3: Evolución del inóculo de 10⁵ esporas/g de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina.

BIBLIOGRAFÍA

Bell, C. y Kyriakides, A. 2005. *Clostridium botulinum*. Una aproximación práctica al microorganismo y su control. Ed. Acribia, Zaragoza.

BOE (Boletín Oficial del Estado). 1994. Orden de 27 de junio de 1994 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación Específica "Cecina de León" y su Consejo Regulador. BOE n.º 165, 12 de julio de 1994, 22286-22291.

Hytiiä, E., Hielm, S. Mokka, M., Kinnunen, A., Korkeala, H. 1999. Predicted and observed growth and toxigenesis by *Clostridium botulinum* type E in vacuum-packaged fishery product challenge tests. Int. J. Food Microbiol. 47, 161-169.

Le Bourhis, A.-G., Saunier, K., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., Tholozan, J.-L. 2005. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 71, 29-38.

Mah, J.-H., Kang, D.-H., Tang, J. 2008. Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. Int. J. Food Microbiol. 128, 385-389.

Evaluación de factores que afectan al crecimiento de tipos patógenos de *Escherichia coli*.

Jesús Ángel Santos Buelga y María Elena Álvarez Suárez.

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España, j.santos@unileon.es

En la actualidad, las mejoras introducidas en la higienización a nivel de las explotaciones agrarias y plantas de procesado de la leche, junto con la aplicación rutinaria de la pasteurización, han eliminado prácticamente el riesgo de transmisión de enfermedades causadas por microorganismos patógenos. No obstante siguen apareciendo brotes puntuales asociados al consumo de leche o productos derivados, algunos de ellos causados por tipos patógenos de *Escherichia coli*. La modificación de determinados parámetros que afectan al crecimiento de éste microorganismo (temperatura, pH, actividad de agua) podría contribuir a su control en caso de fallo de la pasteurización o posterior contaminación. Así pues, en este trabajo se ha visto que cepas de *E. coli* enteropatógenas (EPEC) prácticamente no sobreviven por debajo de 10 °C, pero a 15 °C, no solo sobreviven sino que además son capaces de crecer. En cuanto al pH tanto las cepas EPEC como las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) son capaces de tolerar valores de 5,5 cuando el ácido empleado para modificarlo es ácido láctico y de 2,37 cuando se emplea ácido clorhídrico. La actividad de agua (a_w) mínima que permite la supervivencia de estos patógenos también depende del compuesto empleado para modificarla. Cuando se emplea NaCl, por debajo de 0,94 de a_w se mueren prácticamente todas las células, pero si empleamos sacarosa la a_w que permite la supervivencia disminuye hasta 0,93, y lo mismo sucede empleando glicerol, a a_w de 0,93 e incluso 0,91 observamos supervivencia de algunas de algunas células. Teniendo en cuenta cómo afectan estos parámetros a la supervivencia de cepas de *E. coli* patógenas y que la dosis infectiva es baja (10 – 100 células) se debe tener especial cuidado en la elaboración de los productos lácteos para reducir el riesgo de contaminación.

INTRODUCCIÓN

Numerosos alimentos son causa de brotes de toxiinfecciones alimentarias (TIA) pese a las mejoras higiénicas y tecnológicas introducidas en la elaboración de éstos. Los datos del último informe sobre zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria de la Unión Europea, muestran que los productos lácteos se han visto implicados en el 5,4 % de los brotes de TIA durante el 2012, algunos de ellos causados por *E. coli*, principalmente del serogrupo O157 (EFSA, 2014).

Se considera que la aplicación de tratamientos térmicos es una forma eficaz de control de los peligros biológicos cuando éstos provienen de la leche empleada como materia prima. No obstante, unas malas prácticas de fabricación, principalmente en productos cuyo proceso de elaboración incluye etapas de manipulación o de procesado posteriores al tratamiento térmico, pueden facilitar una contaminación cruzada o la incorporación de patógenos de origen ambiental.

La modificación de determinados parámetros que afectan al crecimiento de éste microorganismo (temperatura, pH y a_w) podría contribuir a su control en caso de fallo de la pasteurización o posterior contaminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron con tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) aisladas de muestras de leche de cabra pertenecientes a la colección del laboratorio. La resistencia a la acidez también se comprobó empleando tres cepas STEC (L10, L22 y L24a) del mismo origen.

Comportamiento de cepas EPEC a baja temperatura. Para cada cepa se inocularon 100 μ l de una suspensión bacteriana 10^5 ufc/ml en tubos que contenían 10 ml de TSB (Oxoid) y en tubos con 10 ml de leche de cabra estéril. Se realizó por triplicado para cada temperatura de incubación (6°C, 8°C, 10°C y 15°C) y medio de cultivo (TSB y leche de cabra), incubando los tubos durante 7 días. Posteriormente se realizó un análisis microbiológico de las muestras sembrando en superficie de placas SMAC (Oxoid) 100 μ l de suspensión bacteriana que se incubó a 37 °C durante 24 h antes de realizar el recuento de ufc/ml. Como control se emplearon los medios sin inocular.

Resistencia a la acidez de cepas EPEC y STEC. Se emplearon dos tipos de ácido, uno fuerte (HCl) y uno débil (ácido láctico). Para cada cepa se inocularon 100 μ l de una suspensión bacteriana de 10^5 ufc/ml en tubos que contenían TSB (Oxoid) y un tipo de ácido a distintas concentraciones (Tabla 1).

Se incubaron a 37 °C durante 24 h, midiendo la absorbancia a 450 nm transcurridas 3, 6 y 24 horas tras la inoculación. Como control de crecimiento se empleó TSB sin ácido inoculado del mismo modo y como blanco tubos de medio sin inocular.

Influencia de la a_w , y del soluto empleado para modificarla, en el crecimiento de cepas EPEC. Se

emplearon tres solutos (NaCl, glicerol y sacarosa) a distintas concentraciones para modificar la a_w del medio base TSB (Tabla 2). La a_w se midió con el equipo Aqualab CX2 (Decagon Devices).

Se realizaron tres réplicas para cada cepa inoculando 1 ml de una suspensión bacteriana 10^2 ufc/ml en tubos con 9 ml de TSB y la concentración correspondiente de soluto, y se incubó a 37 °C durante 48 horas, midiendo la absorbancia a 450 nm a las 6, 18, 24 y 48 horas tras la inoculación para comprobar la evolución del crecimiento. Se comprobó la ausencia de crecimiento en los tubos mediante siembra en placas de TSA (Oxoid) incubadas durante 24 horas a 37 °C.

Tabla 1: pH del medio en función de la concentración de ácido.

		Ácido láctico					
M	0	1,14	3,34	5,71	9,14	11,42	14,85
pH	7,6	7	5,5	4,6	4,3	4	3,6
		Ácido clorhídrico					
M	0	0,56	0,9	1,12	3,37	5,62	9,75
pH	7,42	6,41	5,32	4,81	2,37	1,34	0,95

Tabla 2: a_w del medio líquido en función de la concentración de cada soluto añadido.

[NaCl]%	0	0,9	1,8	3,4	6,5	9,3	11,9
a_w	1,00	1,00	0,99	0,98	0,97	0,94	0,94
[Glic.]%	2,6	4,9	9,4	16,1	23,1	28,6	33,5
a_w	1,00	0,99	0,98	0,96	0,95	0,93	0,91
[Sac.]%	9,2	15,9	26,2	39,7	48,4	54,6	59,2
a_w	0,99	0,99	0,98	0,97	0,96	0,94	0,93

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento de cepas EPEC a baja temperatura.

El rango de temperaturas que permite el crecimiento y la supervivencia de *E. coli* va desde los 7-8 °C hasta los 46 °C (Yates, 2011). En nuestro estudio hemos comprobado que en leche las tres cepas de EPEC tuvieron un comportamiento similar, observándose mayor inactivación a las temperaturas más bajas, pero aumentando la supervivencia a medida que aumentaba la temperatura hasta observar crecimiento a 15 °C.

Una tendencia similar se observó en las mismas cepas cuando crecen en caldo TSB. Este resultado es interesante desde el punto de vista de la proliferación de estas cepas en alimentos que pudieran haberse visto expuestos a una ruptura de la cadena del frío, ya que se comprueba que temperaturas no excesivamente elevadas permiten el desarrollo de estos patógenos.

Resistencia a la acidez de cepas EPEC y STEC.

El rango óptimo de pH que permite el crecimiento de *E. coli* se sitúa en 6-7, pero como en el caso de la temperatura se amplía desde 4,4 hasta 10. Sin embargo el efecto del pH en la supervivencia depende del tipo de ácido presente en el medio y de la propia

cepa (Yates, 2011). En nuestro caso hemos observado que tanto las tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) como las tres cepas STEC (L10, L22 y L24a) solamente sobrevivían a concentraciones inferiores a 3,43 M (pH 5,5) en el caso del ácido láctico y 3,37 M (pH 2,37) en el caso del ácido clorhídrico. Resultado esperado ya que los ácidos orgánicos son más eficaces que los inorgánicos. Otro resultado interesante es que el ácido láctico tiene un efecto inhibido ligeramente superior en el caso de las cepas STEC respecto a las cepas EPEC. Estos datos concuerdan con lo señalado por Golden y Small (1993) quienes observaron que los patotipos enteroinvasivo y enteropatogénico de *E. coli* son significativamente más tolerantes a la acidez que las variedades no patógenas.

Influencia de la a_w , y del soluto empleado para modificarla, en el crecimiento de cepas EPEC.

Los datos disponibles acerca de la mínima a_w que permite el crecimiento de *E. coli* están en torno a 0,95, o un 0,8 % de NaCl, siendo el valor óptimo de 0,995 a_w (Yates, 2011). Además, en nuestros ensayos, como era de esperar, encontramos que la mínima a_w que toleran depende del compuesto a utilizar. Así, cuando se emplea NaCl, por debajo de 0,94 a_w se mueren prácticamente todas las células, pero si empleamos glicerol, a a_w de 0,93 e incluso 0,91 observamos supervivencia de algunas de ellas (cepa L50). Cuando empleamos sacarosa no se observa una tendencia clara ya que la cepa L6 es capaz de sobrevivir bien a a_w de 0,93, pero con las cepas L29a y L50 se observa lo contrario, incluso a una a_w relativamente alta (0,96), prácticamente no sobreviven.

Teniendo en cuenta cómo afectan estos parámetros a la supervivencia de cepas de *E. coli* patógenas y que la dosis infectiva es baja (10 – 100 células) se debe tener especial cuidado en la elaboración de los productos lácteos para reducir el riesgo de contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

- EFSA, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 12 (2), 3547.
- Gorden, J., Small, P.L., 1993. Acid resistance in enteric bacteria. Infect Immun 61, 364-367.
- Yates, A., 2011. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). In: Craig, D. and Bartholomaeus, A. (eds) Agents of Foodborne Illness. Food Standards Australia New Zealand. Canberra.

Agradecimientos. Este trabajo se ha financiado con el proyecto de investigación AGL2011-26118. M^a Elena Álvarez ha sido beneficiaria del programa de formación de personal investigador de la Universidad de León.

Eficacia de ingredientes naturales sobre virus entéricos

Gloria Sánchez^{1,2}, Carlos Sánchez¹ y Rosa Aznar^{1,2}

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, España glosanmo@uv.es

²Departamento de Biotecnología, IATA-CSIC, España

En este estudio se mostró que los aceites esenciales de orégano y zataria no presentaron ningún efecto virucida sobre suspensiones del virus de la hepatitis A (VHA), mientras que el tratamiento con carvacrol al 2% redujo la infectividad del VHA en cerca de 1 orden logarítmico. En el caso de los modelos de norovirus, el norovirus murino (MNV) y el calicivirus felino (FCV), el tratamiento con carvacrol fue más efectivo que el timol, obteniéndose más de 3 órdenes logarítmicos de inactivación para suspensiones de FCV y MNV tratadas con 0,5% de carvacrol. Carvacrol al 0,5% se aplicó en agua de lavado de lechuga, donde la eficacia del tratamiento disminuía a medida que se incrementaba la demanda química de oxígeno (DQO).

INTRODUCCIÓN

Los virus entéricos, principalmente los norovirus humanos (NoV) y el virus de la hepatitis A (VHA), se encuentran entre los patógenos emergentes reconocidos en los últimos años como principales causantes de brotes de enfermedades de transmisión alimentaria. Los alimentos habitualmente involucrados en la transmisión de infecciones víricas son los moluscos bivalvos, los alimentos de IV gama (verduras que se consumen crudas, las frutas tipo baya) y los alimentos preparados. La inactivación de virus entéricos mediante ingredientes naturales como algunos aceites esenciales, quitosano o polifenoles ha sido demostrada utilizando suspensiones de algunos de ellos (revisado por Li y col., 2013 y D'Souza, 2014). Sin embargo, son pocos los estudios en los que estos compuestos naturales se han ensayado en aplicaciones alimentarias, ya sea en el agua de lavado de frutas y verduras, en tanques de depuración de marisco o en envases activos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus y líneas celulares. Se utilizaron las cepas HM-175 del VHA, F9 del FCV y MNV-1, y se ensayaron en la líneas FRhK-4, CRFK y RAW 264.7, respectivamente.

Evaluación capacidad virucida. Los compuestos evaluados se añadieron a las suspensiones de virus (ca. 6-7 log TCID₅₀/ml) y se incubaron a 37 °C en agitación durante 2 h. Los virus infecciosos fueron enumerados en las líneas celulares correspondientes. Cada tratamiento se realizó por triplicado. La actividad virucida de los distintos compuestos se calculó comparando el número de virus infecciosos en las suspensiones sin tratar y en las suspensiones de virus tratadas.

Agua de lavado de lechuga. Se añadió 0,5 % carvacrol a agua de lavado de lechuga (López y col., 2011) con distintas concentraciones de demanda química de oxígeno y una concentración fija de MNV o FCV y se trató durante 2 h a 37 °C.

Higienización de lechuga. Se inocularon trocitos de lechuga de 3 cm² con las suspensiones de virus, se dejó secar el inculo y se lavaron con soluciones de agua destilada que contenía 0,5 % y 1% de carvacrol durante 30 min (Li y col., 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficacia del aceite esencial de zataria y orégano sobre el VHA.

Recientemente nuestro grupo ha descrito que los aceites esenciales de orégano y zataria son muy efectivos para la inactivación de dos modelos de NoV humanos, el MNV y el FCV (Elizaquível y col., 2013). En este trabajo, cuando tratamos suspensiones del VHA con concentraciones del 0.1% hasta 2% con aceite esencial de zataria o orégano, no se detectaron reducciones en la infectividad del VHA.

Eficacia del carvacrol y timol sobre suspensiones víricas.

El carvacrol y timol son compuestos principales de muchos aceites esenciales. La tabla 1 muestra la eficacia sobre el MNV, FCV y VHA. Los resultados muestran que el carvacrol fue más efectivo que el timol sobre los virus estudiados, aunque en el caso del VHA sólo se conseguían reducciones de casi 1 log cuando se utilizaba el carvacrol al 1%. El carvacrol al 0,5% inactivaba completamente las suspensiones de MNV y FCV después de 1 h de incubación (Fig 1).

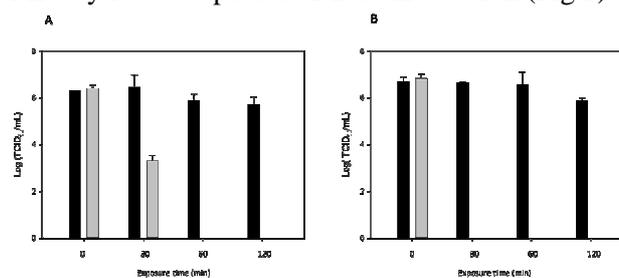


Figura 1: Eficacia del carvacrol al 0,5% a diferentes tiempos de incubación. A. MNV. B. FCV

Tabla 1: Eficacia del carvacrol (C) y timol (T) sobre suspensiones víricas.

	FCV ¹	MNV	HAV
Control	5,82 ± 0,32A	5,70 ± 0,00A	6,12 ± 0,35A
0,25% C	2,41 ± 0,07B	3,84 ± 1,29B	5,96 ± 0,12A
0,5 % C	< 2,32 ± 0,00C	< 2,13 ± 0,00C	5,98 ± 0,19A
1% C	< 1,32 ± 0,00C	< 2,13 ± 0,00C	5,15 ± 0,14B
Control	5,88 ± 0,00A	6,07 ± 0,00A	6,41 ± 0,19A
0,1% T	5,99 ± 0,26A	5,99 ± 0,38A	6,41 ± 0,14A
0,5 % T	< 2,13 ± 0,00B	5,57 ± 0,45A	5,29 ± 0,07A
1% T	< 2,13 ± 0,00B	4,41 ± 1,16B	6,20 ± 0,12A
2% T	-	3,62 ± 0,72B	6,39 ± 0,17A

¹Log TCID₅₀/ml

Eficacia del carvacrol en agua de lavado de lechuga.

La contaminación cruzada en el agua de lavado de productos de IV gama supone un grave problema para este tipo de industrias. En este trabajo, se ha evaluado la capacidad del carvacrol como higienizante natural, y su potencial para eliminar la presencia de virus en este tipo de agua. Los resultados muestran que la efectividad del carvacrol depende en gran medida de la DQO del agua, sobre todo para el MNV, que es reconocido como un virus más resistente que el FCV (Tabla 2).

Tabla 2: Reducción en la concentración de virus después de tratamiento de agua de lechuga con carvacrol al 0,5 %

DQO (ppm)	MNV	FCV
0	> 4,50	>3,50
200	4,49 ± 0,07	3,08 ± 0,25
300	0,24 ± 0,19	2,99 ± 0,26
400	0,41 ± 0,12	2,64 ± 0,06

Eficacia del carvacrol sobre alimentos.

Por otro lado se evaluó el potencial del carvacrol para la higienización de lechuga previamente inoculada con MNV y FCV. Los resultados muestran que el simple lavado con carvacrol al 1% reduce en un 90% la carga vírica (Tabla 3).

Tabla 3: Eficacia del lavado con carvacrol en lechuga

Lavado	MNV (Log TCID ₅₀ /mL)		FCV (Log TCID ₅₀ /mL)	
	[] virus	Reduc.	[] virus	Reducción
Agua	6,24 ± 0,19A	-	6,45 ± 0,21A	-
0,5% C	6,03 ± 0,31A	0,21	6,24 ± 0,38A	0,21
1% C	5,49 ± 0,14B	0,92	5,45 ± 0,17B	1,00

Los resultados presentados en este trabajo muestran el potencial que tiene el carvacrol como alternativa a los higienizantes químicos.

BIBLIOGRAFÍA

- D'Souza, D.H. 2014, Phytochemicals for the control of human enteric viruses. *Curr. Opin. Virol.*, 4:44-9.
- Elizaquível, P., Azizkhanib, M., Aznar, R., Sánchez, G. 2013. The Effect of essential oils on norovirus surrogates. *Food Control*, 32: 275-278.
- Li, D., Baert, L., Uyttendaele, M. 2013, Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. *Food Microbiol.*, 35:1-9.
- Li, D., Baert, L., Zhang, D., Xia, M., Zhong, W., Van Coillie, E., Jiang, X., Uyttendaele, M. 2012, Effect of grape seed extract on human norovirus GI.4 and murine norovirus 1 in viral suspensions, on stainless steel discs, and in lettuce wash water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78:7572-7578.
- López-Gálvez, F., Posada-Izquierdo, G.D., Selma, M.V., Pérez-Rodríguez, F., Gobet, J., Gil, M.I., Allende, A. 2011. Electrochemical disinfection: an efficient treatment to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in process wash water containing organic matter. *Food Microbiol.*, 30:146 –156.

Producción de aminas biógenas por cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso

M. Eugenia Tornadijo, Leticia González y Domingo Fernández

Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España, metorr@unileon.es

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad para producir aminas biógenas in vitro, por cinco cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso, un queso artesanal elaborado con leche de vaca, y seleccionadas previamente en función de sus aptitud tecnológica, para formar parte de un cultivo iniciador autóctono.

INTRODUCCIÓN

Las principales aminas biógenas estudiadas en queso son tiramina e histamina junto con putrescina y cadaverina, que suelen aparecer después de los treinta días de maduración. Los niveles de aminas biógenas varían notablemente no sólo entre variedades de queso sino también dentro de cada variedad (Stratton y col., 1991; Silla, 1996).

Las bacterias lácticas integrantes de un cultivo iniciador deben carecer de la capacidad de producir aminas biógenas (Dewan y Tamang, 2007). Sin embargo, la presencia de estos compuestos es inevitable en alimentos fermentados (Masturcelli y col., 2005). La formación de aminas biógenas es un mecanismo que poseen las bacterias para protegerse frente a ambientes ácidos (Arena y Manca de Nadra, 2001). Las aminas biógenas se generan principalmente por descarboxilación del correspondiente aminoácido gracias a enzimas específicas que posee la microbiota del producto, por lo que están asociadas con aspectos higiénicos y tecnológicos (Curiel y col., 2011). Muchas bacterias lácticas poseen la capacidad de producir aminas. En concreto la actividad tirosina e histidina descarboxilasa han sido detectadas en lactobacilos, enterococos, lactococos y leuconostoc (Maijala y col., 1993; Silla, 1996; Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Fernández García y col., 2000; Suzzi y Gardini, 2003). En consecuencia, la mayoría de los productos en los cuales crecen las bacterias lácticas pueden contener cantidades considerables de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina. La producción está relacionada principalmente con la actividad proteolítica de los microorganismos integrantes de la microbiota láctica non-starter (NSLAB) (Maijala y Eerola, 1993; Bover-Cid y col., 2001; Suzzi y Gardini, 2003). De hecho, la presencia de microorganismos con alta actividad descarboxilasa se considera el principal factor relacionado con el contenido de aminas biógenas en queso (Silla 1996; Arena y Manca de Nadra, 2001; Galgano y col., 2001; Masturcelli y col., 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

La producción de aminas biógenas se evaluó mediante ensayos cualitativos y cuantitativos. El análisis cualitativo fue llevado a cabo en diferentes medios descritos por Bover-Cid y Holzapfel (1999). Estos medios se suplementaron con el correspondiente precursor aminoácido de cada amina biógena (L-histidina monohidrocloruro, L-ornitina monohidrocloruro, L-Lisina monohidrocloruro y Tirosina disodio) al 1% como concentración final. La producción de al menos una amina biógena se constató por la formación de un color púrpura en el medio, de acuerdo a Curiel y col. (2011).

Algunos autores advierten de numerosos falsos negativos que ocurren debido a un crecimiento insuficiente de las cepas o a la propia capacidad acidificante de las bacterias lácticas. Por otro lado otros autores afirman haber encontrado falsos positivos debido a la producción de otras sustancias capaces de alcalinizar el medio. Por todo ello el análisis cualitativo se confirmó mediante métodos cuantitativos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las muestras se prepararon siguiendo el método aportado por Burdychova y Komprda (2007), y se derivatizaron con una solución de cloruro de dansilo. El análisis se llevó a cabo siguiendo el método de Eerola y col. (1993) y Masturcelli y col. (2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El test cualitativo de producción de aminas fue positivo respecto a putrescina, cadaverina y tiramina en todas las cepas evaluadas. Se detectó también producción de histamina en tres de las cinco cepas estudiadas. Los resultados obtenidos por confirmación mediante procedimientos cuantitativos se presentan en la tabla 1. Las cepas fueron clasificadas según Özogul y Özogul (2007), dependiendo de su capacidad de producción, en tres categorías: elevada capacidad de producción de aminas ($100-1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), intermedia capacidad de producción de aminas ($10-100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y baja capacidad de producción de aminas ($< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

La producción de aminas biógenas fue diferente entre especies e incluso entre cepas de la misma especie, como ya señalaron Özogul y Özogul en 2007.

En general, las cepas evaluadas acumularon poca cantidad de histamina a partir de histidina. Sin embargo, la cepa *Enterococcus faecalis* GE 2320 exhibió una buena capacidad de formación de histamina pero a partir de otros aminoácidos. Esto es posible porque el medio utilizado contiene peptona y extracto de carne. Además, hay que tener en cuenta que las diferencias en la concentración de metabolitos puede deberse al estado de crecimiento de los cultivos. Todas las cepas mostraron intermedia capacidad de producción de putrescina a partir de ornitina. Así mismo, fueron bajas productoras de cadaverina en el medio enriquecido con lisina.

Las cepas *Lactobacillus paracasei* GE 2036, *Enterococcus faecalis* GE 2320 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GE 2363 mostraron una producción de tiramina intermedia con valores en torno a 80-90 µg mL⁻¹. De hecho, histamina y tiramina son las aminas biógenas más abundantes encontradas en quesos de oveja y vaca (Novella y col., 2003; Masturcelli y col., 2005).

En la valoración de estos resultados hay que tener en cuenta que la producción de aminas biógenas en el queso está condicionada por varios factores que incluyen la tecnología de elaboración, sus condiciones de maduración y la evolución de las especies microbianas y de los parámetro físico-químicos de los quesos (Ordoñez y col., 1997; Komprda y col., 2007; Linares y col., 2012). Los resultados de este trabajo junto con los obtenidos en otros estudios llevados a cabo sobre la caracterización enzimática de las bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso (González y col., 2010) constituyen una herramienta esencial para seleccionar cepas de bacterias lácticas con características interesantes desde un punto de vista tecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Arena, M. E., Manca de Nadra, M. C. 2001 Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J Appl. Microbiol.* 90:158-162.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H. 1999 Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J Food Microbiol.* 53, 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. 2001 Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J Food Microbiol.* 66, 185-189.
- Burdychova, R., Komprda, T. 2007 Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 149-155.
- Curiel, J.A, Ruiz-Capillas, C, de las Rivas, B, Carrascosa, A.V, Jiménez-Colmenero F, Muñoz R. 2011 Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Sci.* 88:368-373.
- Dewan, S., Tamang, J. P. 2007 Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. *Antonie van Leeuwenhoek* 92, 343-352.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T. 1993 Liquid chromatography determination of biogenic amines in dry sausages. *J AOAC Int.* 76, 575-577.
- Fernández-García, E., Tomillo, J., Núñez, M. 2000 Formation of biogenic amines in raw milk Hispanic cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J Food Protect.* 63, 1551-1555.
- Galgano, F., Suzzi, G., Favati, F., Cruso, M., Masturcelli, M., Gardini, F., Salzano, G. 2001 Biogenic amines during ripening in "Semicotto Caprino" Cheese: role of enterococci. *Int. J Food Sci. Technol.* 36, 153-160.
- González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. 2010 Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiol.* 27, 592-597.
- Komprda, T., Smělá, D, Novická, K., Kalhotka, L., Šustová, K., Pechová, P. 2007 Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chem.* 102, 129-137.
- Linares, D.M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M.C., Álvarez, M.A. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Food Microbiol.* 3, 1-10.
- Majjala, R., Eerola, S., Aho, M., Him, J. 1993 The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *J Food Protect.* 56, 125-129.
- Masturcelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-López, C., Schirone, M., Suzzi, G. 2005 Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J* 15, 571-578.
- Novella Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. 2003 Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J Food Sci.* 68, 750-756.
- Ordóñez, J. A., Ibáñez, F. C., Torre, P., Barcina, Y. 1997 Formation of biogenic amines in Idiazábal ewe's-milk cheese: effect of ripening, pasteurization and starter. *J Food Protect.* 60, 1371-1375.
- Özogul, F., Özogul, Y. 2007 The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 385-394.
- Silla Santos, M.H. 1996 Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J Food Microbiol.* 29, 213-231.
- Stratton, S.S., Hutkins, R. W., Taylor, S. L. 1991 Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J Food Protect.* 54, 460-470.
- Suzzi, G., Gardini, F. 2003 Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. Food Microbiol.*, 88, 41-54.

Tabla 1: Producción de aminas biógenas por cepas de bacterias lácticas aisladas del queso de Genestoso.

Especie	Cepa	Producción de aminas biógenas (µg mL ⁻¹)			
		Putrescina	Histamina	Cadaverina	Tiramina
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	GE 11	22.16	7.56	8.40	3.16
	GE 12	23.22	n.d.	7.86	2.26
	GE 2363	34.54	7.9	6.84	89.26
<i>Lactobacillus paracasei</i>	GE 2036	52.42	n.d.	9.02	33.74
<i>Enterococcus faecalis</i>	GE 2320	14.48	6.32	8.16	79.20

Caracterización de resistencias de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos en Navarra durante el periodo 2004-2013

María Díez-Leturia, Leyre Tabar, Victoria Garrido y Ana Isabel Vitas

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas. Departamento de Microbiología y Parasitología
Universidad de Navarra, España. mdiezlet@unav.es

Debido a la alta mortalidad producida por *Listeria monocytogenes*, es importante asegurar la eficacia del tratamiento antibiótico en casos de listeriosis. Con este fin, se evaluó el perfil de resistencias de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos, principal vía de transmisión de la enfermedad. La monitorización del patógeno en alimentos procedentes de supermercados y empresas de catering de Navarra durante la última década permitió aislar 134 cepas de los siguientes orígenes: pescado cocido/ahumado ($n=37$), lácteos ($n=15$), vegetales crudos/cocinados ($n=14$) y carnes cocidas/curadas ($n=68$). El serogrupo predominante fue el 1/2a (42,5%), seguido de 4b (30,6%) y 1/2c (21,6%). Todas las cepas fueron sensibles a ampicilina, penicilina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina, gentamicina, meropenem, imepenem y vancomicina. Además, rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol mostraron valores bajos de MIC₉₀ (0,032 y 0,023 µg/ml, respectivamente), mostrando alta eficacia frente a *L. monocytogenes*. En contraste, se encontraron altos porcentajes de resistencia para fosfomicina (80,6%), cefuroxima (95,5%), cefepime (96,3%) y clindamicina (94,0%). Por otro lado, un bajo porcentaje de cepas fueron resistentes a ciprofloxacino (6,7%), levofloxacino (0,8%) y tetraciclina (2,23%). Finalmente, se estudió la tendencia del valor MIC₉₀ para rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol y gentamicina, siendo ascendente en el primero de ellos. Estos resultados revelan que a pesar de la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a la mayoría de los antibióticos, es posible adivinar un aumento de resistencias en el futuro. Por ello, es conveniente reforzar la vigilancia de resistencias tanto de cepas alimentarias como clínicas.

INTRODUCCIÓN

En la Unión Europea, la listeriosis es una enfermedad relativamente rara, pero con alta morbilidad, hospitalización y mortalidad en el rango de la población vulnerable (EFSA, 2013). La alarma que supone la alta tasa de mortalidad (20%), se acentúa en los últimos años con la emergencia de resistencias. Así, desde que la primera cepa de *Listeria monocytogenes* resistente a un antibiótico fue documentada en 1988, otros casos han sido aislados en alimentos, medio ambiente y muestras clínicas (Korsak y col., 2012). Por todo ello, es importante asegurar la eficacia de los tratamientos antibióticos en casos de listeriosis.

En consecuencia, el objetivo de este estudio ha sido caracterizar el perfil de resistencias de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos en Navarra durante la última década.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante los años 2004-2013, se aislaron un total de 134 cepas de *L. monocytogenes* en alimentos procedentes de supermercados y empresas de catering de Navarra. Los grupos de alimentos en los que se aisló el patógeno fueron los siguientes: pescado cocido/ahumado ($n=37$), lácteos ($n=15$), vegetales crudos/cocinados ($n=14$) y carnes cocidas/curadas ($n=68$).

La caracterización antigénica se realizó empleando un kit comercial de antiseros para *L. monocytogenes* (Denka Seiken).

El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana se llevó a cabo por microdilución en placa (interpretación de resultados según *the guideline of the Clinical and Laboratory Standards Institute*; CLSI, 2012), evaluándose 16 agentes antimicrobianos mediante panel comercial genérico de Gram positivos (Siemens PM28). Además se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC₅₀ y MIC₉₀) de 50 cepas seleccionadas al azar frente a los siguientes antibióticos: gentamicina, rifampicina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol (mediante E-test Biomerieux); ampicilina, penicilina y vancomicina (por microdilución en placa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización antigénica de *L. monocytogenes* agrupó los aislados en 6 serotipos (Tabla 1). La mayoría de las cepas pertenecieron a los serotipos 1/2a y 4b (42,5% y 30,6%, respectivamente), seguidos de 1/2c (21,6%) y 1/2b (3,7%). El 1,4 % restante correspondió a 2 cepas clasificadas como 4d (aislada de espárragos) y 3a (aislada en lasaña). Teniendo en cuenta que los serotipos más comúnmente asociados a casos de listeriosis son 4b, 1/2a y 1/2b (Orsi y col., 2011), su presencia en el 100% de pescados y lácteos y en el 61,8% de los cárnicos, suscribe la posible transmisión de la enfermedad por la ingesta de estos grupos de alimentos.

Tabla 1: Serotipos de *L. monocytogenes* por grupo de alimentos

Origen	Serotipo n (%)					
	1/2 a	1/2b	1/2c	4b	4d	3a
Cárnico	34(50)	3(4,4)	25(36,8)	5(7,4)	0	1(1,5)
Pescado	19(51,4)	0	0	18(48,6)	0	0
Vegetal	4(28,6)	2(14,3)	4(28,6)	3(21,4)	1(7,1)	0
Lácteo	0	0	0	15 (100)	0	0
Total	57(42,5)	5(3,7)	29(21,6)	41(30,6)	1(0,7)	1(0,7)

Todos los aislados fueron sensibles a ampicilina, rifampicina, penicilina, gentamicina amoxicilina y trimetoprim/sulfametoxazol (antibióticos de primera elección en el tratamiento de listeriosis), así como a meropenem, imepenem y vancomicina. Sin embargo, se detectaron resistencias a ciprofloxacino (6,7%), levofloxacino (0,8%) y tetraciclina (2,2%). El hecho de que esta última haya sido utilizada como terapia en casos de listeriosis (Charpentier and Courvalin, 1999), puede suponer el fracaso de los tratamientos en caso del avance de las resistencias. En este sentido, cabe destacar que los serotipos más frecuentemente implicados en los casos de listeriosis (1/2a, 1/2b y 4b) son los predominantes entre las cepas resistentes (Figura 1).

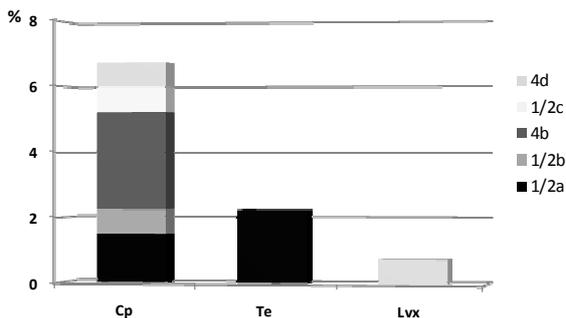


Figura 1: Porcentaje de resistencias y distribución de serotipos en cada grupo. Cp, ciprofloxacino; Te, tetraciclina; Lvx, levofloxacino

Además de las esperadas resistencias a fosfomicina (80,6%), cefuroxima (95,5%) y cefepime (96,4%), para las cuales se ha descrito resistencia natural para *L. monocytogenes* (Troxler y col., 2000), el 94% de las cepas fueron resistentes a clindamicina. Por otro lado, se encontraron resistencias múltiples (a 2 o más antibióticos) en 12 muestras (8,95%), siendo una de ellas (cepa serotipo 4d) resistente a 3 antibióticos (clindamicina, ciprofloxacino y levofloxacino).

El estudio de las MIC mostró la alta eficacia de rifampicina y trimetoprim/sulfametoxazol frente al patógeno (MIC₉₀ 0,032 y 0,023 µg/ml, respectivamente), mientras que los valores de penicilina y vancomicina fueron más altos (Tabla 2).

Tabla 2: Susceptibilidad antibiótica de 50 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos durante 2004-2013

Antibiótico	Método	Rango (µg/ml)	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicilina	MD	0,25-8	≤0,25	0,5
Gentamicina	E	0,125-1	0,38	0,5
Penicilina	MD	0,03-8	0,12	2
Rifampicina	E	0,002-0,094	0,016	0,032
Trimetoprim/sulfam.	E	0,008-0,032	0,016	0,023
Vancomicina	MD	0,5-16	1	1

MD (método de microdilución); E (E test);

Rango (valor máximo y mínimo de valores MIC observados)

Por último, el estudio de la evolución de los perfiles de resistencia en esta última década, muestra un ligero ascenso en el caso de rifampicina (Figura 2), lo que sugiere una posible pérdida de efectividad de este antibiótico en el futuro.

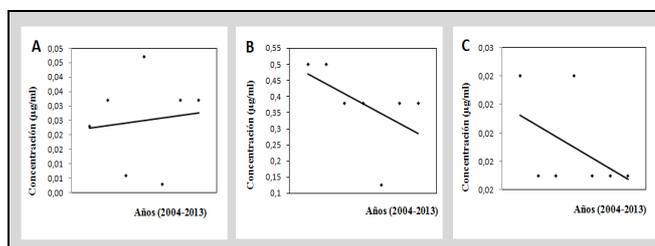


Figura 2: Tendencia de la MIC₉₀ durante el periodo 2004-2013: (A)Rifampicina; (B)Gentamicina;(C) Trimetoprim/sulfametoxazol

En conclusión, es necesario reforzar el sistema de vigilancia de los casos de listeriosis y llevar a cabo un exhaustivo estudio del perfil de resistencias tanto en cepas clínicas como alimentarias para evitar el fracaso terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

Charpentier, E., Courvalin, P. 1999, Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicro. Agents Chem., 43:2103-2108.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance Standards for Antimicrobial. Document M100-S22. In: Susceptibility Testing; Twenty-second Information Supplement, vol. 32(3). CLSI, Wayne, USA.

EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. EFSA Journal 11(6):3241-3316

Korsak, D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A. and Pappelbaum, K. 2012, Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. Int. J. Food Microbiol., 158:203-208.

Orsi, R. H., Bakker, H. C. d. and Wiedmann, M. 2011, *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int. J. Med. Microbiol., 301:79-96.

Troxler, R., von Gravenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., Stock, I. 2000, Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimerii* strains. Clin. Microbiol. Infec., 6:525-535.

Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de *Craterellus cornucopioides* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Eva Guillamón, Miguel Lozano, Ana García-Lafuente, Laura Mateo-Vivaracho, M^a Fernanda Fernández-León y Matilde D'Arrigo

Centro para la Calidad de los Alimentos, INIA, España, darrigo.matilde@inia.es

La actividad antimicrobiana de algunas proteínas presentes en setas comestibles ha despertado un gran interés por sus posibles aplicaciones médicas y biotecnológicas. El objetivo de este estudio fue la evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de un extracto proteico obtenido a partir de *Craterellus cornucopioides*, en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Para ello, se efectuó la extracción de la proteína mediante tampón fosfato salino (PBS) y se evaluó el crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones del extracto obtenido (48, 24, 12 y 6 mg polvo de seta liofilizada/mL). La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto proteico fue determinada por turbidimetría; la tasa de crecimiento máxima (μ_{\max}) y la fase de latencia (λ) fueron obtenidas mediante el modelo de Baranyi y Roberts (DMFit). Se observó que las concentraciones mayores de 12 mg/mL (CMI) produjeron cambios significativos en los parámetros de crecimiento ($p < 0,05$). La fase de latencia de *S. aureus* ATCC 43300 aumentó en 4 horas y los valores μ_{\max} se redujeron. El estudio reveló que el extracto proteico obtenido a partir de *C. cornucopioides* tiene actividad inhibitoria en el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300. Por lo tanto, esta seta comestible podría ser considerada como una fuente natural de agentes antibacterianos.

INTRODUCCIÓN

Las setas son una fuente importante de compuestos bioactivos y actualmente se estudia su uso como alimento funcional y/o fármaco (Lindequist y col., 2005). En la actualidad se han aislado, a partir de setas, un gran número de componentes bioactivos entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, los polisacáridos, las proteínas, los complejos de proteína-polisacárido, los terpenos, etc. (Barros y col. 2008, Wasser, 2010). Las proteínas y péptidos de las setas presentan actividad antiproliferativa, inmunomoduladora, antiviral, antifúngica y antibacteriana (Guillamón y col., 2011, Xu y col., 2011). Sin embargo, existe un número limitado de estudios acerca de la actividad antimicrobiana de estos compuestos en setas comestibles. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue demostrar, *in vitro*, el efecto antibacteriano del extracto proteico obtenido a partir de la seta comestible *Craterellus cornucopioides* en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

MATERIAL Y MÉTODOS

El extracto proteico se obtuvo a partir de los cuerpos fructíferos liofilizados y molidos de *C. cornucopioides*, empleándose PBS (100 mM tampón fosfato pH 7,4/ 0,15 M NaCl). Tras centrifugación, la proteína del sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio (85%). Estos residuos se sometieron a diálisis frente a agua destilada y por último se liofilizaron. El contenido proteico de los extractos se determinó mediante el método de Bradford utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como proteína estándar. Se prepararon diferentes concentraciones del extracto (48, 24,

12, y 6 mg de seta liofilizada/mL) para evaluar la actividad antimicrobiana en *S. aureus* ATCC 43300. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada por la técnica de turbidimetría (densidad óptica, Bioscreen C) y los parámetros de crecimiento microbiano como es la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}), la fase de latencia (λ) y el tiempo de generación fueron estimados mediante la aplicación de curvas bacterianas de ajuste (DMFit) basadas en el modelo de Baranyi y Roberts (1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto obtenido a partir de *C. cornucopioides* presentó un 15,86% de proteína. En la figura 1 (a, b) se observan las curvas de crecimiento para *S. aureus* ATCC 43300. Para representar estas curvas, los datos de densidad óptica se convirtieron a UFC/mL, utilizando curvas de calibración obtenidas con las mismas condiciones experimentales (datos no presentados). Los valores del logaritmo natural en UFC/mL fueron analizados con respecto al tiempo (h), mediante el modelo de Baranyi y Roberts (DMFit). Estas curvas de crecimiento fueron utilizadas para estimar los valores de fase de latencia (λ) (h), tasa de crecimiento máxima (μ_{\max}) (h^{-1}) y tiempo de generación (h) de *S. aureus* ATCC 43300.

El extracto proteico de *C. cornucopioides* presentó actividad antimicrobiana en el desarrollo de *S. aureus* ATCC 43300. En la figura 2, se observa que hay un efecto antimicrobiano significativo del extracto en el crecimiento bacteriano del *S. aureus* ATCC 43300, siendo la CMI de 12 mg de seta liofilizada/mL (1,9 mg de proteína/mL).

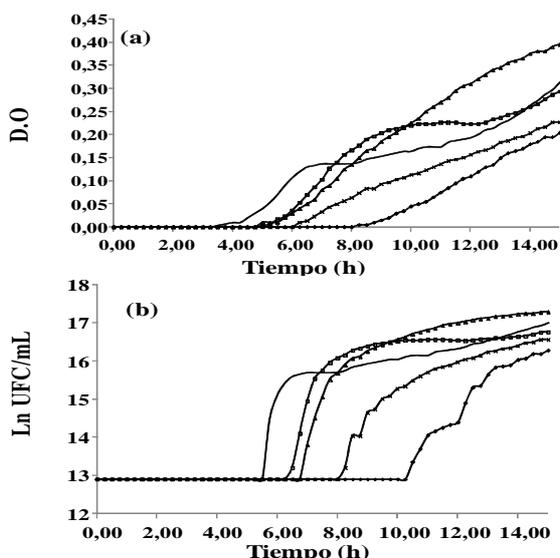


Figura 1: (a) Densidad óptica en unidades de absorbancia y (b) Curva de crecimiento microbiano de los valores de densidad óptica transformadas a Ln UFC/mL mediante una curva logística de calibrado para *S. aureus* ATCC 43300, en agua de peptona a pH 7,2 y 37 ° C. (-) 0 mg/mL; (□) 6 mg/mL; (Δ) 12 mg/mL; (x) 24 mg/mL; (◇) 48 mg/mL de seta liofilizada.

Con concentraciones proteicas superiores a 1,9 mg proteína/mL (12 mg de seta liofilizada /mL) se observó un incremento en la fase de latencia y tiempo de generación y la disminución en la tasa de crecimiento.

Estos resultados son similares a los obtenidos en los estudios realizados por Hearst y col. (2010) en los que se demostraron las propiedades antimicrobianas de extractos proteicos a partir de *Ganoderma resinaceum* y *Mycena pura*. El crecimiento de *S. aureus* fue inhibido a una concentración de 1,0 mg de proteína/mL.

Igualmente, Tehrani y col. (2012) evaluaron la eficacia antibacteriana de proteínas aisladas de *Agaricus bisporus* en el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6633 y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) 33591 ATCC.

En conclusión, este estudio demostró que las proteínas de *C. cornucopioides* muestran actividad antibacteriana en el desarrollo de la cepa *S. aureus* ATCC 43300 y que esta seta puede tener un gran potencial como agente antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

Barros, L., Cruz T., Baptista, P., Estevinho, LM., Ferreira IC. 2008, Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. Food Chem. Toxicol., 8:2742-2747.

Baranyi, J. and Roberts, T.A. 1994, A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol., 23:277-294.

Hearst, M., Nelson, D., McCollum, G., Ballard, LM., Millar, BC., Moore, S., McClean, S., Moore, JE., Rao, JR. 2010. Antimicrobial properties of protein extracts from wild mushroom fungi and native plant species against hospital pathogens. J. Pharma. Phytotherap., 2:103-107.

Guillamón, E., Garcia-Lafuente, A., Lozano, M., Moro, C., Palacios, I., D'Arrigo, M., Martínez, JA, Villares, A. 2011, Mushroom proteins potential therapeutic agents. Agro Food Ind Hi-tec., 22:42-44.

Lindequist, U., Niedermeyer, TH., Jülich, WD. 2005, The pharmacological potential of mushrooms. eCAM., 2:285-299.

Tehrani MHH, Fakhrehoseini E, Kamali MN, Mehregan H, Hakemi-Vala M. 2012, Search for proteins in the liquid extract of edible mushroom, *Agaricus bisporus*, and studying their antibacterial effects. Iran J. Pharm. Res., 11:145-50.

Wasser, SP. 2010, Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. Int J Medicinal Mushrooms., 12:1-16.

Xu, X., Yan, H., Chen J., Zhang, X. 2011, Bioactive proteins from mushrooms. Biotechnol Adv., 29:667-674.

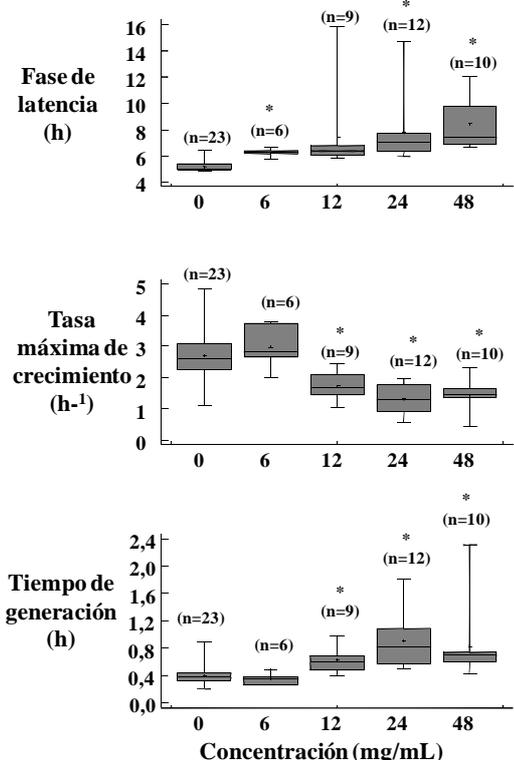


Figura 2: Diagrama de cajas de los valores promedio en fase de latencia (λ), tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) y tiempo de generación para *S. aureus* ATCC43300, en presencia de diferentes concentraciones de extracto proteico de *C. cornucopioides* (mg de seta liofilizada/mL). (n = número repeticiones). (*) Medias con diferencias significativas (p <0,05).

Implementación de objetivos de seguridad alimentaria para la eliminación de *Salmonella* en Chorizo Asturiano

Natalia Prado Marrón, Marta Sampayo Iglesias, Pelayo González González y Juan Díaz García

ASINCAR, España, juan.diaz@asincarc.com

La irremediable presencia del patógeno *Salmonella* en materias primas destinadas a la fabricación de los productos crudo-curados listos para el consumo, crea una importante problemática en la industria cárnica que, unido a la posible contaminación cruzada, de superficies, agua, portadores sanos etcétera y a la no existencia de un tratamiento bactericida, hacen que el patógeno pueda permanecer en el producto final. El presente trabajo tiene como finalidad establecer objetivos de seguridad alimentaria (FSO) a partir del establecimiento de objetivos de proceso (PO) y de la vigilancia de los criterios de proceso (PC), para garantizar la inocuidad del embutido crudo-curado Chorizo Asturiano, respecto al potencial riesgo de contaminación con *Salmonella*. Para el desarrollo de este trabajo se contaminaron artificialmente masas cárnicas con dos niveles de concentración de *Salmonella enterica* ATCC 14028 estableciéndose así el nivel inicial del peligro (H_0). Tras la contaminación y posterior elaboración del embutido crudo-curado, se monitorizó la proliferación y/o letalidad del microorganismo sometido a un total de 8 cambios en el proceso productivo. Estos cambios se centraron en las etapas de ahumado/fermentación y maduración/secado. Las condiciones de proceso modificadas fueron la temperatura, humedad y el tiempo, con el fin de establecer los objetivos de proceso (PO). Los parámetros analizados fueron recuento de *Salmonella* mediante el uso de un medio cromogénico selectivo y diferencial, determinación de pH y determinación de a_w . Los controles analíticos fueron realizados a lo largo de los 7 días que, como máximo, dura el proceso de fabricación del embutido crudo-curado Chorizo Asturiano. Además se realizaron controles una vez envasado y bajo las condiciones habituales de conservación del producto. De los datos obtenidos se puede concluir, que durante el proceso productivo no se produce una disminución de los niveles de *Salmonella*, incluso después de las modificaciones llevadas a cabo en las últimas etapas de la elaboración. Así, a pesar de que cabría esperar que las etapas de ahumado, secado y maduración, al provocar una disminución de la a_w en la matriz, podrían provocar una merma en la viabilidad del patógeno, ésta no se produce, comprobándose la viabilidad de *Salmonella* en el producto final.

INTRODUCCIÓN

La infección de origen alimentario por *Salmonella* es una de las causas más importantes de toxiinfección alimentaria en los seres humanos, siendo dicho microorganismo el agente etiológico de la salmonelosis. El aumento de la incidencia de *Salmonella*, es de gran impacto en la salud pública y se ha relacionado con un incremento de la diseminación del microorganismo a través de la cadena alimentaria y algunos alimentos, especialmente los de origen animal, han sido identificados como vehículos para la transmisión del patógeno.

En los productos crudo-curados listos para el consumo, entre los que se encuadraría el Chorizo Asturiano, existe una problemática respecto a la contaminación con *Salmonella*, ya que debido a su presencia en las materias primas, ambiente, la posible contaminación cruzada, superficies, agua, portadores sanos etcétera y a la no existencia de un tratamiento bactericida como tal, *Salmonella* puede persistir en el producto final.

El ajuste y flexibilización de los procesos productivos de los embutidos crudo-curados, el

cumplimiento de los objetivos de seguridad alimentaria (FSO) y establecimiento de objetivos de proceso (PO) y vigilancia de los criterios de proceso (PC), supondría un avance en la gestión activa de la seguridad alimentaria (ICMSF, 2002) (Zwietering, 2010), frente al habitual enfoque pasivo basado únicamente en la verificación del resultado en el producto final.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra. Para la elaboración del Chorizo Asturiano las masas cárnicas fueron elaboradas de la forma habitual recogida en el Reglamento de uso de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano. Se pesaron las materias primas cárnicas y se procedió a su picado. Tras esto, se añadieron el resto de aditivos e ingredientes, el producto es embutido y sometido a los distintos procesos de ahumado/fermentación y maduración/secado.

Contaminación. Se prepararon dos masas cárnicas contaminadas con dos niveles de *Salmonella enteritidis* ATCC 14028. La contaminación se efectuó tras un primer amasado de todos los ingredientes de la mezcla y fue homogeneizado en un segundo amasado. Se ensayaron dos niveles de contaminación, 3.4 log ufc/g y 4.5 log ufc/g.

Análisis microbiológico. Para la determinación de los

niveles de *Salmonella* y su monitorización a lo largo del proceso productivo se realizó un análisis cuantitativo de recuento de *Salmonella* mediante el uso del medio cromogénico chromID™ *Salmonella*.

Monitorización del proceso productivo. En las pruebas realizadas se han combinado diferentes tiempos en las etapas de ahumado/fermentación y maduración /secado ya que estas etapas se determinaron como las etapas más críticas en la proliferación y/o control del crecimiento y por tanto que podrían comprometer la seguridad del producto. A lo largo del proceso productivo se determinaron temperatura, pH y a_w.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Monitorización del proceso productivo

Tras la obtención de los resultados de monitorización de pH se comprobó que la fermentación del producto en las condiciones del estudio tiene lugar de forma lenta y paulatina, no suponiendo el pH una barrera efectiva frente a la proliferación de *Salmonella*.

En el caso de la determinación de la a_w se verifica que el producto se mantiene en valores por encima del valor mínimo necesario para la proliferación del patógeno de 0.94 (ICMSF, 1996) hasta los 5 días de mantenimiento en la etapa de maduración/fermentación.

Tabla 1: Monitorización del pH y a_w a lo largo de los diferentes procesos productivos de ahumado/fermentación y maduración/secado.

CONDICIONES		pH	a _w
Ahumado (días)	Secado (días)		
1	0	6.25	0.976
2	0	5.79	0.968
3	0	5.72	0.961
4	0	5.58	0.955
5	0	5.63	0.947
5	1	5.59	0.933
5	2	5.53	0.925
6	0	5.61	0.937
6	1	5.58	0.932
6	2	5.46	0.925

Evaluación resultados microbiológicos

Tras la evaluación de los resultados de recuento de *Salmonella* en el producto a lo largo del tiempo, para los dos niveles de concentración del patógeno ensayados y en todas las condiciones del proceso productivo evaluadas, se comprueba el incremento de cómo mínimo 1 log ufc/g hasta los 4 días de mantenimiento del producto en la etapa de ahumado/fermentación. Sobrepasados los 5 días de la etapa de ahumado/fermentación, dicho incremento puede superar los 3 log ufc/g en todos los casos.

Se concluye por tanto que tras la etapa de ahumado/fermentación se puede producir un

incremento del patógeno de hasta 2 log ufc/g, probablemente derivado de una bajada excesivamente lenta del pH, una a_w por encima del mínimo necesario para la proliferación de *Salmonella* y todo ello unido al hecho de que en dicha etapa el producto está a temperaturas de entre 15-30 °C y muy cercanas al óptimo de proliferación de *Salmonella* establecido entre 35-43 °C (ICMSF, 1996).

En la etapa de maduración/secado a pesar de una disminución de la a_w por debajo del óptimo de proliferación, se comprueba tras la evaluación de los resultados microbiológicos obtenidos que el microorganismo permanece viable.

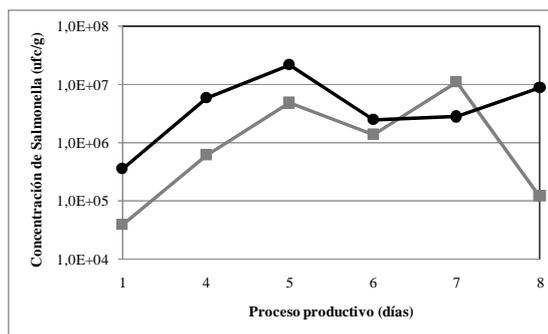


Figura 1: Resultados obtenidos en la evolución de *Salmonella* en las dos concentraciones ensayadas, para uno de los procesos productivos evaluados, 6 días en ahumado/fermentación y 2 días de maduración/secado. (■) nivel de contaminación inicial de 3.4 log ufc/g, (●) nivel de contaminación inicial de 4.5 log ufc/g.

BIBLIOGRAFÍA

ICMSF, 1996. Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos.
 ICMSF, 2002. Microorganismos de los alimentos. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria.
 Zwietering, M.H., Stewart, C.M., Whiting, R.C., International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2010, Validation of control measures in a food chain using the FSO concept. Food Control 21, 1716-1722.

Agradecimientos. Este proyecto ha recibido financiación pública de la Consejería de Economía y Empleo del Principado de Asturias en el marco de la convocatoria pública de ayudas a empresas para la ejecución de proyectos de I+D+i en el principado de Asturias durante el período 2013-2014. Esta convocatoria es cofinanciada en el marco del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



Evaluación de la producción de Ocratoxina A por *P. nordicum* y *P. verrucosum* en diferentes condiciones ambientales

Lourdes Sánchez-Montero, Aránzazu Picón, Belén Peromingo, Elena Bermúdez, M. Jesús Andrade y Juan J. Córdoba

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda, de la Universidad s/n 10003, Cáceres. España. lursmv@hotmail.com

La ocratoxina A (OTA) es una de las principales micotoxinas producidas por los mohos que se desarrollan en alimentos madurados, considerándose nefrotóxica y cancerígena. Para evitar su producción se ha sugerido establecer medidas preventivas durante la elaboración de estos alimentos basadas en el control de los diferentes factores ambientales que pueden condicionar su síntesis. El objetivo del estudio es evaluar cómo afectan determinadas condiciones ambientales, incluyendo composición del sustrato, a_w y temperatura en la producción de OTA. Se han utilizado dos cepas de *P. nordicum* y una de *P. verrucosum* productoras de OTA aisladas de jamón curado. Los mohos se cultivaron durante 14 días en tres medios líquidos: caldo extracto de carne (EC), caldo extracto de malta (MEB) y caldo extracto de levadura (YES), cada uno de los cuales elaborado con tres valores de a_w (0,99, 0,95 y 0,90). Tras la inoculación se distribuyeron en lotes que se incubaron a cuatro temperaturas (15°C, 20°C, 25°C y 30°C) durante 14 días. Se evaluó el desarrollo de los mohos mediante el peso seco del micelio y se determinó la concentración de OTA mediante HPLC-UV. Las tres cepas se desarrollaron a temperaturas entre 15 y 25°C en los diferentes medios de cultivo, observándose la mayor producción de OTA en YES a 25°C, independientemente de la a_w . Para evaluar la producción de OTA en condiciones similares a las del procesado de los productos crudos-curados, *P. nordicum* y *P. verrucosum* se inocularon sobre jamón curado y salchichón, y se incubaron durante 21 días a 25°C en dos condiciones de humedad relativa para alcanzar valores de a_w de 0,94 y 0,84. Se detectó OTA en los dos productos inoculados con los dos mohos estudiados y en ambas condiciones de humedad, con valores que oscilan entre los 2,30 µg/kg y 66,91 µg/kg, alcanzando una concentración mayor con a_w 0,84. Los resultados obtenidos muestran que, aunque el sustrato nutritivo no es el óptimo, los mohos ocratoxigénicos son capaces de producir OTA cuando se desarrollan en productos cárnicos en condiciones habituales durante su procesado. Si se produce el crecimiento de mohos ocratoxigénicos, no es posible evitar la producción de OTA en las condiciones de temperatura y a_w en las que debe realizarse el procesado, lo que hace necesario implementar medidas adicionales para su prevención como la utilización de cultivos protectores.

INTRODUCCIÓN

Durante la maduración de los productos cárnicos crudos-curados su superficie es colonizada por una abundante población fúngica. La presencia de mohos es fundamental puesto que influye sobre los procesos oxidativos responsables de las características sensoriales del producto acabado. Sin embargo, algunas cepas de mohos pueden provocar alteraciones durante la maduración e incluso producir micotoxinas. Gran parte de los mohos que se desarrollan durante la maduración de estos productos pertenecen al género *Penicillium* dentro del cual se encuentran gran cantidad de especies toxigénicas, como *P. verrucosum* y *P. nordicum*, caracterizadas por su capacidad de producir ocratoxina A (OTA). Esta micotoxina tiene un potente efecto nefrotóxico y cancerígeno. La síntesis de OTA está influida por factores como temperatura, la actividad de agua (a_w), pH y sustrato. La presencia del moho sobre los productos no implica la producción de la micotoxina. Es necesario conocer la influencia sobre la producción de OTA de los parámetros como temperatura, y a_w que experimentan

importantes modificaciones durante la maduración para poder evitar la producción de esta micotoxina. Existen diferentes estudios al respecto en una gran variedad de productos agrícolas como cebada, maíz, uvas y café, entre otros. Sin embargo, no existen trabajos de este tipo que evalúen el riesgo de la producción de OTA en productos cárnicos crudos-curados en función de los factores ambientales. El objetivo del estudio es evaluar cómo afectan la actividad de agua (a_w), temperatura y composición del sustrato sobre el crecimiento y la producción de OTA de *P. nordicum* y *P. verrucosum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas fúngicas. En el presente trabajo se utilizaron dos cepas de *P. nordicum* (Pn4 y Pn24) y una de *P. verrucosum* (Pv45) aisladas de la superficie de jamón curado. Estas especies de mohos se seleccionaron por poseer el gen *otanpsPN* involucrado en la producción de OTA.

Medios de cultivo. Para evaluar el efecto de la composición del medio sobre la producción de OTA se utilizó un medio cárnico (caldo Extracto de Carne, EC) y otros dos medios diferentes (caldo Extracto de levadura, YES y caldo Extracto de Malta, MEB). Cada uno de estos

medios fue elaborado con tres valores distintos de a_w (0,90, 0,95, 0,99), habituales durante el proceso de maduración del jamón curado. De cada cepa se inocularon 10^5 esporas en 5 ml de cada uno de los caldos preparados. Los medios se incubaron durante 14 días a temperaturas que se pueden alcanzar durante el proceso de maduración de jamón curado (15°C, 20°C, 25°C y 30°C). El ensayo se llevo a cabo por triplicado.

Evaluación del crecimiento fúngico. Tras la incubación se determinó el crecimiento fúngico mediante el peso seco del micelio, utilizando filtros Miracloth.

Inoculación e incubación en productos cárnicos curados. Se inocularon lonchas de jamón curado y salchichón obtenidas en condiciones asépticas con una concentración de 10^5 esporas/cm² y se introdujeron en recipientes esterilizados con soluciones saturadas de sales para conseguir humedades relativas controladas de 84 y 94%. Las muestras se incubaron durante 21 días a 25°C.

Extracción y detección de OTA. Las micotoxinas de los caldos inoculados se extrajeron empleando solventes orgánicos (acetónitrilo y cloroformo). En el caso de los productos cárnicos curados se utilizó el protocolo descrito por Rodríguez et al., 2012. La detección y determinación de la concentración de las micotoxinas se llevó a cabo mediante HPLC con detector ultravioleta.

Análisis estadístico. Para determinar las diferencias significativas entre las variables se empleó el Modelo Lineal General Univariante utilizando el paquete estadístico IBM-SPSS para Windows versión 19.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de OTA en medios de cultivo. Las tres cepas de mohos se desarrollaron satisfactoriamente entre 15 y 25°C, pero no se observó crecimiento a 30°C. El mayor crecimiento de *P. verrucosum* Pv45 se registró en YES a 20°C (107,95 mg), mientras que en el caso de *P. nordicum* se obtuvo en EC a 20 °C en la cepa Pn4 y a 15°C en la cepa Pn24. En cuanto al análisis de OTA, se detectó esta micotoxina en todas las condiciones en las que se observó crecimiento de los mohos estudiados, si bien, las concentraciones más altas se encontraron en YES y EC a 25°C, tanto en *P. nordicum* como en *P. verrucosum* (Figura 1). La a_w , en los valores evaluados, no tuvo influencia significativa en la producción de OTA.

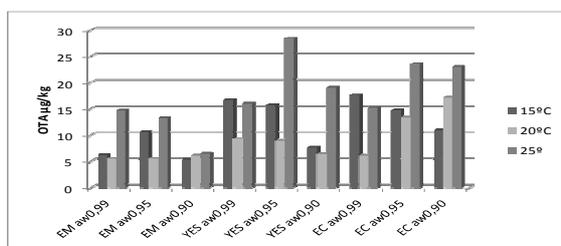


Figura 1: Producción de OTA por *P. verrucosum* en EM, YES y EC a diferentes a_w (0,99, 0,95 y 0,90) a 15, 20 y 25°C.

La obtención de los valores óptimos de crecimiento y de producción de OTA ante diferentes

condiciones ambientales, ponen de manifiesto que no existe una correlación directa entre el crecimiento fúngico y la capacidad de producción de micotoxinas en ninguna de las especies estudiadas. Dado que la capacidad de producción de OTA en las especies estudiadas varía con el sustrato nutritivo y las condiciones ambientales, resulta de interés evaluar la capacidad productora de OTA de dichas cepas cuando se desarrollan en los productos cárnicos crudos-curados.

Producción de OTA en productos cárnicos curados. *P. verrucosum* y *P. nordicum* fueron capaces de colonizar y producir OTA en la superficie del jamón y del embutido en las dos condiciones de humedad relativa evaluadas en el estudio. En los dos productos cárnicos la concentración de OTA fue mayor a los valores de a_w 0,84.

Tabla 1: Producción de OTA a 25°C por Pn24, pn4 y Pv45 ante distintas a_w (0,84 y 0,94) en jamón curado y salchichón.

CEPAS	µg/kg OTA			
	SALCHICHÓN		JAMÓN	
	a_w 0,84	a_w 0,94	a_w 0,84	a_w 0,94
Pn24	66,91	30,58	4,25	2,30
Pn4	60,05	37,54	4,37	3,16
Pv45	60,36	46,49	4,08	3,44

De acuerdo con los resultados obtenidos, *P. verrucosum* y *P. nordicum* aislados de jamón curado son capaces de desarrollarse y de producir OTA en diferentes combinaciones de las condiciones ambientales habituales durante el proceso de maduración de los productos cárnicos curados. Aunque es posible reducir el riesgo de acumulación de OTA evitando temperaturas altas (25°C), especialmente al final de la maduración cuando la a_w es más baja (próximo a 0,84), no se puede establecer un control eficaz del peligro por OTA en productos cárnicos crudos-curados únicamente mediante la modificación de las condiciones ambientales, por lo que es necesaria la aplicación de otras medidas preventivas como el uso de cultivos protectores capaces de inhibir el desarrollo de mohos toxigénicos.

BIBLIOGRAFÍA

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F., Córdoba, J. J. 2012. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. Food Control, 27, 118-126.

Agradecimientos. Estudio financiado por CDTI (IDI-20091171, IDI-20091172, IDI-20091174, IDI-20091176), proyecto AGL2010-21623 del Ministerio de Ciencia e Innovación y ayuda GR10162 del Gobierno de Extremadura y FEDER. Con la colaboración del Centro Tecnológico CICAP y las empresas COVAP, embutidos Camilo Ríos S.L., Hermanos Rodríguez Barbancho S.L., e Ibéricos de Bellota S.A.

Prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en cepas de VRE aisladas de carne de pollo en España

Diana Molina-González¹, Carlos Alonso-Calleja^{1,2}, Patricia Poeta³, Gilberto Igrejas⁴ y Rosa Capita^{1,2}

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, España, rosa.capita@unileon.es

² Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España

³ Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

⁴ Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

Si bien son escasas las evidencias que relacionan el consumo de alimentos contaminados con enterococos resistentes a vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*; VRE) con las infecciones humanas, la presencia de estos microorganismos en los alimentos supone un peligro indirecto derivado de la posibilidad de transferencia horizontal de genes de resistencia a diferentes microorganismos patógenos humanos a lo largo de la cadena alimentaria. En esta investigación se determinó la susceptibilidad de 38 cepas de VRE frente a 14 antimicrobianos en agar Mueller-Hinton utilizando la técnica de difusión por disco (CLSI). Se estudiaron un total 25 de genes (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *vanD*, *catA*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *pbp5*, *tet(B)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tndX* [Tn5397], *int* [Tn916/Tn1545], *ant(6)-Ia*, *aph(3')-IIIa* y *aac(6')-aph(2'')*) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las cepas fueron multirresistentes. Se observaron elevadas prevalencias de resistencia (más del 75% de las cepas) frente a piperacilina/tazobactam, cloranfenicol, eritromicina, ciprofloxacina, teicoplanina, estreptomicina, kanamicina, gentamicina, rifampicina y nitrofurantoína. Se detectaron los genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanD*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *pbp5*, *tet(L)*, *tet(M)*, Tn5397-*tndX*, *ant(6)-Ia*, *aph(3')-IIIa* y *aac(6')-aph(2'')* (los porcentajes de cepas positivas oscilaron entre el 2,63% y el 81,58%, dependiendo del gen considerado). La elevada prevalencia de genes de resistencia observada en carne de pollo es un motivo de preocupación en el contexto de la Seguridad Alimentaria y aconseja el establecimiento de medidas encaminadas a reducir la tasa de resistencia a antibióticos en este alimento, a la vez que pone de manifiesto la necesidad de unas prácticas higiénicas de manipulación.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos ha sido definida como una de las mayores amenazas para la Salud Pública en el Siglo XXI (WHO, 2014). En este contexto, las cepas de enterococos resistentes a los antibióticos, especialmente las resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*; VRE) suponen un importante desafío para el sistema sanitario, al provocar tasas de letalidad muy superiores a las causadas por las cepas sensibles.

La presencia de VRE en los alimentos implica un peligro tanto directo como indirecto para el consumidor. El peligro directo, del cual hay poca evidencia científica, estaría relacionado con la ingestión de los microorganismos y la consiguiente infección. Cabe destacar la gran importancia de la presencia de VRE en los alimentos como peligro indirecto, ante la posibilidad de transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones o integrones portadores de genes que confieren resistencia a antibióticos) a diferentes bacterias patógenas, incluso a géneros no relacionados (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

La habilidad de los enterococos para adquirir genes de resistencia a antibióticos, basada en los eficientes mecanismos de transferencia que han desarrollado

estas bacterias a lo largo de los años, hace que tengan la consideración de reservorios de genes de resistencia a antibióticos, lo que, además de ser un motivo de preocupación en el ámbito de la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria, permite su utilización como microorganismos indicadores o centinela de resistencia.

Los objetivos de este estudio han sido determinar los patrones de resistencia a antibióticos y detectar los genes de resistencia presentes en cepas de VRE aisladas de carne de pollo en España.

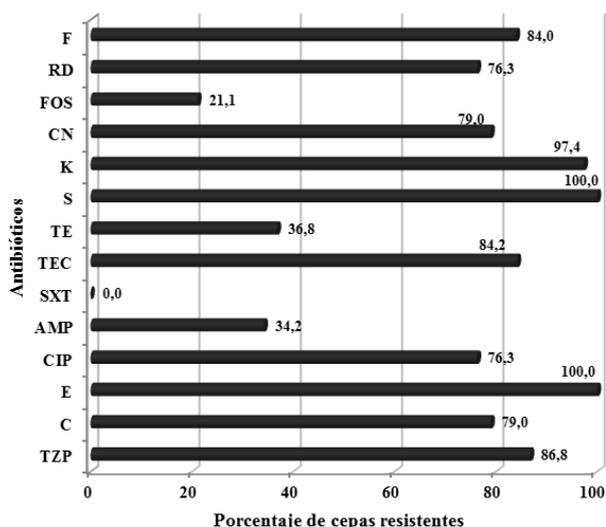
MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 38 cepas de VRE aisladas de carne de pollo en la provincia de León correspondientes a las especies *Enterococcus avium* (una cepa), *E. durans* (16) y *E. faecium* (21). Se ensayó la susceptibilidad frente a un panel de 14 antimicrobianos en agar Mueller-Hinton utilizando la técnica de difusión en disco. La interpretación de los halos de inhibición se realizó siguiendo los criterios del *National Committee for Clinical and Laboratory Standards*. La detección de los genes de resistencia (25) se realizó utilizando la técnica de PCR empleando los cebadores y condiciones descritos con anterioridad (Poeta y col. 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas fueron multirresistentes, presentando resistencia frente a entre dos y 11 de los antimicrobianos ensayados. El número medio de resistencias por cepa fue de 3,00 (*E. avium*), 6,69 (*E. durans*) y 6,14 (*E. faecium*). En la Figura 1 se muestran los porcentajes de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos utilizados, que oscilaron entre el 0% (trimetoprim/sulfametoxazol) y el 100% (eritromicina y estreptomicina).

Hay que señalar que la presencia de microorganismos resistentes a antibióticos en carne de ave es un hallazgo frecuente y está altamente relacionada con el empleo de antibióticos en producción animal, desempeñando un papel importante los mecanismos de resistencia cruzada, co-resistencia y las mutaciones compensatorias (Álvarez-Fernández y col., 2013).



Piperacilina/tazobactam (TZP); cloranfenicol (C); eritromicina (E); ciprofloxacina (CIP); ampicilina (AMP); trimetoprim/sulfametoxazol (SXT); teicoplanina (TEC); tetraciclina (TE); estreptomina (S); kanamicina (K); gentamicina (CN); fosfomicina (FOS); rifampicina (RD); nitrofurantoina (F).

Figura 1: Porcentajes de cepas de VRE resistentes a cada antimicrobiano utilizado.

Los genes de resistencia a la vancomicina se estudiaron en las 38 cepas ensayadas. Los mayores porcentajes de detección se correspondieron con los genes *vanA* (31 cepas) y *vanC1* (21 cepas). El gen *vanC3* no se detectó en ninguna de las cepas analizadas. En la Figura 2 se muestran gráficamente los porcentajes de cepas con los genes analizados.

En ninguna de las cepas resistentes al cloranfenicol se ha detectado el gen *catA*. El gen *erm(A)* se ha detectado en 34 cepas, lo que supone el 89,47% de las cepas resistentes y con resistencia intermedia a la eritromicina, el gen *erm(B)* en 31 cepas (81,57%) y el gen *erm(C)* en 3 cepas (7,9%).

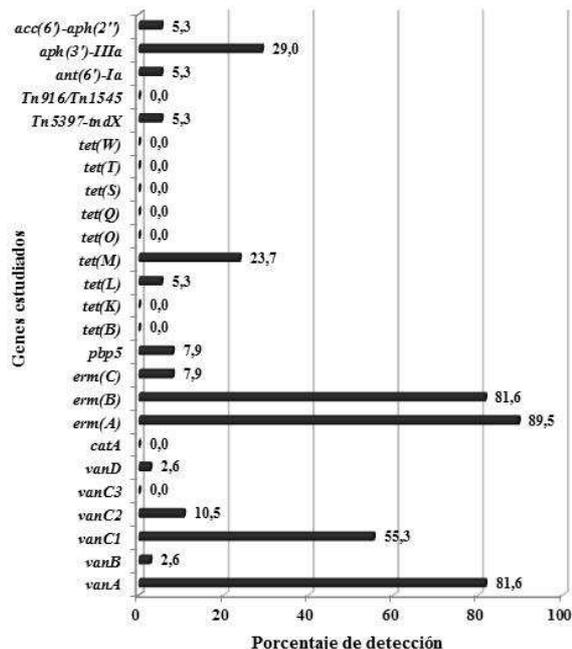


Figura 2: Porcentajes de cepas con los genes analizados.

El gen *pbp5* se detectó en 3 de las 13 cepas resistentes a la ampicilina. Las 14 cepas con resistencia a tetraciclina presentaron los genes *tet(L)* (2 cepas) y *tet(M)* (9 cepas). Otros genes detectados fueron *Tn5397-tndX* (2 cepas) *ant(6')-Ia* (2 cepas), *aph(3')-IIIa* (11 cepas) y *aac(6')-aph(2'')* (2 cepas).

Como conclusión final, señalar que la carne de pollo es un reservorio importante de cepas de VRE resistentes a antibióticos de importancia clínica. Ello pone de manifiesto la necesidad de una correcta manipulación de estos alimentos. Asimismo se enfatiza la conveniencia de un uso prudente de antibióticos en producción primaria de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díez-Vega, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. 2013. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: a comparison of agar disc diffusion and *Sensi Test Gram-negative* methods. *Food Control* 30:227-234.

Capita R., Alonso-Calleja C., 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the Food Industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53:11-48.

Poeta, P., Costa, D., Iglesias, G., Rodrigues, J., Torres, C. 2007. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Vet. Microbiol.* 125:368-374.

WHO (World Health Organization). 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Press, Geneva, Italy.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido subvencionado por la Junta de Castilla y León (LE013A10-2).

***Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. en productos cárnicos frescos. Zaragoza 2008-2013.**

M. Asunción Lafarga¹, Carlos Ruiz², Pilar Martínez¹, Julián Ezquerro¹, Alicia Pérez² y Mercedes Navarro³

¹ Laboratorio de Microbiología. ² Higiene de los Alimentos. ³ Dirección. Instituto Municipal de Salud Pública. Zaragoza. España. malafarga@zaragoza.es

INTRODUCCIÓN

Campylobacter y *Salmonella* son los dos agentes de zoonosis transmitidas por alimentos más importantes. Su reservorio principal es el tracto intestinal de muy diversos animales, tanto domésticos como salvajes. La transmisión puede ser por contacto directo o por contaminación fecal de agua o alimentos. La transmisión alimentaria se produce cuando los microorganismos son introducidos en las zonas de preparación de alimentos, por contaminación cruzada, cocción incompleta, o malas condiciones de conservación (EFSA, 2014).

En Europa, *Campylobacter* continúa siendo el patógeno bacteriano gastrointestinal más informado, con una tasa de 55,49 casos por cada 100.000 habitantes en 2012. El número de casos de campilobacteriosis humana ha seguido una tendencia ascendente en los últimos años. En España la tasa de campilobacteriosis por cada 100.000 habitantes es de 47,53 (EFSA, 2014). En los años 2006 a 2011 se observó una ligera disminución de los casos notificados (CNE, 2013).

Salmonella es el segundo patógeno alimentario por número de casos y el primero por brotes. En Europa, con una media de 22,2 casos por 100.000 habitantes en 2012, hay una tendencia marcadamente decreciente por la eficacia de las medidas de control, especialmente en aves. La reducción más importante parece haberse obtenido en la contaminación de huevos y en el serotipo S. Enteritidis, mientras que otros serotipos han aumentado. En España el número de casos informado no muestra esa marcada disminución, y se mantienen en una tasa de 36,2 casos confirmados por cada 100.000 habitantes, además es también uno de los países europeos con mayor número de brotes (EFSA 2014).

Para prevenir la transmisión de zoonosis, es fundamental identificar qué animales y alimentos son las principales fuentes de infección. *Salmonella* y *Campylobacter* pueden aislarse en un amplio abanico de alimentos, pero con mayor frecuencia de carne y productos cárnicos (EFSA 2013).

En el Instituto Municipal de Salud Pública de Zaragoza, estudiamos la presencia de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* termotolerantes en diferentes grupos

de alimentos. Presentamos en este trabajo los resultados en muestras de carne y productos cárnicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación de *Campylobacter* termotolerantes se ha realizado por cultivo, siguiendo la ISO 10272-1 y utilizando el Medio de Preston como segundo medio de aislamiento. El tamaño de la muestra ha sido de 25 g.

Hasta el año 2009, la detección de *Salmonella* se ha realizado por cultivo, ISO 6519, utilizando el medio de Rapaport semisólido, y un agar crógeno como segundo medio de aislamiento. A partir del año 2010 se ha combinado con una técnica de PCR en tiempo real, IQ-Check de Biorad®, confirmado los positivos por cultivo. La determinación se ha realizado en 25 g de muestra en el caso de productos derivados de ave y en 10 g. en el caso de productos de ganado bovino y porcino.

Las muestras se han recogido en comercio minorista y obradores de carnicería con venta directa al consumidor: carnes picadas, salchichas y hamburguesas de pollo y/o pavo (aves); carnes picadas, salchichas, hamburguesas, longaniza y chorizo fresco de porcino y/o bovino (P/B).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados por años y muestras positivas. Como puede observarse, la media de muestras positivas es del 21,45 % para *Campylobacter* y del 5,99 % para *Salmonella*. Para estudiar los resultados de una forma pormenorizada, se han reagrupado por microorganismo y por tipo de producto diferenciando los de aves y los de porcino y bovino.

***Campylobacter* en muestras de productos cárnicos.**

En la tabla 2 aparecen pormenorizados los resultados de *Campylobacter* en los dos grupos de muestras de productos cárnicos, aves y porcino/bovino. Hemos reagrupado los datos por bienios para tener un número mayor y por tanto más representativo de muestras en cada grupo.

La proporción de muestras contaminadas con *Campylobacter* es muy alta en aves, con un 58,59 %. Esta frecuencia tan alta de productos contaminados supone un riesgo directo, si estos alimentos se consumen inadecuadamente cocinados, y también

indirecto al ser fuente de contaminación cruzada hacia alimentos listos para el consumo.

Tabla 1: Muestras de productos cárnicos positivas para *Salmonella* y *Campylobacter* durante los años 2008 a 2013.

Año	Numero total muestras	Pos. <i>Campylobacter</i>		Pos. <i>Salmonella</i>	
		Nº	%	Nº	%
2008	50	3	6,00	6	12,00
2009	60	7	11,67	1	1,67
2010	70	21	30,00	3	4,29
2011	77	14	18,18	6	7,79
2012	66	18	27,27	3	4,55
2013	78	23	29,49	5	6,41
Total	401	86	21,45	24	5,99

Los resultados de muestras de alimentos positivas recogidos por la agencia europea oscilan entre 0 y 86,6 %. Aunque la comparación es difícil, por las diferencias en el tipo de muestras, provenientes más de mataderos y plantas de procesamiento que de comercio menor, y más muestras de canales y de carnes que de productos cárnicos, además por los diferentes tamaños de muestra. Aun así nuestros resultados son bastante comparables al 50% de muestras positivas de carnes y producto cárnicos de ave informadas por nuestro país, en 2012 (EFSA, 2014).

Tabla 2: Muestras de productos cárnicos positivas para *Campylobacter* según origen del producto cárnico.

Año	Porcino y bovino			Aves		
	Total	Nº	%	Total	Nº	%
2008/09	89	4	4,49	21	6	28,57
2010/11	11	9	8,11	36	26	72,22
2012/13	102	15	14,71	42	26	61,90
Total	302	28	9,27	99	58	58,59

El número de muestras en otros productos cárnicos es más bajo, relacionado también con los porcentajes de contaminación descritos en estos productos en nuestro entorno (EFSA 2013). Sin embargo en nuestros resultados se observa una tendencia ascendente con casi un 15 % de muestras positivas en los dos últimos años, especialmente por productos cárnicos de cerdo, contaminados con *Campylobacter coli* (datos no recogidos en las tablas).

Salmonella en productos cárnicos.

En la tabla 3 podemos ver los resultados de *Salmonella* en los dos grupos de muestras de productos cárnicos, aves y porcino/bovino.

El porcentaje de muestras contaminadas con *Salmonella* es mucho menor que las contaminadas con *Campylobacter*, en aves un 10,10 % y en porcino/bovino de un 4,64 %. La tendencia a lo largo

del tiempo parece disminuir en el caso de aves y mantenerse en el resto. Esto podría relacionarse con las medidas de control aplicadas en los últimos años.

Tabla 3: Muestras de productos cárnicos positivas para *Salmonella* según origen del producto cárnico.

Año	Porcino y bovino			Aves		
	Total	Nº	%	Total	Nº	%
2008/09	89	3	3,37	21	4	19,05
2010/11	11	7	6,31	36	2	5,56
2012/13	102	4	3,92	42	4	9,52
total	302	14	4,64	99	10	10,10

Al igual que en el caso de *Campylobacter*, los resultados no se pueden comparar directamente con los de los informes europeos por los tipos, tamaños y orígenes de las muestras. Nuestros resultados en aves, pueden considerarse intermedios entre el 8,7 informado en un grupo semejante, el de carnes y productos cárnicos de pollo, destinados a ser consumidos cocinados y el 14,8 % informado por nuestro país en carne de pollo, todos en cantidades de muestra de 25 g. (EFSA 2014). El porcentaje de muestras positivas en productos de porcino y bovino, es intermedio a los informados por España en 2012, 2,7 % en derivados de cerdo en plantas procesadoras y el 0,9 -11,6 % en vacuno de matadero y de otras procedencias. En general, estas frecuencias de positivos son bastante mayores que la media del conjunto de los datos europeos (EFSA, 2014).

Comparando los resultados del periodo 2008-2013 en estudio, con los obtenidos en nuestro laboratorio en años anteriores, 23,85 % en aves y 9,58 % en bovino y ovino (Lafarga y col., 2007), la reducción en el número de muestras positivas de *Salmonella* en estos grupos de alimentos cárnicos es todavía más marcada.

BIBLIOGRAFÍA

- EFSA, European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control, 2014, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 2014;12(2):3547.
- EFSA, European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control, 2013, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 2013;11(4):3129.
- CNE, Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2011, Madrid, 2013.
- Lafarga Gil, MA.; Blasco Sancho, MD. Martínez Gimeno MP., Castillo García, JF.y Navarro Elipse, M. 2007, Alimentaria, abril 07, pp 100-104.

Potencial uso del propóleo en combinación con calor para lograr la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 en zumo de manzana

Adrián Luis, Laura Espina, Diego García-Gonzalo y Rafael Pagán

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España, 590868@unizar.es

En este trabajo se ha investigado el potencial uso del propóleo en combinación con el calor para la mejora de la conservación del zumo de manzana. El objetivo fue describir las condiciones de tratamiento del zumo de manzana necesarias para lograr la inactivación de 5 ciclos \log_{10} *E. coli* O157:H7. Como resultado, se ha observado un intenso efecto sinérgico: La presencia de 200 ppm de propóleo durante el tratamiento térmico ha permitido reducir el tiempo de tratamiento necesario para la inactivación de 5 ciclos \log_{10} *E. coli* O157:H7 aproximadamente un 85 % o la temperatura de tratamiento en aproximadamente 6°C en el rango estudiado. Estos resultados muestran la posibilidad de diseñar procesos combinados para la producción de nuevos zumos mínimamente procesados.

INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de reducir la incidencia de brotes de toxiinfecciones alimentarias originadas en zumos, la FDA (FDA, 2001) estableció para los productores de zumo la exigencia de lograr una reducción de 5 ciclos \log_{10} de *Escherichia coli* O157:H7, el microorganismo de importancia en Salud Pública más resistente encontrado en los zumos (Mazzotta, 2001).

Para conseguir este objetivo, generalmente los zumos comerciales se someten a un tratamiento térmico. Sin embargo, dicho tratamiento frecuentemente empeora las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos (Mañas y col., 2005). Como alternativa, una estrategia que se ha mostrado exitosa es el desarrollo de nuevos procesos combinados basados en la aplicación de un tratamiento térmico que además de inactivar microorganismos genere daños en las envolturas celulares de una gran proporción de la población microbiana superviviente, junto con un antimicrobiano que aproveche dichos daños causados, potenciando su entrada y /o acción (Espina y col., 2012).

Sin embargo, debido a la tendencia actual hacia un menor uso de conservantes químicos, se ha intensificado la búsqueda y sustitución de éstos por conservantes naturales. Entre estos antimicrobianos naturales, el propóleo es un producto apícola utilizado en la medicina tradicional como antimicrobiano (Sforcin y col., 2011) cuyo potencial uso en procesos combinados permanece prácticamente inexplorado.

El objetivo del trabajo fue describir el potencial uso del propóleo en combinación con el calor para lograr la inactivación de 5 ciclos \log_{10} *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana

MATERIAL Y MÉTODOS

Propóleo. En esta investigación se ha utilizado un Extracto de Propóleo en Propilenglicol (EPP) al 20% suministrado por “Miel El Albar” (Zaragoza, España). Las concentraciones que aparecen a lo largo del estudio se refieren a propóleo bruto.

Microorganismos y condiciones de cultivo. En esta investigación se ha utilizado la cepa no patógena de *Escherichia coli* O157:H7 Sakai *stx IA/stx 2A*. Los cultivos se obtuvieron tras la inoculación de frascos de 50 mL de Caldo Triptona Soja con 0,6% de extracto de levadura (TSBEL) (concentración inicial: 10^6 UFC/mL) a partir de un precultivo (12-18 h/37°C) y posterior incubación bajo agitación a 37°C hasta alcanzar fase estacionaria (24 h).

Determinación de la resistencia microbiana al calor y a los tratamientos combinados. Las determinaciones de resistencia al calor y a los tratamientos combinados se realizaron en el termorresistómetro TR-SC. Tras centrifugar los microorganismos, se resuspendieron en zumo de manzana comercial (Don Simón, Madrid, España). Esta suspensión se inoculó para alcanzar una concentración inicial de tratamiento de 3×10^7 UFC/mL en el TR-SC. Los tratamientos combinados se llevaron a cabo añadiendo EPP a los medios de tratamiento para conseguir una concentración de 200 ppm de propóleo.

Recuento de supervivientes y estimación de daño subletal. Tras los experimentos se realizó el recuento de los supervivientes tras la siembra por homogeneización en masa en Agar Triptona Soja con 0,6% EL (TSAEL); y en TSAEL con 4% NaCl (TSAEL-NaCl) y TSAEL con 0,25 % de sales biliares (TSAEL-SB) para detectar daño subletal en la membrana citoplasmática y externa respectivamente.

Estudio de la cinética de inactivación microbiana. Se construyeron las curvas de supervivencia representando el \log_{10} de la fracción de supervivientes frente al tiempo, y se modelizaron mediante una modificación de la ecuación de Mafart y col (2002), para calcular el tiempo necesario para inactivar 5 ciclos \log_{10} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se determinó la resistencia al calor de *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana comercial y la formación de daños subletales en las envolturas celulares. Como muestra la Figura 1, tras 20 minutos a 51 °C la inactivación en medio no selectivo fue menor de 1 ciclo \log_{10} , sin embargo, más del 90 % y del 99% de las células supervivientes estaban dañadas en su membrana citoplasmática y en su membrana externa respectivamente.

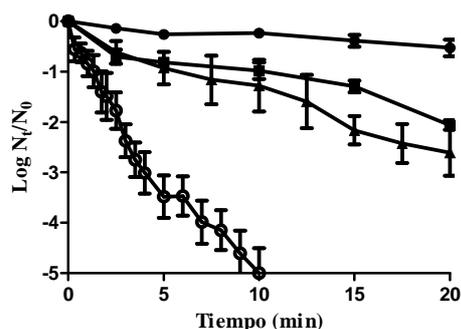


Figura 1: Gráfica de supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 Sakai a un tratamiento térmico a 51°C en zumo de manzana (●, ■, ▲), y en presencia de 200 ppm de propóleos (□). Los supervivientes se recuperaron en medio no selectivo (●, □), y selectivo con NaCl (■) y sales biliares. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Ya que la presencia de daños subletales es un indicador del posible sinergismo entre el calor y los antimicrobianos (Espina y col., 2010) se investigó el efecto antimicrobiano de este tratamiento térmico en presencia de propóleos. El tratamiento combinado (Figura 1) fue mucho más eficaz que la aplicación por separado del tratamiento térmico y el de propóleos requiriendo tan sólo 10 minutos para lograr los 5 ciclos \log_{10} de inactivación de *E. coli* O157:H7, lo que equivaldría a una reducción del tratamiento térmico de aproximadamente 6 veces.

La utilidad del proceso combinado a nivel industrial depende del mantenimiento del efecto sinérgico a mayores temperaturas. Por tanto, se estudió el efecto de la temperatura en el sinergismo detectado entre ambas barreras. La comparación de la gráfica TDT de los tratamientos térmicos en presencia y ausencia de propóleos (Figura 2), permitió evidenciar el mantenimiento del efecto sinérgico a mayores temperaturas. Además, los valores z (datos no mostrados), indican que el efecto sinérgico aumenta ligeramente a medida que se incrementa la temperatura de tratamiento en el rango estudiado.

El sinergismo observado en el tratamiento térmico en presencia de propóleos es de una mayor magnitud que el determinado en presencia de otros

antimicrobianos naturales (Espina y col., 2010, 2012), permitiendo una mayor reducción en la intensidad del tratamiento térmico. La presencia de 200 ppm de propóleos en el medio de tratamiento permitiría la disminución de la intensidad del tratamiento térmico, mediante la reducción del tiempo de tratamiento aproximadamente un 85%, o de la temperatura de tratamiento en aproximadamente 6 °C, en el rango de temperaturas estudiadas (51-57 °C).

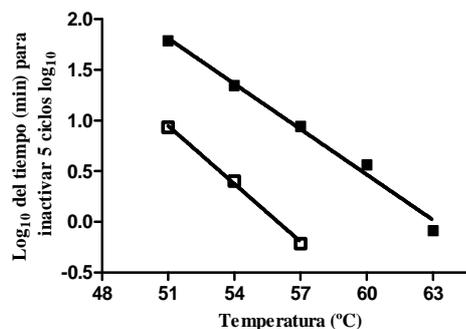


Figura 2: \log_{10} del tiempo para inactivar 5 ciclos \log_{10} de *Escherichia coli* O157:H7 Sakai en función de la temperatura de tratamiento en zumo de manzana comercial estéril, con ausencia (■) y en presencia de 200 ppm de propóleos (□) en el medio de tratamiento. Las líneas representan las líneas de regresión para un ajuste lineal a partir de los datos experimentales.

Estos resultados muestran la posibilidad de diseñar procesos combinados para la producción de nuevos zumos mínimamente procesados.

BIBLIOGRAFÍA

- Espina, L., Somolinos, M., Ouazzou, A. A., Condón, S., García-Gonzalo, D., Pagán, R. 2012, Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *Int. J. Food Microbiol.*, 159:9-16.
- Espina, L., Somolinos, M., Pagán, R., García-Gonzalo, D. 2010. Effect of citral on the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in citrate phosphate buffer and apple juice. *J. Food Prot.*, 73:2189-2196.
- FDA (2001). "Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice, final rule." *Federal Register* 66(13):6138-6202.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. 2002, On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.*, 72:107-113.
- Mañas, P., Pagán, R. 2005, Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *J. Appl. Microbiol.*, 98:1387-1399
- Mazzotta, A. S. 2001, Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *J. Food Prot.*, 64:315-320.
- Sforzin, J. M., Bankova, V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.*, 133:253-260.

Inactivación térmica de diferentes patógenos alimentarios en medios de distinto pH y actividad de agua

M^a J. Serrano, Pilar Mañas y Santiago Condón

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, scondon@unizar.es

Actualmente, son pocos los estudios comparativos de resistencia microbiana llevados a cabo bajo las mismas condiciones. El estudio de 18 cepas de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* reveló la existencia de un valor z común para todos excepto para *L. monocytogenes* cualesquiera fuesen el pH y a_w del medio de tratamiento. Así mismo, de estas tres especies *S. aureus* fue la más termorresistente y *Salmonella* la más sensible. Puesto que la termodependencia de *L. monocytogenes* fue diferente, su resistencia relativa cambió en función de las características del menestruo.

INTRODUCCIÓN

El principal método de inactivación de patógenos alimentarios continúa siendo en la actualidad el calor. Es un hecho bien conocido que la termorresistencia microbiana varía ampliamente, no solo entre especies sino también entre cepas. Además, en ocasiones las características del alimento pueden también modificar la resistencia al calor de las distintas especies/cepas.

En los datos publicados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) correspondientes al año 2012 se observa que el número de infecciones causadas por *Listeria monocytogenes* aumentó, con respecto a años anteriores, siguiendo una tendencia creciente entre los años 2008-2012, causando 198 muertes (17,8% de los casos) y estableciéndose así como uno de los patógenos alimentarios de mayor relevancia. Las toxiinfecciones alimentarias causadas por *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium continuaron situándose entre las más importantes, en cuanto a número (108.614 casos), a pesar de su descenso frente a años anteriores. Mientras, las causadas por las cepas verotoxigénicas de *Escherichia coli* y por toxinas alimentarias (grupo dentro del cual se incluye *Staphylococcus aureus*) fueron menos numerosas, pero graves, mostrando una tendencia creciente (EFSA Journal 2014;12(2):3547).

Aunque existen numerosos datos en la bibliografía en relación a los efectos del componente genético y del medio de tratamiento sobre la resistencia microbiana al calor, a día de hoy resulta imposible llegar a conclusiones definitivas, dada la diversidad metodológica utilizada. Es por ello que resulta de interés comparar la termorresistencia de diferentes patógenos alimentarios con el fin de establecer los criterios de proceso de productos con diferentes características físico-químicas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, en idénticas condiciones experimentales, los cambios en termorresistencia de distintas cepas de *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S.aureus*; y estudiar, sobre la

cepa más resistente de cada grupo, los efectos del pH y la actividad de agua (a_w) del medio de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas en esta investigación fueron: *Escherichia coli* ATCC 27325, CECT 471, CECT 4201, W3110 y O157:H7; *Listeria monocytogenes* CECT 4031, CECT 4032, CECT 5366, CECT 5672 y CECT 932; *Salmonella* Enteritidis CECT 13076 y *Salmonella* Typhimurium CECT 443 y CECT 878; *Staphylococcus aureus* CECT 976, CECT 4465, CECT 4466, CECT 4459 y CECT 435. Las cepas se mantuvieron congelados a -80°C en crioviales. Los cultivos se obtuvieron en caldo tripticasa-soja (Biolife, Milan, Italia) suplementado con un 0,6% de extracto de levadura (TSBYE), incubando a $35/37^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Los cultivos en fase estacionaria contenían 2×10^9 UFC/mL, aproximadamente.

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo en un termorresistómetro TRSC según se ha descrito previamente (Condón S. y col., 1993). Los medios de tratamiento utilizados fueron tampones citrato-fosfato de distintos pH (7, 5,5 y 4) y a_w ($a_w > 0,99$, 0,97 y 0,94). La a_w se ajustó añadiendo las cantidades adecuadas de glicerol. Una vez estabilizadas las condiciones de tratamiento se inoculaba la suspensión de microorganismos y, a intervalos adecuados de tiempo, se extraían muestras representativas. El cultivo de supervivientes se realizó inoculando en masa placas con agar tripticasa-soja (Biolife) suplementado con un 0,6% de extracto de levadura (TSAYE). Las placas se incubaron a $35/37^{\circ}\text{C}$ durante 24-48h, y posteriormente se contaron con un contador automático de colonias por análisis de imagen (Protos, UK) según se ha descrito (Condón S. y col., 1987). Las gráficas de supervivencia se modelizaron con la ecuación de Geeraerd (GinaFit., Geeraerd A.H., 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En una primera fase se estudió la termorresistencia a una temperatura, en los cinco medios de tratamiento, de todas las cepas investigadas, resultando *E.coli* O157H7, *L.monocytogenes* 4032, *S.aureus* 4459 y *S. Typhimurium* 878 las cepas más termorresistentes (Fig.1) de cada género.

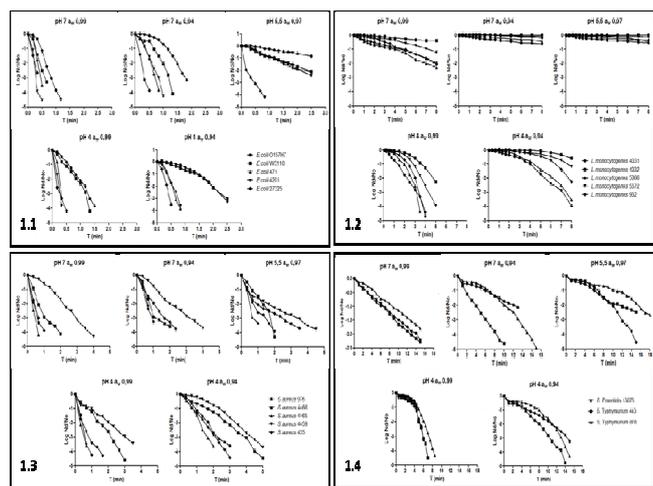


Figura 1. Gráficas de supervivencia a 60 °C de las 18 cepa en medios de distinto pH y actividad de agua.

Posteriormente estudiamos la termorresistencia de las cepas seleccionadas –las más termorresistentes- a distintas temperaturas (Figura 2).

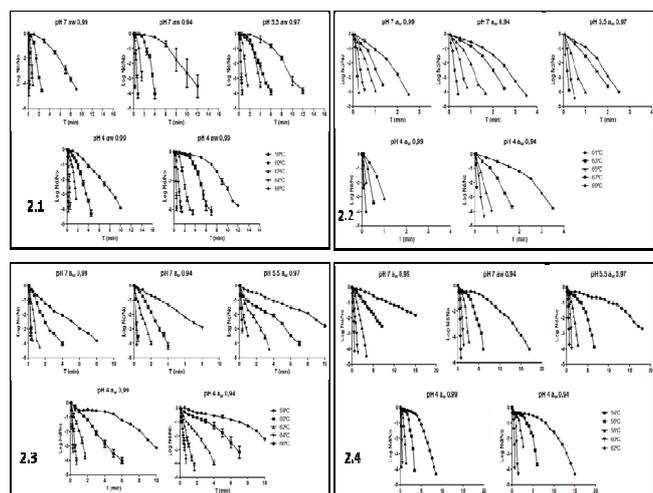


Figura 2. Gráficas de supervivencia a distintas temperaturas de: *E.coli* (Fig 2.1), *L.monocytogenes* (Fig 2.2), *S.aureus* (Fig 2.3) y *S. Typhimurium* (Fig 2.4).

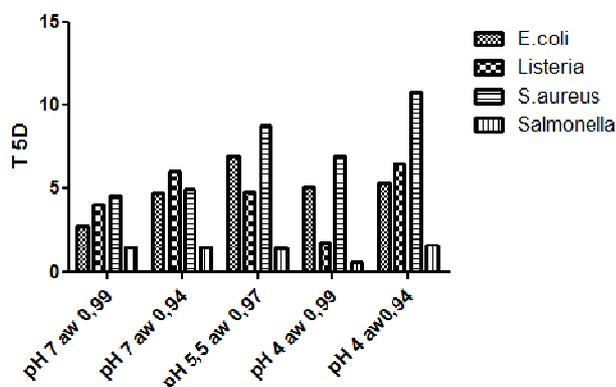


Figura 3. Tiempos de tratamiento a 60°C para garantizar 5 ciclos de inactivación.

Puesto que las gráficas de supervivencia mostraban hombros en la mayoría de los casos (Fig 2), decidimos ajustarlas con el modelo de Geeraerd y fijar como criterio de rendimiento 5D, lo que nos permitiría realizar comparaciones directas. La fig 3 muestra los tiempos de tratamiento a 60 °C precisos para garantizar cinco ciclos de inactivación de las cepas más resistentes de cada género en los medios de diferentes características físico-químicas. Como se observa en la figura 3, *S.aureus* resultó ser la especie más resistente al calor y *Salmonella* la más sensible en la mayoría de los medios, aunque *Listeria* fue más resistente en el medio de pH 7 aw 0,94 y mostró una resistencia intermedia en el resto de medios

Como es bien sabido, la resistencia relativa puede cambiar con la temperatura, por lo que decidimos construir las curvas de muerte térmica (TDT), tomando como criterio de rendimiento 5 ciclos de inactivación (Fig 4).

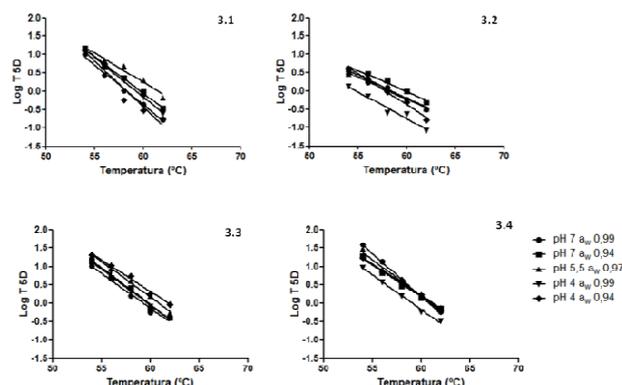


Figura 3. Gráficas de termodestrucción para *E.coli* (Fig 3.1), *L.monocytogenes* (Fig 3.2), *S.aureus* (Fig 3.3) y *S. Typhimurium* (Fig 3.4).

Un análisis estadístico (ANOVA) de los valores z obtenidos a partir de las líneas TDT puso de manifiesto la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores z de *E.coli*, *Salmonella* y *S.aureus* ($z_{E.coli,S.aureus,Salmonella} = 5,19 \pm 0,46$), mientras que para *L.monocytogenes* se obtuvo un $z_{L.monocytogenes} = 8 \pm 0,8$ en todos los medios, a excepción del de pH 4 aw 0,94 ($z = 5,87 \pm 0,5$).

BIBLIOGRAFÍA

Condón S., Oria R., Sala F.J. 1987. "Heat resistance of microorganisms: an improved method for survival counting". *J. Microbiol.Methods* 7: 1, 37-44.

Condón S., Arrizubieta M.J., Sala F.J. 1993. "Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the TR-SC". *J. Microbiol.Methods* 18:4, 357-366.

Geeraerd A.H., Valdramidis V.P., Van Impe J.F. 2005. "GInaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves." *International J. Food Microbiol.* 102: 95– 105

Riesgos sanitarios del consumo de potón (*Dosidicus gigas*)

Rocío Lahoz, Virginia Ruiz y Santiago Condón

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, 612421@unizar.es

Las especies contaminantes mayoritarias del potón son: *Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp* y *Serratia spp*. No es previsible que el consumo del potón represente un peligro para la salud pública si se almacena a temperaturas de 4 °C o inferiores, pero a temperaturas superiores *Aeromonas spp* podría constituir un peligro a considerar. El tiempo máximo de almacenamiento para evitar este peligro puede calcularse con la ecuación: $\text{Log tiempo} = 2,5 - 0,056 T^a$.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante es una de las alternativas más prometedoras como sustituto de los cefalópodos de consumo tradicional; sin embargo, la calidad microbiológica del producto es difícil de mantener dado que en su procesado se incluye una etapa de marinado, normalmente de 48 horas, durante la que puede crecer la flora contaminante de la materia prima.

La musculatura del pescado en general es un excelente sustrato para el desarrollo microbiano debido a su elevada actividad de agua, su pH neutro y sus altos niveles de nutrientes solubles. La alteración microbiana del pescado se describe como un proceso proteolítico, que conduce a la alteración del producto, aunque en determinados casos también puede tener connotaciones sanitarias por la multiplicación de especies patógenas. En los moluscos, además, se produce la degradación del glucógeno lo que conduce a un descenso del pH a medida que se acumulan los ácidos residuales.

Los géneros que predominan en el pescado son: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Alkaligenes*, *Shewanella* y *Flavobacterium*., entre las alterantes, y especies de los géneros *Vibrionaceae* y *Aeromonas*, entre las patógenas. Estas últimas son típicas del medio marino debido a que necesitan sodio para su crecimiento. Existen muy pocos datos sobre la contaminación microbiana de los cefalópodos.

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las especies microbianas mayoritarias del potón, establecer la existencia de posibles especies patógenas y determinar el tiempo durante el cual el consumo del producto no representaría un riesgo sanitario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con materia prima congelada, gentilmente suministrada por la empresa Zarafish (Zaragoza). Una vez descongelados, los rejos se trocearon y se introdujeron en frascos de vidrio, estériles, de 100 mL, que contenían, como medio de marinado, una solución acuosa de citrato sódico (Panreac; España) 0,1 M, previamente atemperada a la temperatura deseada: 16°C,

12°C, 8°C, 4°C y 1°C. En todos los casos se mantuvo constante una relación sólido/líquido 1:3 (p/v). Posteriormente, los frascos se incubaron en estufas bacteriológicas a las temperaturas antes descritas. A tiempos determinados se realizaron los recuentos microbiológicos del agua de marinado. Las muestras se diluyeron con agua de peptona tamponada 0,1% (p/v) (Biolife, Italia) y se sembraron en masa en agar triptona soja (Biolife) suplementado con extracto de levadura al 0,6% (p/v) (Biolife) (TSAYE). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas tras comprobar que incubaciones más prolongadas no aumentaban significativamente los recuentos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas se contaron con un contador automático de colonias por análisis de imagen (Protos, Inglaterra). A lo largo de la incubación se aislaron, en TSAYE, colonias de la población mayoritaria de aquellas placas cuyo aspecto era más homogéneo. Las colonias fueron enviadas para su identificación genotípica a una empresa especializada (Alquiz Vetez; Zaragoza). Las curvas de crecimiento de las cepas aisladas e identificadas se realizaron de manera semejante a la ya descrita, utilizando como medio de crecimiento TSBYE. Los experimentos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la curva de crecimiento de la flora mixta de los rejos del potón incubados a 8 °C.

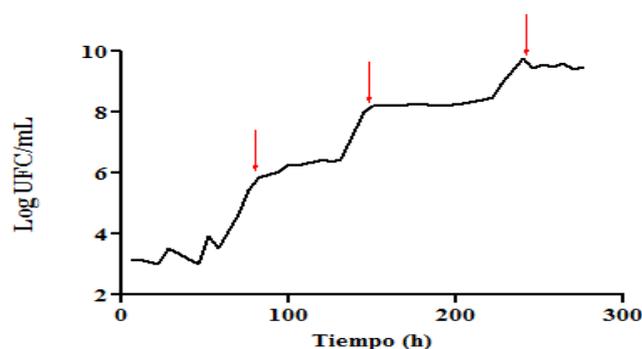


Figura 1: Evolución de la flora del potón a 8°C.

Como muestra la Figura 1 la curva de crecimiento mostraba un crecimiento irregular en lo que suele considerarse la fase de crecimiento exponencial. Las mesetas intermedias podían deberse a cambios en las

características físico-químicas del medio o a cambios de la flora predominante. Aparentemente esta segunda posibilidad parecía la más probable dado que mientras que en la primera meseta las placas presentaban mayoritariamente colonias de color blancuzco, en la segunda eran de tonos marrones y en la tercera rojas.

El aislamiento y la caracterización de la secuencia nucleotídica de la flora mayoritaria en cada una de estas mesetas permitió identificarlas respectivamente como: *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* y *Serratia spp.*, todas con más de un 99% de similitud.

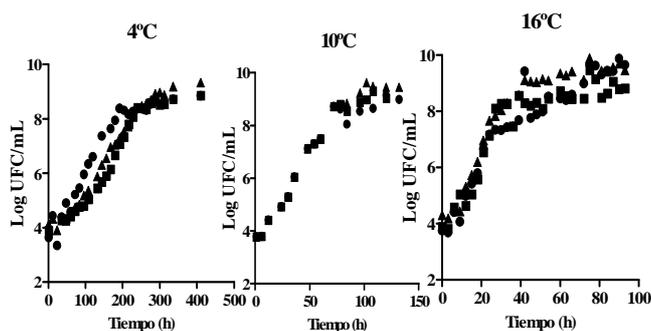


Figura 2: Curvas de crecimiento a 4, 10 y 16°C de las especies contaminantes del potón: (●) *Pseudomonas* sp, (■) *Aeromonas* sp, (▲) *Serratia* sp.

La figura 2 muestra las curvas de crecimiento de cada una de las especies aisladas de la materia prima, cultivadas en TSBYE e incubadas a diferentes temperaturas. Como se observa en la figura las tres especies son capaces de crecer rápidamente incluso a 4 °C, si bien a esta temperatura la *Pseudomonas spp* mostró una fase de latencia menor y una velocidad de duplicación mayor. A temperaturas superiores la velocidad de duplicación de las tres especies fue similar.

De las tres especies aisladas solo *Aeromonas spp* podría representar un peligro para la salud pública. Puesto que la alteración del producto comienza cuando los recuentos sobrepasan las 10^6 ufc/gr no es previsible que a 4 °C el producto pueda representar un peligro para los consumidores dado que el potón manifestará alteraciones organolépticas muy marcadas, por el crecimiento de *Pseudomonas spp*, antes de que *Aeromonas spp* alcance concentraciones elevadas. Sin embargo, a temperaturas superiores podría ocurrir que se alcanzasen las dosis infectivas de esta especie antes de que las alteraciones organolépticas fuesen muy marcadas. De hecho, según se desprende de la figura 1, tras alcanzarse un recuento de 10^6 ufc/gr, *Aeromonas spp* se convierte en la flora predominante, siendo su dosis infectiva de 10^7 ufc/gr (FDA, 2002).

Con objeto de establecer los tiempos de almacenamiento a diferentes temperaturas durante los

cuales el producto no representaría un peligro para la salud elaboramos las curvas de crecimiento microbiano de la flora contaminante del potón (Fig.3).

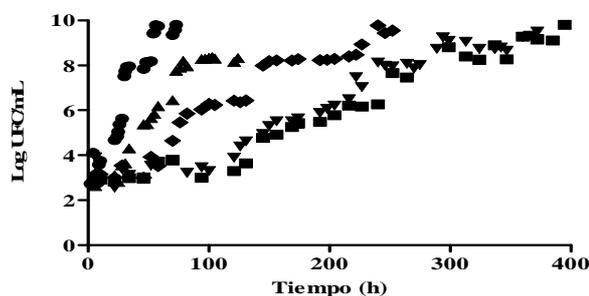


Figura 3: Evolución de la flora del potón a distintas temperaturas. (●) 16°C; (▲) 12°C; (◆) 8°C; (▼) 4°C; (■) 1°C.

Ajustando las curvas de crecimiento de la figura 3 con la ecuación de Geeraerd, calculamos los tiempos de almacenamiento a cada temperatura tras los cuales el recuento alcanzaría 10^7 ufc/gr. Relacionando los tiempos de almacenamiento en los cuales se alcanzaba la dosis infectiva con la temperatura (Fig 4) obtuvimos la ecuación: $\text{Log tiempo} = 2,5 - 0,056 T^a$, que nos permite predecir el tiempo máximo de almacenamiento a cada temperatura antes de que el producto pueda resultar peligroso para los consumidores.

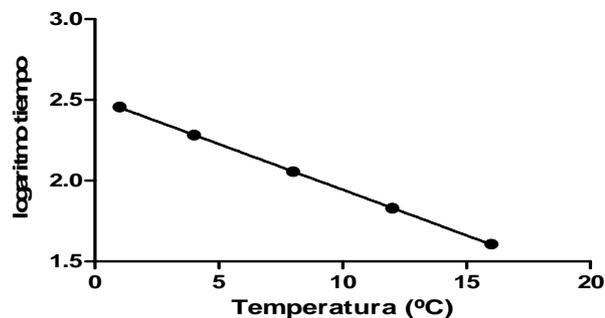


Figura 3: Tiempo máximo de almacenamiento del potón a diferentes temperaturas para no sobrepasar la dosis infectiva de *Aeromonas spp*.

De nuestro trabajo se desprende que las especies contaminantes mayoritarias del potón son: *Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp* y *Serratia spp*. No es previsible que el consumo del potón represente un peligro para la salud pública si se almacena a temperaturas de 4 °C o inferiores, pero a temperaturas superiores *Aeromonas spp* podría constituir un peligro a considerar. El tiempo máximo de almacenamiento para evitar este peligro puede calcularse con la ecuación: $\text{Log tiempo} = 2,5 - 0,056 T^a$.

BIBLIOGRAFÍA

Food and Drug Administration, 2002. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. *Aeromonas* species, pp. 54-56

***Arcobacter butzleri*: Patógeno emergente de difícil diagnóstico.**

Condón Abanto A¹, Mateo Gallego L¹, Berned Sabater M¹, García Pardo G², Tapiol Oliva J³.

¹ Servicio de Urgencias. Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona. ² Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona. ³ Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona.

Arcobacter butzleri está considerada actualmente como una especie patógena emergente, asociada a la transmisión alimentaria y de creciente importancia en salud pública. El presente estudio pretende describir la incidencia, en la demarcación de Tarragona, de *A. butzleri*, comparándola con la de los dos enteropatógenos mayoritarios (*Campylobacter* spp y *Salmonella* spp), así como las características demográficas y clínicas del cuadro infeccioso. Durante el periodo indicado se cursaron un total de 9735 coprocultivos, de los que 2074 (21%) resultaron positivos. Las especies aisladas más frecuentes fueron: *Campylobacter* spp 630 (31%) y *Salmonella* spp 493 (24%), mientras que *A. butzleri* se aisló en 7 pacientes (0,003%). Lo más llamativo de los casos clínicos relacionados con esta última especie fue que los pacientes raramente presentaban fiebre ni leucocitos, lo que podría explicar el retraso diagnóstico. La mayor frecuencia de coprocultivos positivos para *Campylobacter* spp respecto a los de *Salmonella* spp puede explicar el aumento de casos relacionados con *A. butzleri*, dada su similitud.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han identificado un gran número de enfermedades emergentes que afectan al ser humano, la mayoría de las cuales son de etiología infecciosa. Gran parte de éstas son de origen zoonótico, resultado de la transmisión a los humanos de patógenos de otras especies animales. Éste es el caso de *Arcobacter butzleri*, actualmente considerado un patógeno emergente, vehiculado por los alimentos y de creciente importancia en salud pública.

El género *Arcobacter* fue creado en 1992, a partir del estudio de las especies aerotolerantes incluidas en *Campylobacter* spp. y comprende 19 especies, entre las cuales *A. butzleri* es la principalmente asociada a infecciones gastrointestinales (Prouzet y col., 2006). La transmisión de estas bacterias al ser humano se realiza por vía feco-oral, a través del consumo de agua, alimentos de origen animal y por contacto con animales reservorios. *Arcobacter* spp ha sido aislado de ganado vacuno, porcino, ovino, caprino y en aves, así como en superficies de plantas procesadoras de carne y en aguas de distinto origen. Su mayor prevalencia se encuentra en carne de pollo, seguida de las de porcino y bovino (Zanetti y col., 1996).

A. butzleri, descrita en 1991 por Kielhbauch, fue aislada de heces humanas y animales con diarrea. Las infecciones causadas por esta bacteria se caracterizan por diarrea acuosa, no sanguinolenta, con dolor abdominal, náuseas y vómitos aislados y, en ocasiones, con fiebre. Esta bacteria se ha asociado a diarrea crónica y a casos de diarrea del viajero. En Tailandia se aisló *A. butzleri* en un 13% de los platos servidos en los mejores cinco restaurantes de Bangkok. También en Guatemala, Méjico e India objetivaron un 8% de casos positivos de diarrea. En cualquier caso, la importancia y gravedad de *Arcobacter* como causante de patología humana y

animal no ha sido totalmente establecido (Snelling y col. 2006).

El presente estudio pretende describir la incidencia, en la demarcación de Tarragona, de *A. butzleri*, comparándola con la de los enteropatógenos mayoritarios: *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp, así como las características demográficas y clínicas del cuadro infeccioso

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo de los resultados de los coprocultivos realizados en el Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona, en un periodo que comprende desde el 1 de enero de 2011, hasta el 1 de agosto de 2014.

De los coprocultivos positivos se seleccionaron aquellos que dieron positivo a *A. butzleri*, analizando posteriormente las historias clínicas de los pacientes y comprobando vía telefónica el proceso de la enfermedad, tratamiento y evolución, con el fin de recoger las características clínicas y demográficas de cada caso.

Los medios de aislamiento utilizados fueron: AS, EMB, SS, XLD, Campyloset, CIN, SMAC y TCBS. La identificación de *A. butzleri* se realizó mediante pruebas fenotípicas, MALDI-TOF y secuenciación del gen rpoB.

Los datos se recogieron según hoja de datos diseñada para el proceso de recogida y se analizaron con el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo indicado se cursaron un total de 9735 coprocultivos, de los que 2074 (21%), resultaron positivos (fig 1). Las especies aisladas más frecuentes fueron: *Campylobacter* spp 630 (31%) y *Salmonella* spp 493 (24%), mientras que se identificaron 7 casos (0,003%) con *A. butzleri* (fig 2).

Revisando los casos positivos a *A. butzleri*, se objetiva que todos fueron aislados en verano u otoño.

Ahora bien, debe remarcar que la prevalencia de los cuadros gastrointestinales es mucho mayor en dichos periodos por lo que no podemos concluir que haya una relación climatológica clara. Respecto al sexo y a la edad, cabe destacar que este patógeno se aísla tanto en niños como en adultos de mediana edad, sin tener ninguna patología concomitante o inmunosupresión, por lo que es una infección que afectaría de igual forma a toda la población.

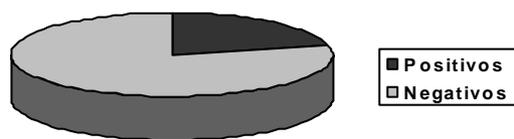


Figura 1: Número de coprocultivos positivos del total de los recibidos durante el periodo 2011-2014.

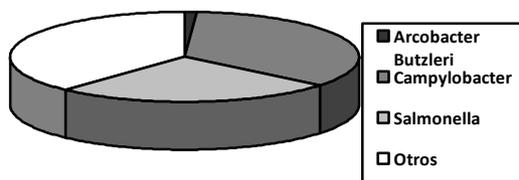


Figura 2: Especies más frecuentes aisladas sobre el total de coprocultivos positivos.

En relación a la sintomatología asociada, es llamativo que raramente esta descrita la fiebre en el curso clínico de la enfermedad y que el síntoma más frecuente, a parte de la diarrea, sea el dolor abdominal tipo cólico intenso (Tabla 1), clasificado por los pacientes 8/10. Este es, probablemente, el síntoma más característico de esta toxiinfección.

Tabla 1: Variables clínicas y demográficas de los casos aislados.

CASO	FECHA aislamiento	Sexo	Edad	Sintomas	Fiebre
1	09/10/2013	V	38	Diarreas e intenso dolor Abdominal	No
2	06/11/2013	M	65	Diarreas e intenso dolor Abdominal	No
3	09/10/2013	M	75	Diarreas e intenso dolor Abdominal	No
4	23/05/2014	M	5	Nauseas, Vómitos aislados, Diarreas e intenso dolor Abdominal	Si
5	31/05/2014	H	59	Diarreas e intenso dolor Abdominal	No
6	24/07/2014	M	5	Diarreas e intenso dolor Abdominal	No
7	01/08/2014	H	5	Diarreas e intenso dolor Abdominal	Si (febrícula)

La dificultad en la sospecha de esta infección radica, seguramente, en la particularidad del cuadro. Más concretamente, y según los casos documentados, la inexistencia de fiebre y leucocitosis en la analítica de sangre (Tabla 2), hace que se etiquete de un proceso banal y se retrase la solicitud del coprocultivo, no permitiendo el diagnóstico en la fase inicial de la enfermedad, sino ante un cuadro de diarrea persistente.

Tabla 2: Características bacterias/caso.

CASO	Leucocitosis	Medio de aislamiento	MALDI-TOF	rpoB (% de similitud)	mPCR	Sensibilidad CIPROFLOXACINO
1	No	CIN(BD)	A. butzleri	99%	A. butzleri	S
2	No	CIN(BD)	A. butzleri	99%	A. butzleri	S
3	No	CIN(BD)	A. butzleri	98%	A. butzleri	S
4	Si	CIN(BD)	A. butzleri	99%	A. butzleri	R
5	No	CIN(BD)	A. butzleri	98%	A. butzleri	S
6	No	CIN(BD)	A. butzleri	99%	A. butzleri	S
7	No	CIN(BD)	A. butzleri	99%	A. butzleri	S

El uso rutinario de MALDI-TOF ha sido un procedimiento de gran utilidad para la detección rápida de esta especie aislada poco conocida. La mayor frecuencia de coprocultivos positivos para *Campylobacter* spp respecto a los de *Salmonella* spp puede explicar el aumento de las detecciones de *Arcobacter butzleri*, ya que algunas características epidemiológicas de ambos géneros pueden ser similares. Futuros estudios deberán demostrar cuál es la evolución de la incidencia de este patógeno emergente en diferentes áreas geográficas.

La incidencia de *A. butzleri* como causante de diarrea en Tarragona ha resultado ser del 0,003%, sin embargo es previsible que estén subestimados por las razones antes expuestas.

BIBLIOGRAFÍA

Prouzet-Mauléon V, Labadi L, Bouges N, Ménard, Mégraud F. 2006. *Arcobacter butzleri*: Underestimated Enteropathogen. Emerging Infectious Diseases. 12; 307-309.

Snelling W, Matsuda M, Moore J & Dooley J. 2006. Under the microscope: *Arcobacter*. Lett Appl. Microbiol. 42; 7-14.

Zanetti F, Varoli O, Stampi S, De Luca G. 1996. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 33;315-21.

***Clostridium difficile*: ¿Patógeno vehiculado por alimentos?**

Condón Abanto A¹, Fonoll Tassier I¹, Berned Sabater M¹, Tapiol Oliva J³, Boque Oliva C¹, García Pardo G².

¹ Servicio de Urgencias. Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona. ² Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona. ³ Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona.

En este estudio se describe la incidencia de *C. difficile* en la demarcación de Tarragona y las características sociodemográficas y clínicas de la patología. Durante el periodo descrito se aislaron un total de 27 casos. El 63% de los pacientes eran hombres con una edad media de 77,6 años. En 7 (28%) de los casos aislados la infección fue adquirida en la comunidad, en 6 (24%) fue relacionada con la actividad médica, y los 12 (48%) restantes fueron pacientes ingresados, En estos últimos la edad media era muy superior a la del resto de los grupos, objetivando que el 83,3% de los pacientes padecían enfermedades concomitantes y/o inmunosupresión. Si extrapolamos esta información a la profesión médica, probablemente existe la posibilidad de que la fuente de infección en personas inmunocompetentes sin hospitalización previa sea la alimentación, debido a las características de estos casos.

INTRODUCCIÓN

El interés por evitar las enfermedades asociadas al consumo de alimentos surge con la práctica misma de la ingestión de alimentos. El tipo de daño es muy variado y no se limita, aunque sea lo más común, al aparato digestivo.

En los últimos años, *Clostridium difficile*, ha sido una de las especies que mayor interés ha suscitado en la comunidad médica debido al incremento de su incidencia y a la severidad de la infección nosocomial que produce. Ahora bien, no deja de sorprender que éste aumento de incidencia dependa en parte, de los nuevos casos registrados de infección adquirida en la comunidad, y que *C. difficile* sea un patógeno emergente en animales.

C. difficile es un bacilo gram positivo formador de esporas que forma parte de la microbiota intestinal normal en un pequeño número de individuos sanos y de pacientes hospitalizados. Los primeros estudios realizados no permitieron identificar a los animales como una fuente de infección importante para el ser humano, pero recientes informes han demostrado una marcada relación entre aislamientos de *C. difficile* en terneros y humanos, incluyendo dos brotes tipo 027 y 017. También se ha encontrado en muestras de carne lo que sugiere que los alimentos podrían estar involucrados en la transmisión de la infección de animales a humanos.

El objetivo de este trabajo ha sido realizar un estudio de la incidencia de *C. difficile* en la demarcación de Tarragona y de las características sociodemográficas y clínicas de la patología, así como buscar indicios indirectos, de base epidemiológica, sobre su relación con la alimentación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis retrospectivo de los resultados de los estudios de detección de la toxina de *C. difficile* realizados en el Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona, en un periodo que comprende desde el 1 de enero de 2014, hasta el 1 de agosto de 2014.

Debido al incremento de esta infección en el año 2013, se decidió elaborar un protocolo en dicho hospital para la solicitud bajo criterios claros de este estudio complementario. Este hecho hizo que probablemente se detectaran muchos más casos que en años anteriores. En el presente estudio se ha decidido seleccionar los casos detectados a partir de la publicación del protocolo con el fin de evitar sesgos en la recogida de los datos.

Una vez seleccionados los casos se hizo una revisión paciente por paciente, considerando las características clínicas y demográficas previamente diseñadas y recogidas en una hoja de datos diseñada para tal fin. Finalmente, los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo indicado se identificaron un total de 27 casos de infección por *Clostridium difficile*, mientras que durante el mismo periodo del año anterior (año previo a la implantación del protocolo) se identificaron 12 casos únicamente. Respecto al sexo (Figura 1), la infección se presentó predominantemente en el sexo masculino (63%), con una edad media de 77,6 años, aunque dado el número de casos considerados no se pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas. Futuros estudios deberían incidir, entre otros, en este aspecto.



Figura 1: Sexo.

Por otra parte, cabe destacar que 7 (28%) de los casos identificados eran de pacientes con infección adquirida en la comunidad sin hospitalización previa, y únicamente 1 paciente tenía antecedentes de inmunosupresión por tratamiento con quimioterapia. Respecto al resto, en 6 (24%) de ellos la infección fue relacionada con la actividad médica, y 12 (48%) correspondieron a pacientes ingresados, siendo en este caso la edad media detectada muy superior respecto al resto de los grupos y objetivando que 83,3% de los pacientes padecían enfermedades concomitantes y/o inmunosupresión (Figura 2).

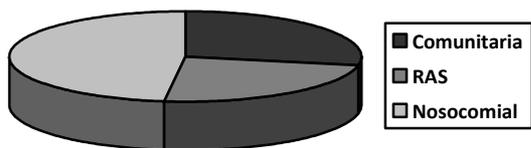


Figura 2: Distribución de la infección.

La figura 3 muestra un esquema de la distribución de los casos. La figura ilustra algo llamativo: mientras que la mayoría de los pacientes que adquirieron la infección en la comunidad no tenían enfermedades previas o inmunosupresión, en el resto de los grupos predominaban los que tenían enfermedades concomitantes/inmunosupresión. Así mismo, se detectó que la edad media del grupo que adquirió la infección en la comunidad es menor que en el de los pacientes ingresados.

La revisión bibliografía puso en evidencia que mientras en los casos de infección nosocomial o en los relacionados con la asistencia sanitaria se conoce razonablemente bien tanto la patogenia como los factores de riesgo (tratamiento con antibióticos de amplio espectro), poco se sabe de los casos de infección adquirida en la comunidad. Algunos autores e investigadores han estimado que la transmisión alimentaria podría ser una de las causas de la patología, ahora bien, la evidencia para confirmar o rechazar dicha hipótesis es incompleta. Recientes estudios han demostrado la presencia de *Clostridium difficile* en alimentos en EEUU, Canadá y Europa. El primer informe publicado al respecto (Rupnic, 2007)), elaborado en 2005 en Canadá, indica que, en

conjunto, se aisló la bacteria en el 20% de las muestras de los productos seleccionados. El estudio destacaba que se había aislado esta especie en el 21% de las muestras de piezas de ternera y en el 14% de las muestras de ternera picada. En otro estudio (Hanna y Limbago, 2010), realizado en Arizona, realizado con mayor variedad de productos cárnicos se aisló en el 42% de las muestras de ternera, cerdo y pavo.

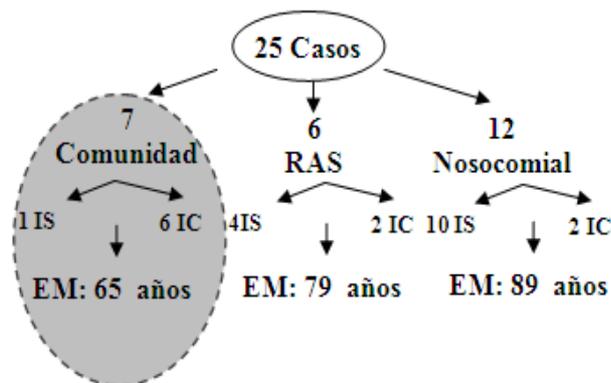


Figura 3: Mapa de Casos.

A juzgar por nuestros resultados, e interpretando esta información desde el punto de vista médico, podemos concluir que existe una alta probabilidad de que la fuente de infección en personas inmunocompetentes sin hospitalización previa sea la alimentación. Por una parte cada vez se aísla de forma más frecuente toxina de *Clostridium difficile* en alimentos, y por otra, y lo que es más significativo, nuestro estudio indica que estamos asistiendo a un aumento de la incidencia de la infección adquirida en la comunidad, en pacientes sin enfermedad previa. Es también muy significativo que en este grupo de infectados apenas existan inmunosuprimidos, lo que apoya también nuestra hipótesis. Futuros estudios deberán demostrar cuál es la evolución de la incidencia real de este patógeno como causante de infecciones gastrointestinales adquiridas en la comunidad y en qué medida están los alimentos relacionados con la misma.

BIBLIOGRAFÍA

Rupnik M. (2007) Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease. Clin microbiol Infect. 13: 457-459.
 Hanna Gould L, Limbago B.(2010) *Clostridium difficile* in food and domestic animals: A new foodborne pathogen? Clin Infect Dis.; 51(5): 577-582.

SESIÓN IV: Biotecnología microbiana de los alimentos I.

Probióticos y microbiota intestinal. De dónde venimos y a dónde vamos.

Clara G. de los Reyes-Gavilán¹, Nuria Salazar¹, Silvia Arbolea^{1,2}, Borja Sánchez^{1,3}, Lorena Ruiz^{1,2}, Noelia Martínez¹, Abelardo Margolles¹, Patricia Ruas-Madiedo¹ y Miguel Gueimonde¹

¹ Grupo Probióticos y Prebióticos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, greves_gavilan@ipla.csic.es

² Teagasc, Moorepark Food Research Centre, Fermoy; and Alimentary Pharmabiotic Centre, Cork, Ireland

³ Grupo de Nutrición y Bromatología, Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Universidad de Vigo, Ourense

El tracto gastrointestinal humano alberga una compleja comunidad microbiana. Esta microbiota ejerce importantes funciones metabólicas, protectoras y tróficas en el hospedador. Las alteraciones del equilibrio microbiota-hospedador pueden conducir a estados patológicos. Debido a que la mayoría de los microorganismos de la microbiota intestinal son incultivables, la importancia para la salud de este “órgano” del cuerpo humano permaneció ignorado hasta hace dos décadas. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva del ADN (NGS) y las técnicas “ómicas” han posibilitado el estudio de la microbiota intestinal. En esta ponencia se revisan aspectos de interés en relación con la microbiota intestinal humana, su influencia en la salud y su modulación a través de estrategias nutricionales, como el uso de probióticos. Las últimas tendencias en este campo le confieren una particular relevancia a la búsqueda de probióticos para las edades extremas de la vida: recién nacidos y ancianos.

INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal humano (TGI) alberga una compleja comunidad microbiana, cuyo número supera al de células eucariotas de nuestro cuerpo. El conjunto de sus genomas, denominado microbioma, supera el potencial genético del hospedador en dos órdenes de magnitud, aportando funciones no codificadas por el genoma humano (Qin y col., 2010).

Hasta hace pocos años el estudio de la microbiota intestinal se centraba en aquellos microorganismos que era posible cultivar en el laboratorio. Sin embargo, la gran mayoría de microorganismos intestinales no son cultivables, por lo que la complejidad y diversidad de este ecosistema microbiano y su papel en la salud y la enfermedad permaneció ignorado hasta tiempos recientes. Entre esta microbiota y el hospedador se ha establecido una relación mutualista, consecuencia de la coevolución a lo largo de miles de años. El intestino proporciona nutrientes y condiciones ambientales adecuadas para la microbiota y a cambio, ésta ejerce funciones esenciales para el mantenimiento de la homeostasis y la salud. Las alteraciones de la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal y del equilibrio microbiota-hospedador, pueden producir alteraciones que conducen a estados patológicos.

TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y “ÓMICAS” PARA EL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

En las dos últimas décadas, el creciente interés en el conocimiento de la microbiota intestinal ha ido acompañado por un gran desarrollo de las técnicas microbiológicas independientes de cultivo. La

mayoría se basan en el análisis del gen que codifica el ARN ribosomal 16S, común a todas las bacterias.

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva del ADN (NGS: *next generation sequencing*) permiten tener una visión detallada de los miembros de una comunidad microbiana y su abundancia relativa. La *metagenómica* hace posible la secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S o de todo el ADN de una muestra (*metagenómica total*), requiriéndose complejos análisis bioinformáticos para analizar los millones de secuencias generadas. El primer análisis metagenómico del ambiente intestinal se llevó a cabo en 2005 (Eckburg y col., 2005). Dos grandes proyectos en los últimos años, MetaHit y “The Human Microbiome Project” (HMP) han descifrado la estructura y funcionalidad de la microbiota humana. Los Chips de ADN son capaces de determinar presencia y abundancia de cientos de filotipos diferentes en una muestra.

Las técnicas “meta-ómicas” permiten analizar la funcionalidad de ecosistemas microbianos. La metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica analizan el RNA, proteínas y pequeños metabolitos de muestras microbianas complejas.

Para descifrar el papel de la microbiota en la salud y la enfermedad se requiere la integración de conocimientos taxonómicos y metabólicos así como la comprensión de los mecanismos de *diálogo (cross-talk)* microbiota-hospedador.

MICROBIOTA INTESTINAL Y SALUD. INTERACCIÓN MICROBIOTA-HOSPEDADOR

La microbiota de adultos sanos incluye representantes de los tres dominios de la vida

(bacterias, arqueobacterias y eucariotas), así como virus. Las divisiones Bacteroidetes y Firmicutes son las mayoritarias, mientras que Actinobacterias, Proteobacterias y Verrucomicrobia son grupos subdominantes. Las Arqueobacterias están representadas principalmente por el microorganismo metanogénico *Methanobrevibacter smithii*. Mientras que a nivel de división, la diversidad de la microbiota intestinal es baja, a nivel de especie se han descrito más de 15.000 filotipos diferentes, de los que aprox. el 70% son específicos de cada individuo (Turnbaugh y Gordon, 2009). La microbiota difiere cualitativa y cuantitativamente a lo largo del TGI, siendo el colon la zona más densamente poblada (10^{11} - 10^{12} células / contenido del lumen). Estudios recientes estratifican las poblaciones bacterianas intestinales humanas en tres grupos claramente diferenciados, denominados “enterotipos”, independientes de la nacionalidad, edad, sexo e IMC pero fuertemente influenciados por los hábitos dietéticos a largo plazo (Wu y col., 2011).

La adquisición de la microbiota intestinal tras el nacimiento desencadena la maduración del sistema inmune, lo que conlleva la impresión de un fenotipo inmune con efectos funcionales a largo plazo que condicionará el estado de salud futura del individuo. La microbiota intestinal interviene en la producción de vitaminas, absorción de minerales y eliminación de compuestos perjudiciales. A través de la fermentación de compuestos no digeribles de la dieta, la microbiota genera nutrientes e influye en la proliferación, diferenciación y angiogénesis del epitelio intestinal así como en el mantenimiento de la barrera intestinal.

MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL POR PROBIÓTICOS

Es posible modular la microbiota intestinal mediante estrategias nutricionales que incluyen, entre otras, la administración de probióticos. Éstos se definen como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas proporcionan un beneficio para la salud” (FAO/WHO 2006). Los probióticos utilizados en alimentación humana son mayoritariamente cepas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y también levaduras. Los principales beneficios asociados al consumo de probióticos se relacionan con la capacidad de modificar la composición de la microbiota intestinal y modular el sistema inmune. Los probióticos han sido utilizados en el tratamiento de diarreas, en la intolerancia a la lactosa y en varias enfermedades inflamatorias intestinales.

La FAO/WHO (2006) proporciona criterios para la selección de cepas probióticas que incluyen la correcta identificación de los microorganismos,

caracterización funcional, estudios de seguridad (fase I) y estudios de eficacia (fase II).

ULTIMAS TENDENCIAS: PROBIÓTICOS EN EDADES EXTREMAS DE LA VIDA

Algunos estudios apoyan los beneficios del uso de probióticos en adultos, siendo la evidencia aun escasa en recién nacidos y ancianos. La microbiota muestra una alta homeostasis durante la edad adulta pero es inestable en edades extremas de la vida (Arbolea y col. 2012; Salazar y col 2013). Por tanto, es en estos momentos en los que su modulación puede tener un mayor impacto en la salud. Las últimas tendencias indican la conveniencia de identificar dianas específicas en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal para la selección de probióticos y prebióticos dirigidos a grupos de población de edades extremas. Esta estrategia viene apoyada por los efectos notablemente diferentes que el mismo probiótico puede causar en la microbiota intestinal de distintos grupos de población (Arbolea y col. 2013).

BIBLIOGRAFÍA

- Arbolea, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A.M., et al. 2012, Establishment and development of the intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 79: 763-772.
- Arbolea, S., Salazar, N., Solís, G., Fernández, N., Gueimonde, M. y de los Reyes-Gavilán, C.G. 2013, *In vitro* evaluation of the impact of human background microbiota in the response to *Bifidobacterium* strains and fructooligosaccharides. *Br. J. Nutr.*, 110: 2030-2036.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. 2005, Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308: 1635-1638.
- FAO/WHO, 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition paper 85.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, C. S., Manichanh, Ch. Nielsen, T. et al. 2010, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464: 59-65.
- Salazar, N., Lopez, P., Valdes, L., Margolles, A., Suarez, A., Patterson, A.M., et al. 2013, Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly. *J. Am. Coll. Nutr.*, 32: 399-406.
- Turnbaugh, P.J. y Gordon, J.I. 2009, The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.*, 587: 4153-4158.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., et al. 2011, Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334: 105-108.



Clara González de los Reyes-Gavilán es Doctora en Biología por la Universidad de Oviedo desde 1987, tras la presentación de la Tesis Doctoral "Caracterización y función de una endonucleasa de *Streptomyces antibioticus*", como beneficiaria de una beca predoctoral FPI del MEC, con la calificación *Apto cum laude*. Realizó una estancia

posdoctoral con una beca FPI para el Perfeccionamiento de Doctores y Tecnólogos (septiembre 1988-enero 1990) en el INRA de Jouy-en-Josas (Francia) sobre mecanismos de restricción-modificación y sondas genéticas en *Lactobacillus helveticus*. En enero de 1990 se incorporó al IPLA-CSIC con una beca FPI de Reincorporación a España, pasando a ser Científico Titular en 1991 e Investigador Científico en 2007. En el CSIC su trabajo ha versado sobre bacteriófagos de bacterias lácticas, microorganismos patógenos de alimentos y métodos de inhibición de psicrotrofos alterantes en leche y productos lácteos. Desde el año 2000 trabaja sobre microorganismos probióticos, alimentos funcionales, microbiota intestinal y salud.

Ha dirigido 9 Tesis Doctorales. Ha sido Investigador Responsable de 6 proyectos del Plan Nacional, así como de diversos contratos con empresas y otros proyectos de investigación. Es autora de más de 120 publicaciones científicas y capítulos de libro. Fue Jefe de Departamento y Vicedirectora del IPLA-CSIC, ocupando desde Febrero de 2012 el cargo de Directora de dicho Instituto.

Los fructanos tipo inulina influyen sobre las especies de bifidobacterias intestinales y el perfil de ácidos grasos de cadena corta en mujeres obesas

Nuria Salazar^{1,5}, Evelyne. M. Dewulf¹, Audrey M. Neyrinck¹, Laure B. Bindels¹, Patrice D. Cani¹, Jacques Mahillon², Willem. M. de Vos³, Jean-Paul Thissen⁴, Miguel Gueimonde⁵, Clara G. de los Reyes-Gavilán⁵ y Nathalie M. Delzenne¹

¹Metabolism and Nutrition Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Bruselas, Bélgica, nuriasg@ipla.csic.es

²Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Earth and Life Institute, Université Catholique de Louvain, Lovaina la Nueva, Bélgica

³Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Wageningen, Países Bajos

⁴Pole of Endocrinology, Diabetology and Nutrition, Université Catholique de Louvain, Bruselas, Bélgica.

⁵Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Villaviciosa, Asturias, España.

Los prebióticos promueven cambios en la composición y la actividad de la microbiota intestinal pero la relevancia de dichos cambios y la modulación que pudieran ejercer sobre el metabolismo del hospedador, en el contexto de la obesidad, no habían sido todavía evaluados en los seres humanos al inicio del presente trabajo. El principal objetivo del estudio fue determinar cambios en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por la microbiota intestinal en mujeres obesas (n=15) que recibieron fructanos tipo inulina durante 3 meses con respecto a otro grupo de mujeres obesas (n=15) que recibieron el placebo maltodextrina durante el mismo tiempo. Se estudiaron las correlaciones entre las especies del género *Bifidobacterium* en heces, AGCC y marcadores biológicos del hospedador. La composición de diferentes especies de *Bifidobacterium* se realizó usando métodos cualitativos y cuantitativos (qPCR y PCR-DGGE), observándose incrementos significativos en las especies *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium adolescentis* en el grupo que recibió el prebiótico al final del tratamiento. La concentración total de AGCC, acético y propiónico analizados en heces mediante cromatografía de gases fueron significativamente menores al final del periodo de intervención en el grupo prebiótico y se correlacionaron además positivamente con algunos parámetros de riesgo metabólico. Los resultados sugieren que el consumo de fructanos tipo inulina disminuye la concentración fecal de AGCC en mujeres obesas, lo que podría disminuir la ocurrencia de factores de riesgo metabólico asociados a una mayor producción de AGCC en esta población.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la obesidad constituye uno de los primeros problemas de salud pública a nivel mundial y se asocia con otras complicaciones metabólicas, como la resistencia a la insulina, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Navab y col., 2008). Evidencias recientes, extraídas principalmente de modelos animales, sugieren que la microbiota intestinal desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo energético y que su composición también difiere entre individuos delgados y obesos. La utilización de prebióticos para mejorar el estado de salud a través de la alimentación con el fin de modular la microbiota intestinal es un campo activo de investigación, pero la relevancia de la acción prebiótica sobre el metabolismo del hospedador en el contexto de la obesidad no ha sido todavía probada en los seres humanos.

El objetivo del estudio fue determinar los cambios en la producción de AGCC producidos por la microbiota intestinal en mujeres obesas que recibieron el prebiótico fructano tipo inulina con respecto a otro

grupo de mujeres obesas que recibieron el placebo maltodextrina y establecer posibles asociaciones entre las especies del género *Bifidobacterium*, los AGCC fecales y marcadores biológicos relacionados con síndrome metabólico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras utilizadas procedían de un estudio clínico aleatorizado, doble ciego, paralelo y controlado con placebo (NCT00616057). Se seleccionaron mujeres obesas de entre 18 y 65 años de edad y con un IMC > 30 kg/m² que se dividieron en dos grupos (n= 15/grupo) que recibieron un suplemento diario de 16 g del prebiótico Synergy (grupo prebiótico) o maltodextrina (grupo placebo) durante tres meses (Dewulf y col., 2013). El análisis cualitativo/cuantitativo de la microbiota intestinal de las heces se realizó mediante PCR-DGGE y q-PCR (16S rRNA). Los AGCC fecales se cuantificaron por GC-MS y se realizaron tests de correlación entre los AGCC fecales, las especies del género *Bifidobacterium* y determinados parámetros biológicos del hospedador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cambios en las poblaciones de bifidobacterias

Las principales especies encontradas en los perfiles de PCR-DGGE para el género *Bifidobacterium* en el grupo prebiótico fueron *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Figura 1).

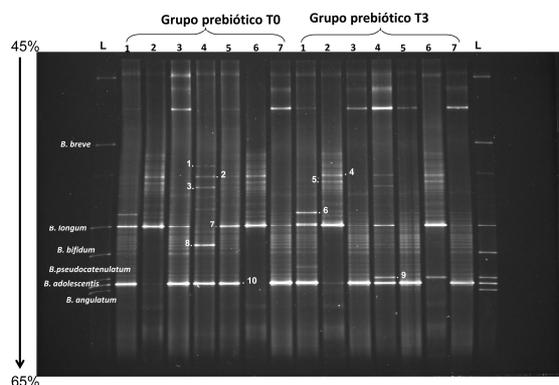


Figura 1: Perfiles de PCR-DGGE obtenidos en el grupo prebiótico antes (grupo prebiótico T0) y después (grupo prebiótico T3) del tratamiento (n=7). Bandas 2-6, 8-9: *B. longum*; 1,7,11: *B. adolescentis*; 10: *B. pseudocatenulatum*.

La cuantificación mediante qPCR mostró que al inicio del tratamiento ambos grupos de mujeres obesas mantenían niveles similares pero al finalizar el periodo de intervención, el grupo prebiótico presentó un incremento significativo de las especies *B. adolescentis* (~0.6 unidades log), *B. longum* (~0.7 unidades log) y *B. pseudocatenulatum* (~1.2 unidades log) (Tabla 1).

Tabla 1: Género *Bifidobacterium* y especies de *Bifidobacterium* antes (T0) y después (T3) del tratamiento ** p<0.01, *** p<0.001 utilizando el test no paramétrico Wilcoxon signed-rank. (n=15/grupo).

	Placebo group (n=15)		Prebiotic group (n=15)	
	T0	T3	T0	T3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9.36±0.16	9.05±0.20	9.16±0.10	9.79±0.12***
<i>B. adolescentis</i>	6.39±0.37	6.57±0.39	6.52±0.23	7.14±0.35**
<i>B. animalis</i>	5.54±0.24	5.48±0.38	5.99±0.32	6.23±0.40
<i>B. bifidum</i>	5.36±0.35	5.79±0.45	4.85±0.14	5.29±0.23
<i>B. breve</i>	5.60±0.06	5.53±0.04	5.62±0.05	5.55±0.03
<i>B. longum</i>	8.14±0.27	7.73±0.33	7.94±0.17	8.67±0.19***
<i>B. pseudocatenulatum</i>	7.33±0.43	6.79±0.45	7.20±0.41	8.49±0.41**

Análisis de la actividad de la microbiota intestinal

Los AGCC totales y los ácidos acético y propiónico disminuyeron significativamente después del tratamiento en el grupo prebiótico (Figura 2). Los AGCC ramificados tendieron a disminuir en el grupo prebiótico, aunque no se observaron diferencias significativas.

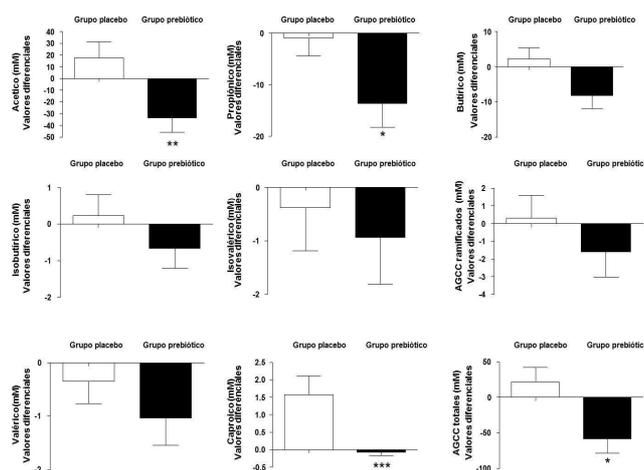


Figura 2: Valores diferenciales (T3-T0) de los AGCC fecales. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 utilizando el test no paramétrico Mann-Whitney (n=15/grupo).

Correlaciones entre las especies de bifidobacterias, los AGCC fecales y determinados parámetros antropométricos / biológicos

La especie *B. longum* se correlacionó negativamente con la concentración del lipopolisacárido en el suero, sugiriendo la posibilidad de que este microorganismo pudiera desempeñar un papel en la disminución de la endotoxemia metabólica en los seres humanos. Los AGCC fecales totales así como los ácidos acético y propiónico se correlacionaron positivamente con el IMC, los niveles de insulina en ayunas y el índice HOMA. En estudios previos se ha observado una mayor concentración de AGCC fecales en personas obesas por lo que la disminución de estos metabolitos bacterianos se podría relacionar con los cambios favorables obtenidos en la composición de la microbiota fecal en este grupo humano después de la ingesta del prebiótico.

CONCLUSIÓN

El consumo de prebióticos fructano tipo inulina incrementa determinadas especies del género *Bifidobacterium* y disminuye la concentración de AGCC fecales lo que podría reducir los factores de riesgo metabólico asociados con una mayor concentración de AGCC en personas obesas.

BIBLIOGRAFÍA

Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PG, Neyrinck AM, et al. 2013. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*.;62:1112-21

Navab M, Gharavi N, Watson AD. 2008, Inflammation and metabolic disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.;11:459-64.

Efecto de una dieta alta en mantequilla sobre enterococos fecales y su relación con la presión arterial del hospedador

Marina Hidalgo¹, Antonio Cobo¹, Isabel Prieto², Ana Belén Segarra², Hikmate Abriouel¹, Nabil Benomar¹, Antonio Gálvez¹ y Magdalena Martínez Cañamero¹

¹Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, acmolino@ujaen.es

²Área de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén.

Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio con técnicas dependientes de cultivo detectó el aumento de enterococos aislados de heces de ratones alimentados con una dieta alta en mantequilla. Sin embargo, estos microorganismos disminuían hasta su completa desaparición en las heces de ratones alimentados con una dieta alta en aceite de oliva. El mismo resultado se corroboró mediante secuenciación masiva del ADN 16S de la microbiota fecal de animales alimentados con ambas dietas. Estos estudios nos permitieron detectar una relación directa entre la presencia de este grupo microbiano en heces y los niveles de presión arterial en el hospedador, lo que resultó especialmente significativo en el caso de una secuencia concreta que pudimos además identificar entre la colección de cepas aisladas en placa durante el experimento. El presente estudio muestra una intervención realizada durante seis semanas sobre diez ratones inoculados con esta cepa, frente a otros diez tratados con placebo. A todos los animales se les evaluó la presencia de enterococos en heces y se les midió la presión arterial, así como otras variables fisiológicas. Los resultados obtenidos corroboran la correlación anteriormente descrita.

INTRODUCCIÓN

Está ampliamente aceptada la influencia del consumo de grasa en la dieta sobre el perfil de la microbiota intestinal. Igualmente, cada vez hay más evidencias de que el tipo de microbiota intestinal influye en el desarrollo de obesidad, inflamación y resistencia a la insulina, factores todos relacionados con este síndrome.

Con objeto de estudiar el efecto de diferentes grasas, llevamos a cabo un estudio comparativo mediante pirosecuenciación del gen 16S de la microbiota intestinal de ratones alimentados con diferentes dietas altas en aceite de oliva y en mantequilla. Entre otros resultados, observamos un aumento significativo de la presión arterial (SBP) en el grupo de animales alimentados con mantequilla. Este aumento de la presión se correlacionaba con la frecuencia con la que se detectaba una secuencia encuadrada en la especie *Enterococcus faecalis* (Hidalgo y col, 2014) y que pudo ser reconocida entre las cepas aisladas a partir de las heces durante el experimento. El estudio expuesto a continuación se llevó a cabo para contribuir a elucidar si el aumento de dicha secuencia causaba el correspondiente aumento de presión arterial o viceversa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Veinte ratones macho de seis semanas de edad y raza Swiss Webster ICR (CD-1) (Harlan Laboratories) fueron agrupados en cuatro jaulas y alimentados con una dieta

estándar durante seis semanas. Diez de estos ratones, agrupados en dos jaulas (grupos R y V), fueron inoculados diariamente con 10^6 UFC en 20 μ l de tampón PBS. Otros diez ratones, también en dos jaulas (grupos N y A), fueron tratados con tampón solo. Al comienzo del experimento, tras tres y seis semanas se les midió la presión sistólica. Diariamente se retiraron heces de todos los animales y se llevó a cabo un recuento y un aislamiento de cepas a partir de medio KAA, cepas que fueron preliminarmente caracterizadas como enterococos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento de unidades formadoras de colonias en KAA fue desde el primer día superior a 3.5 log UFC/ml, en todas las jaulas. Durante las tres primeras semanas, el recuento se mantuvo estable en las dos jaulas control, sin embargo a partir de la tercera semana hubo un descenso significativo, llegando a no detectarse UFC en algunos animales. En las jaulas problema, con ratones inoculados, encontramos dos resultados muy diferentes entre sí. El grupo R aumentó significativamente el número de UFC en KAA a partir de heces y se mantuvo estable a partir de la tercera semana. Por el contrario, el grupo V no aumentó el número de UFC en las primeras semanas y, al igual que las dos jaulas control, sufrió un descenso significativo de UFC detectadas a partir de ese momento, con casos de animales donde no pudieron detectarse. Esto probablemente indicaría que nuestra cepa no se había establecido en la jaula V, por lo que nos centramos especialmente en la jaula R. La

figura 1 muestra el recuento de unidades formadoras de colonias de este grupo frente al grupo control.

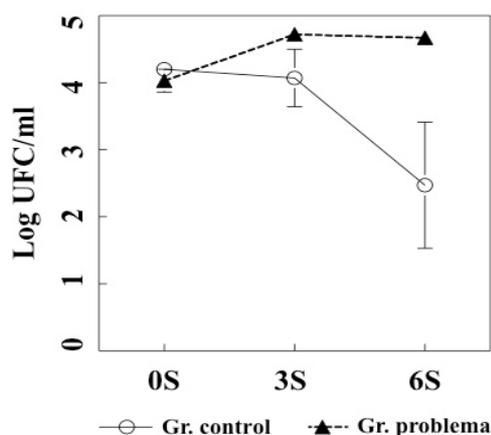


Figura 1: Recuento en placa en KAA al inicio del experimento (0S), a las tres semanas (3S) y a las seis semanas (6S). (○) Grupo control; (▲) Grupo problema.

En el caso de la presión arterial, comenzamos con valores similares en todos los grupos, valores que se mantuvieron a lo largo del experimento en el grupo control y el la jaula V del grupo problema. No hubo diferencias significativas en estos casos ni a lo largo del tiempo ni entre jaulas. Diferente fue el caso del grupo problema estabulado en la jaula R, donde ya en la semana tres había aumentado sus valores de presión arterial (Figura 2). A partir de este punto, la presión arterial siguió subiendo aunque de manera menos acentuada, de forma que al final del experimento no llegó a alcanzar significación estadística con respecto a los datos obtenidos a las tres semanas.

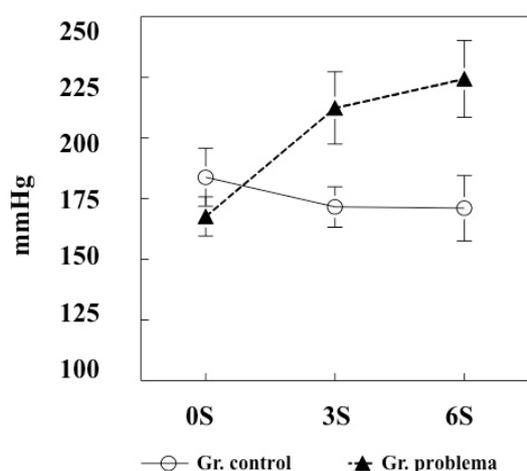


Figura 2: Presión arterial al inicio del experimento (0S), a las tres semanas (3S) y a las seis semanas (6S). (○) Grupo control; (▲) Grupo problema.

A pesar de estas diferencias en ambos grupos problema, la presión arterial de los diez animales se correlacionaba significativamente con el recuento

obtenido de UFC en KAA a las tres semanas ($R=0.74$; $p=0.01$). A las seis semanas seguía habiendo correlación ($R=0.57$) pero ya no era significativa. Probablemente fue debido a que, aunque la presión arterial se mantenía estable en todos los animales, existía una bajada muy marcada en las UFC detectadas en algunos de ellos, lo que aumentaba enormemente el error estadístico. Sin embargo, es importante destacar que la presión arterial a las seis semanas sí se correlacionaba significativamente con los valores de recuentos de UFC a las tres semanas, de forma muy similar a como ocurría con la presión en ese momento (Figura 3).

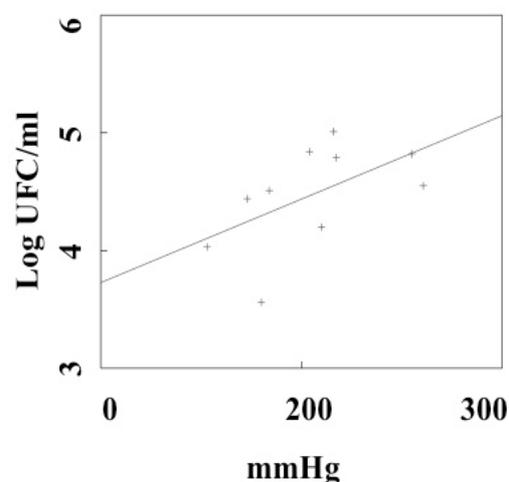


Figura 3: Correlación entre los valores de presión arterial a las 6 semanas y el recuento de UFC en KAA a las 3 semanas en el grupo problema ($R=0.73$; $p=0.02$).

Estos resultados, a falta de llevar a cabo un estudio de genotipado de las cepas aisladas, apoyan fuertemente la relación causal entre el aumento de una determinada cepa bacteriana tras una dieta alta en mantequilla y el aumento correlativo de la presión arterial del hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

Cobo, A., Hidalgo, M., Prieto, I., Benomar, N., Gálvez, A., y Martínez Cañamero, M. 2012. Estudio comparativo de enterococos aislados de heces de ratones alimentados con aceite de oliva o mantequilla. En: Avances en Microbiología de los Alimentos (E. González-Fandos, ed.), Universidad de La Rioja, pp 267-269.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido subvencionado por la CEICE-JA (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340).

Clonación y caracterización de la proteína D2EK17 de *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 con actividad degradadora de tiramina.

Sara Callejón¹, Ramón Sendra², Sergi Ferrer¹ e Isabel Pardo¹

¹ ENOLAB, ERI BioTecMed / IviSoCa. Universitat de València, Sara.Callejon@uv.es, Isabel.Pardo@uv.es

² Departament de Bioquímica, Universitat de València, España.

Las aminas biógenas (AB) son compuestos tóxicos que se encuentran en alimentos frescos y fermentados con alto contenido de proteínas. La proteína D2EK17 de *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 se identificó y describió como una enzima tipo lacasa capaz de degradar AB. El gen codificante de la misma se obtuvo mediante amplificación con cebadores diseñados a partir de la secuencia publicada de esta enzima. El objetivo de este trabajo ha sido el clonaje y expresión en *Escherichia coli* del gen que codifica para esta enzima. La proteína recombinante se caracterizó bioquímicamente frente al sustrato canónico de las lacasas el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). Se obtuvieron las constantes cinéticas, el perfil térmico de esta enzima y se estudió el efecto del pH y de posibles inhibidores de la actividad enzimática de la misma. Además, se investigó la capacidad de degradación de tiramina que exhibía esta enzima en diferentes condiciones de pH, concentraciones de Cu, ABTS y diferentes temperaturas. La proteína recombinante exhibía un intenso color azul típico de los enzimas que contienen cobre. El análisis del espectro de absorción mostró el perfil característico de las lacasas azules, corroborando que la proteína D2EK17 es una lacasa.

INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha, se han estudiado sólo unas pocas lacasas bacterianas, a pesar de que estas enzimas están muy extendidas en las bacterias (Claus 2003). Recientemente, Callejón y col. (2014) demostraron que las bacterias de ácido láctico (BAL) del vino poseen lacasas de interés biotecnológico, ya que demostraron la capacidad de éstas para degradar las aminas biógenas (AB) en vino. Las AB son compuestos tóxicos para la salud humana, además de que deprecian la calidad del vino que las contiene. Están presentes en algunos alimentos frescos, pero también se producen durante la fermentación de los mismos por la descarboxilación de los aminoácidos precursores por los microorganismos. En el trabajo de Callejón y col. (2014) se describe el uso de células de *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 para la degradación de AB en vino y se identifica la proteína responsable de ello. El objetivo de este trabajo ha sido la clonación del gen que codifica para esta proteína a fin de llevar a cabo su caracterización bioquímica y el estudio de su capacidad para degradar la tiramina en distintas condiciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Clonaje y expresión de D2EK17. La proteína se clonó en células de *E. coli* BL21 (DE3) que poseían un plásmido de expresión pET28a y un plásmido para asistir el plegamiento (pGrO7). La expresión se indujo a baja temperatura Koschorreck *et al.* (2008) añadiendo 1mM de IPTG a 1L del medio terrific broth (TB) suplementado con 2 mg/L de arabinosa, 1mM de CuCl₂ y 50 µg/mL de kanamicina. El extracto crudo se obtuvo por ruptura mecánica de las células con perlas de vidrio de 106 µm, en el tampón de equilibrado de la columna de purificación a pH 7,5 (tampón fosfato

sódico 50 mM, NaCl 300mM y 20 mM de Imidazol. La purificación de la proteína se realizó mediante cromatografía metálica de afinidad (Ni-NTA) para proteínas con colas de polihistidina, utilizando como eluyente tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 250 mM.

Caracterización bioquímica. Se determinó la masa molecular mediante electroforesis en 8% SDS-PAGE y el espectro de la proteína registrando la absorción en el intervalo de 300-800 nm en tampón fosfato sódico 50 mM. Se obtuvieron las constantes cinéticas de la enzima para el sustrato ABTS, y se estudió el efecto de la temperatura, pH, adición de Cu (50-1000 µM), e inhibidores (1 mM durante 10 minutos) sobre la actividad enzimática. Los ensayos se realizaron en microplaca tomando 1 µL de una dilución 1/20 de la enzima purificada en un volumen final de 100 µL de tampón acetato 50 mM que contenía 5 mM ABTS, se midió la ΔAbs_{420nm} durante 5 minutos. Para determinar el pH óptimo se usó el tampón citrato-fosfato (2,5-8). Los resultados se expresan como % de actividad enzimática relativa respecto al valor máximo encontrado. La actividad enzimática se calculó como $\Delta Abs_{420nm}/\Delta t (V_0)$ excepto en el caso de la temperatura que se tomó la Abs_{420nm} a los 5 minutos de iniciada la reacción, y se normalizó frente al máximo obtenido.

Ensayos de degradación de tiramina. Se ensayó la capacidad de degradación de la tiramina usando 1 µL de la enzima en un volumen final de 100 µL de tampón acetato 50 mM que contenía 150 mg/L de tiramina, 1 mM ABTS y 100 µM de CuCl₂. Para el estudio del efecto del pH se usó el mismo tampón que para el sustrato anterior y además el tampón carbonato-NaOH (9-10,5). Las reacciones se incubaron durante 24 h a 28°C, posteriormente se desproteinizaron por calor y se cuantificó la concentración de tiramina mediante LC-FLD siguiendo el procedimiento descrito en el trabajo de Callejón *et al.* (2014). Los resultados se expresan como porcentaje de degradación respecto a la mezcla de reacción sin enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización bioquímica.

La proteína purificada mostró un color azul intenso común a todas las enzimas que contienen cobre. El espectro de absorción UV-visible mostró una banda ancha a 575-600 nm con un pico a 590 nm y un ligero hombro a 330 nm (correspondientes a los centros de cobre T1 y T3 binuclear respectivamente), Xu *et al.* (2007). El tamaño de la enzima determinada por SDS-PAGE fue ~ 60 kDa (Figura 1).

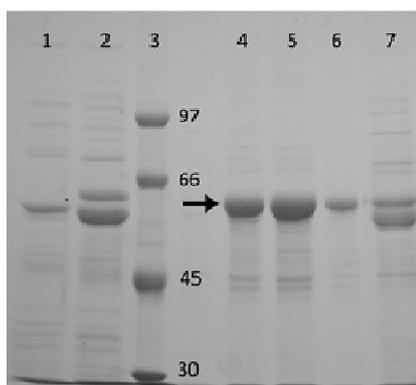


Figura 1: Gel 8% SDS-PAGE. Carrera 1: extracto no inducido, 2: extracto inducido, 3: LMW marker (Amersham), 4-6: fracciones eluidas en la purificación, 7: extracto crudo antes de purificar.

La K_m fue 4.22 mM y la $V_{m\acute{a}x}$ obtenida fue 0.013 para el ABTS. El pH óptimo de actuación fue 4 y la temperatura óptima fue 28°C, la adición de Cu no aumentó la actividad de la proteína frente al ABTS. La proteína retenía al menos el 70% de su actividad después de 10 minutos de incubación a 65°C. La adición de inhibidores y quelantes metálicos produjo cambios en la actividad enzimática como se puede observar en la Figura 2.

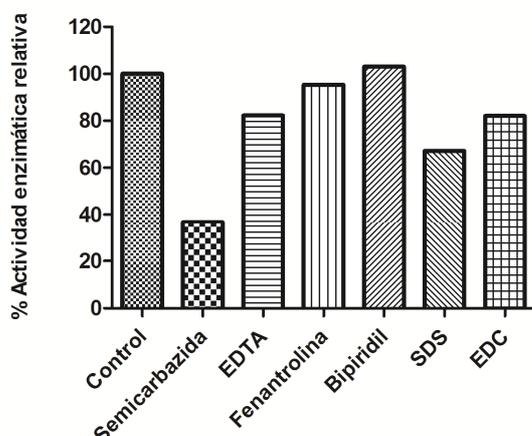


Figura 2: Efecto de la adición de inhibidores sobre la actividad enzimática de la lacasa recombinante de *P. acidilactici* CECT 5930 frente al ABTS.

Ensayos de degradación de tiramina.

La temperatura óptima de actuación de la enzima frente a la tiramina fue 28°C, temperatura a la cual se degradó el 70% de la misma, sorprendentemente fue capaz de degradar un 44% a 4°C. Se obtuvieron dos pH óptimos de actuación, 4 y 9,5 como se puede ver en la Figura 3.

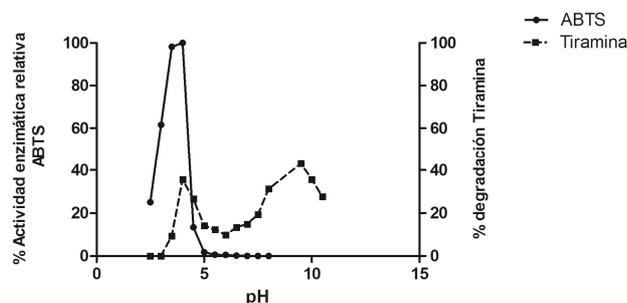


Figura 3: Efecto del pH sobre el enzima recombinante frente a los dos sustratos analizados.

La adición de Cu aumentó la actividad del enzima en un 5% independientemente de la concentración ensayada, por lo que se añadieron 100 μ M en el tampón de reacción. La adición de ABTS a la mezcla de reacción aumentó la actividad enzimática considerablemente, ya que actúa como mediador, por lo que se añadió una concentración de 1 mM al tampón de reacción.

Este trabajo corrobora la actividad de la lacasa aislada de *P. acidilactici* CECT 5930 frente a la tiramina. Este hallazgo abre nuevas posibilidades para disminuir los niveles de tiramina en vino y posiblemente en otros alimentos, lo que supondría un mecanismo para la mejora de la salubridad y la calidad de éstos.

BIBLIOGRAFÍA

- Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. 2014. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (1): 185-198
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179 (3): 145-150.
- Koschorreck K, Richter S, Ene A, Roduner E, Schmid R, Urlacher V. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2): 217-224.
- Xu F, Damhus T, Danielsen S, Østergaard LH. 2007. Catalytic applications of laccase modern biooxidation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 43-75.

Agradecimientos. Este trabajo fue parcialmente financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, España (Proyectos AGL2006-08495 y AGL2009-12167), los fondos FEDER y el Excmo. Ayuntamiento de Valencia.

Microbiota resistente a antibióticos en un queso tradicional e identificación de los genes responsables de la resistencia

Ana Belén Flórez¹, Víctor Ladero¹, Susana Delgado¹ y Baltasar Mayo¹

¹ Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, abflorez@ipla.csic.es

En el queso de *Cabrales*, el análisis microbiológico convencional reveló que aproximadamente el 1-10% de los microorganismos cultivables son resistentes a tetraciclina y/o a eritromicina. Las poblaciones implicadas en estas resistencias se identificaron mediante la técnica DGGE. Las poblaciones mayoritarias resistentes a tetraciclina y eritromicina durante la fermentación y el inicio de la maduración fueron enterobacterias y estafilococos, mientras que durante la maduración predominaron las especies *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecalis*. El análisis de librerías metagenómicas sugiere que los genes de resistencia a tetraciclina están codificados principalmente en plásmidos y transposones. La resistencia a este antibiótico está mediada por el gen *tet(A)* en enterobacterias y los genes *tet(S)* y *tet(M)* en el resto de las poblaciones al inicio de la fermentación. Sin embargo, al final de la maduración, el gen predominante que confiere resistencia a tetraciclina es *tet(L)*.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos se han utilizado para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, pero también como agentes profilácticos y promotores del crecimiento en ganadería, acuicultura y agricultura (Levy y col., 2004). Este uso extensivo ha favorecido la aparición de resistencias y su diseminación entre muchos tipos bacterianos. La resistencia a antibióticos en microorganismos patógenos y oportunistas es un problema de salud pública mundial, ya que complica y encarece el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En los últimos años se está prestando especial interés a las resistencias que presentan los microorganismos comensales y beneficiosos de los alimentos, ya que estas poblaciones podrían servir de reservorios de determinantes de resistencia transferibles a patógenos. De hecho, se ha propuesto que la cadena alimentaria es una de las principales vías de transmisión, bien durante la elaboración de los alimentos o tras su consumo durante el tránsito intestinal (Salyers y col., 2004).

En este trabajo se ha combinado la construcción de librerías metagenómicas con la secuenciación masiva (NGS) para el estudio del resistoma (conjunto de genes de resistencia) del queso de *Cabrales*. Además, se ha aplicado la técnica de electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE) en el estudio de la composición de las poblaciones microbianas resistentes a tetraciclina y eritromicina en el queso de *Cabrales* y su evolución a lo largo de la elaboración y maduración.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis microbiológico. Se realizó un seguimiento microbiológico a lo largo de una elaboración de queso de *Cabrales*, utilizando distintos medios de cultivo: bacterias aerobias totales (PCA), bacterias ácido-lácticas (MRS), enterobacterias (VRBGA) y estafilocos-micrococos (BP). Tras los recuentos se recogió el césped bacteriano en aquellas placas con crecimiento semi-confluyente y se aisló el ADN microbiano total.

DGGE. El estudio de la composición y evolución de las poblaciones resistentes a tetraciclina y eritromicina se llevó a cabo mediante la técnica DGGE utilizando el ADN microbiano total y como secuencias diana los genes que codifican para el ARNr 16S. La metodología empleada ha sido la descrita previamente por Muyzer y col. (1993). La identificación de las poblaciones mayoritarias resistentes a antibióticos se realizó por comparación de los perfiles con patrones conocidos y mediante el aislamiento del ADN de las bandas, reamplificación y posterior secuenciación.

Construcción librería metagenómica. ADN microbiano total de quesos de *Cabrales* de 3 y 60 días de maduración se mezcló con el vector pCC1FOS (Epicentre) para obtener dos librerías metagenómicas independientes. Se seleccionaron clones resistentes a tetraciclina y se secuenciaron ambos extremos. También se secuenciaron las regiones adyacentes de los genes de resistencia e incluso algunos insertos se secuenciaron complementamente con el equipo HiSeq 1000 System sequencer (Illumina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis microbiológico de las distintas muestras de queso de *Cabrales* mostró niveles de resistencia a tetraciclina y eritromicina a lo largo de todo el periodo de maduración. En general, los recuentos microbiológicos en los medios no suplementados con tetraciclina o eritromicina fueron 1 o 2 unidades logarítmicas superiores a aquellos recuentos obtenidos en los medios que contenían antibiótico. Estos datos sugieren que aproximadamente el 1-10% de los microorganismos cultivables son resistentes a tetraciclina o eritromicina.

Las poblaciones de microorganismos totales procedentes de las placas de PCA fueron mayoritariamente *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus plantarum*. Por contra, entre las poblaciones resistentes a tetraciclina en este mismo medio no aparece *Lb. plantarum* y sí *Staphylococcus* spp. y especies de *Enterobacteriaceae* (Figura 1).

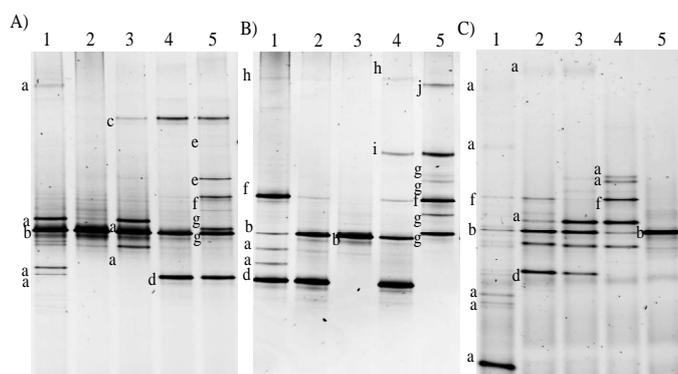


Figura 1: Perfiles de DGGE que muestran la diversidad poblacional a lo largo de la elaboración del queso de *Cabrales*. A, B y C, ADN total aislado de PCA y PCA con tetraciclina o eritromicina. Líneas 1-5, muestras de queso de 3, 7, 15, 30 y 60 días de maduración. Bandas: a, *Enterobacteriaceae*; b, *Lc. lactis*; c, *Lb. plantarum*; d, *E. coli*; e, grupo *St. saprophyticus* f, *E. faecalis*; g, grupo *St. simulans*; h, *E. casseliflavus*; i, *E. faecium*; j, *Enterococcus* spp.

Las poblaciones mayoritarias detectadas en MRS fueron *Lc. lactis*, predominante en las primeras etapas de maduración, y *Lb. plantarum* mayoritario hasta el final de la maduración.

El perfil de DGGE obtenido para las bacterias lácticas cultivables resistentes a tetraciclina fue completamente diferente. Una vez más no se detectan lactobacilos y sí bandas que se corresponden con *Lc. lactis* y *Enterococcus faecalis*. En cuanto a las poblaciones detectadas por DGGE en las muestras cultivables totales de los medios VRBGA y BP destacan diversas enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Raoutella* spp., *Hafnia* spp., etc.) y *Staphylococcus* spp. Por el contrario, las poblaciones fenotípicamente resistentes a tetraciclina en estas

mismas muestras se corresponden con *Escherichia coli* y *E. faecalis*.

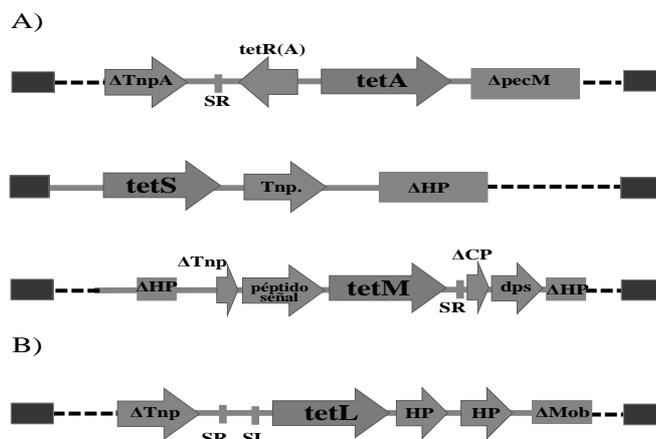


Figura 2: Representación de algunas regiones adyacentes a los genes de resistencia a tetraciclina detectados en las muestras de 3 días (A) y 60 días (B) de maduración del queso de *Cabrales*. Tnp, trasposasa; HP, proteína hipotética; CP, proteína conservada; SR, secuencia repetida; SI, secuencia de inducción.

La secuenciación masiva de algunos de los clones metagenómicos resistentes a tetraciclina mostró que la resistencia a este antibiótico está codificada principalmente en elementos genéticos móviles (trasposones y plásmidos). Además, determinamos que, durante las etapas iniciales de la elaboración, dicha resistencia está mediada por el gen *tet(A)* en las enterobacterias y los genes *tet(S)* y *tet(M)* en el resto de las poblaciones resistentes a este antibiótico. Sin embargo, al final de la maduración, las poblaciones resistentes mayoritarias son diversas especies de BAL y el gen predominante que confiere resistencia a tetraciclina es *tet(L)* (Figura 2).

El conocimiento de las poblaciones resistentes y la identificación de los determinantes genéticos de resistencia pueden facilitar la adopción de medidas para reducir la carga de resistencias a antibióticos en el queso de *Cabrales* y en otros quesos tradicionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Levy, SB., Marshall, B. 2004, Antibacterial resistance world wide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.*, 10:122-129.
- Muyzer, G., de Waal, EC., Uitterlinden, AG. 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:695-700.
- Salyers, AA., Gupta, A., Wang, Y. 2004, Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.*, 12:412-416.

Selección y Optimización de las condiciones de producción de PHBs a partir de subproductos de Maíz y de Patata

Patricia Arrubla, Ana Moreno, Maria José Saiz y Raquel Virto

Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA). rvirto@cnta.es

Los polihidroxicanoatos (PHA) son una familia diversa de poliésteres sintetizados por una amplia gama de microorganismos. Los PHAs son acumulados intracelularmente como respuesta a un desequilibrio de nutrientes en su ambiente, constituyendo una reserva de fuente de carbono y energía dentro del microorganismo para su supervivencia durante periodos de escasez. Las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los PHAs son similares a las que presentan los polímeros sintéticos comerciales, por lo que son aptos para numerosas aplicaciones industriales en agricultura, productos higiénicos descartables, envases de cosméticos. La investigación que se presenta ha seleccionado dos microorganismos salvajes del género *Cupridavidus*, *C. necátor* y *C. taiwanensis* con aceptables rendimientos en la producción (3,87 y 5,15 g/L) de este polímero plástico a partir de hidrolizados enzimáticos de subproductos de maíz y patata. Se ha puesto a punto el protocolo de fermentación en batch, el de extracción y el de purificación del polímero generado.

INTRODUCCIÓN

Entre los plásticos biodegradables, los polihidroxicanoatos (PHA) son una familia diversa de poliésteres sintetizados por una amplia gama de microorganismos. Los PHAs son acumulados intracelularmente como respuesta a un desequilibrio de nutrientes en su ambiente, constituyendo una reserva de fuente de carbono y energía dentro del microorganismo. La fuente de carbono es asimilada y convertida en un hidroxicanoato, que finalmente es polimerizado en PHAs de alto peso molecular, siendo almacenado como gránulos insolubles en el citoplasma (Ching-Yee Loo y col., 2007). Las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los PHAs son similares a las que presentan los polímeros sintéticos comerciales. El PHB (polihidroxibutirato) es el miembro de los PHAs mejor caracterizado y difundido, por lo que se han desarrollado diversas estrategias de fermentación y recuperación para su producción como polímero modelo. Para hacer su producción más rentable se desarrollan estrategias de producción que involucran el uso de cepas microbianas y métodos de fermentación eficientes, que utilicen fuentes de carbono de bajo costo. Los estudios realizados sobre la producción de PHAs utilizando sustratos de bajo costo sugieren que la alternativa es económicamente viable (Du y col., 2002, Khardenavis y col., 2007, Gomez y col., 2012). Uno de los objetivos del proyecto TRANSBIO (BioTRANSformation of by-products from fruit and vegetable processing industry into valuable BIOproducts) en el que se enmarca esta investigación es la obtención de altos rendimientos de PHBs a partir de subproductos de la industria agroalimentaria utilizando procesos fermentativos en "batch" con

nuevas cepas salvajes aisladas de suelos y ambientes húmedos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de esta investigación, se han utilizado residuos de maíz y patata transformados en sustratos de fermentación líquidos tras un pretratamiento de hidrólisis enzimática. Tras filtrado y eliminación de la fracción sólida, el hidrolizado de maíz y patata se diluyó al 10% (HEM) y al 25% (HEP) p/v respectivamente para eliminar los compuestos antimicrobianos y para reducir la viscosidad (patata) que dificultaba el proceso fermentativo. La composición en azúcares reductores y nitrógeno de los sustratos de fermentación fue de ≈ 15 g/L y de 0,36 g/L respectivamente en el maíz y de ≈ 20 g/L y 0,46 g/L respectivamente del hidrolizado de patata, ambos con sus correspondientes diluciones. En colaboración con la empresa italiana BIOSPLORA (socio del proyecto TRANSBIO) se aislaron 26 cepas salvajes portadoras del gen indicador de la potencialidad como productora de PHBs. El protocolo utilizado para maximizar la producción de PHBs consistió en, a partir de una colonia del microorganismo a testar, inocular 50 mL de un caldo de cultivo altamente nutritivo (TSB) y tras alcanzar la fase de crecimiento exponencial (24 horas/30°C) inocular (0,1% v/v) un volumen de 300 mL del mismo caldo nutritivo con objeto de conseguir, tras incubación 48 horas/30°C, la máxima concentración de biomasa bacteriana en fase estacionaria. Este cultivo maduro se centrifugó y tras eliminar el caldo nutritivo, el pellet resultante se resuspendió en la mitad de volumen del original de un medio desequilibrado en los ratios C/N (hidrolizados enzimáticos diluidos). Los microorganismos en este medio no se multiplicaban y durante el tiempo de incubación a (30°C) se produjo la acumulación de PHBs en el citoplasma celular. A las 72 horas de incubación se tomaron muestras para cuantificar recuentos (UFC/mL), pH, y concentración de PHBs (g/L). Una vez seleccionadas las cepas salvajes con mayor producción de PHBs en ambos sustratos de

fermentación (hidrolizado enzimático de maíz e hidrolizado enzimático de patata) se pasó a optimizar el tratamiento en biorreactor de 2 litros utilizando fermentación en “batch” y escalando el protocolo de producción descrito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras definir las condiciones óptimas de fermentación en batch, se procedió a la extracción y purificación del polímero a partir del producto de fermentación. Tras realizar el screening de 26 cepas salvajes se seleccionaron las cepas E6 y E9 (identificadas como *Cupriavidus taiwanensis* y *Cupriavidus necator* respectivamente) para el hidrolizado de maíz, y la cepa M38 (*C. necator*) para el hidrolizado de patata con valores de 0,89 y 1,02 g/L de PHBs tras 72 horas de fermentación. La concentración de PHBs obtenida en maíz y en patata con la cepa de referencia *C. necator* DMSZ 531 fue de 1,75 y 1,81 g/L respectivamente tras el mismo tiempo de fermentación.

Teniendo en cuenta la bibliografía sobre el tema, las pruebas en biorreactor se realizaron suplementando los hidrolizados con fructosa (20 g/L) y manteniendo el pH constante a 6 durante todo el proceso. A intervalos predefinidos de tiempo se tomaron muestras y se realizaron los mismos análisis que en el screening con objeto de determinar el tiempo de máxima producción de PHBs. Los resultados indicaron que la cepa codificada como E9 fue la máxima productora de PHBs en sustrato de maíz con una concentración de 3,82 g/L tras 120 horas de fermentación (en comparación con los 3,87 g/L que se obtuvieron con la cepa de referencia a las 168 horas) y la cepa codificada como M38 fue la máxima productora en hidrolizado de patata con valores de 5 g/L de PHBs tras 120 horas de fermentación, valores muy superiores a los 0,32 g/L que se obtuvieron con la cepa de referencia en el mismo medio de fermentación (Tabla 2 y Tabla 3).

Por último, se ha puesto a punto la técnica de extracción y purificación del polímero plástico utilizando técnicas tradicionales con solventes orgánicos y se ha obtenido el polímero purificado (Figura 1) a partir de los productos de fermentación.

Tabla 2: Producción de PHBs tras fermentación batch utilizando como sustrato de fermentación HEM manteniendo el pH constante a 6 durante todo el proceso.

Sweet corn by-product hydrolysate		
bacteria	time of the highest PHBs concentration (hours)	PHB (g/L)
Cepa: E6: <i>Cupriavidus taiwanensis</i>	120	2,1535
Cepa: E6 <i>Cupriavidus taiwanensis</i>	120	1,6855
Cepa: <i>Ralstonia eutropha</i> 531	96	2,9426
	168	3,8745
Cepa: E9 <i>Cupriavidus necator</i>	120	3,8261
Cepa: M38 <i>Cupriavidus necator</i>	96	2,5134

Tabla 3: Producción de PHBs tras fermentación batch utilizando como sustrato de HEP manteniendo el pH constante a 6 durante todo el proceso.

potato skin hydrolysate		
bacteria	time of the highest PHBs concentration (hours)	PHB (g/L)
<i>R. eutropha</i> DMS 531	72	0,33
Cepa: M38 <i>Cupriavidus necator</i>	168	5,37
Cepa: M38 <i>Cupriavidus necator</i>	120	5,15
Cepa: E9 <i>Cupriavidus necator</i>	72	4,26
Cepa: E9 <i>Cupriavidus necator</i>	120	3,67



Figura 1: Polímero de PHB purificado a partir del producto de fermentación del subproducto de patata con la cepa salvaje de *Cupriavidus necator* M38.

BIBLIOGRAFÍA

- Loo C-Y., Sudesh K. 2007, Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer J.*, 2 (2):31-57.
- Du G.C., Chen J., Gao H.J., Chen Y.G., Lun S.Y. 2000, Effects of environmental conditions on cell growth and poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *A. eutrophus*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16:9-13.
- Gomez, J.G.C., Méndez, B.S., Nikel, P. I., Pettinari, M.J., Prieto M.A., Silva, L.F. 2012, Making Green Polymers Even Greener: Towards Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Agroindustrial By-Products (Marian Petre, Ed.). *Advances in Applied Biotechnology*.
- Khardenavis A.A., Suresh Kumar M., Mudliar S.N, Chakrabarti T. 2007, Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly beta-hydroxybutyrate. *Bioresource Technol.*, 98:3579-358

SESIÓN V: Biotecnología microbiana de los alimentos II.

Bacterias lácticas del vino y fermentación maloláctica

Albert Bordons

Grup de Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades N4, 43007 Tarragona, albert.bordons@urv.cat

La fermentación maloláctica del vino es llevada a cabo por las bacterias lácticas, sobre todo por cepas de *Oenococcus oeni*, que es preciso identificar y caracterizar. Dado que el vino es un medio hostil debido al etanol, el pH bajo y los pocos nutrientes que contiene, es necesario conocer los mecanismos moleculares de adaptación de las bacterias al vino, para con ello poder seleccionar cepas más eficaces y diseñar protocolos de adaptación, manteniendo las cualidades organolépticas en el vino final.

INTRODUCCIÓN

Además de la fermentación alcohólica (FA) llevada a cabo por las levaduras, en muchos vinos tiene lugar la fermentación maloláctica (FML), en la que bacterias lácticas (BL) descarboxilan el L-málico produciendo L-láctico y con ello rebajan la acidez del vino. Esta reacción, junto con la mejora organoléptica y la estabilidad microbiológica que se consigue, son los aspectos positivos de las BL vónicas.

La especie más frecuente en el vino es *Oenococcus oeni*, de la que se disponen abundantes cultivos iniciadores comerciales, aunque en muchas bodegas la FML es llevada a cabo por cepas autóctonas, a menudo no caracterizadas.

La FML no es una fermentación fácil ya que las bacterias han de realizarla y subsistir en el vino, un medio hostil, con etanol, compuestos fenólicos y otros inhibidores, pH ácido y pocos nutrientes. Además es un medio no estéril, por lo que hay competencia con otros microorganismos, y variable en composición (año, varietal, lugar). Por ello es necesario caracterizar e identificar las diferentes especies y cepas de BL presentes en la vinificación, y por otro lado conocer los mecanismos moleculares relacionados con la adaptación de estas bacterias, sobretodo *O. oeni*, al vino y con la realización de la FML.

LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

La mayoría de mostos de uva contienen una cierta cantidad de ácido L-málico (1-5 g/l), que tiene un fuerte gusto ácido, no muy agradable. Las levaduras prácticamente no lo consumen durante la FA y por ello está presente en muchos vinos. Después de la FA, las BL como *O. oeni* pueden realizar la FML, descarboxilando el L-málico a L-láctico y CO₂, gracias al enzima maloláctico. El beneficio para la bacteria es la producción de algún ATP (Fig. 1) ligado al simport de láctico y protones, y un ligero aumento del pH externo (0.1-0.5). El vino mejora por esta disminución de la acidez y por la aparición de láctico, un ácido suave y más agradable.

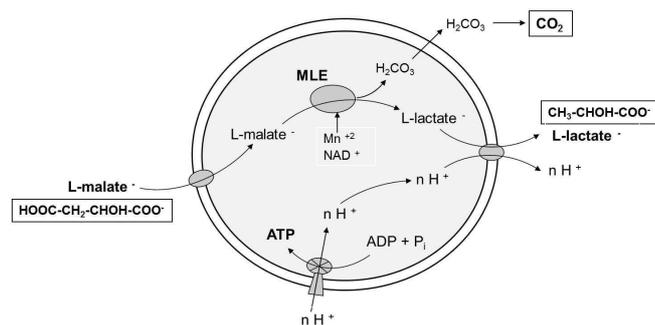


Figura 1: Esquema de una célula de *O. oeni* con las reacciones implicadas en la FML. MLE es el enzima maloláctico.

Además de la reacción maloláctica, estas bacterias contribuyen a la mejora organoléptica del vino. Cabe destacar la producción de diacetilo, sintetizado a partir del ácido cítrico, y que da aroma de mantequilla, característico de los vinos que han hecho la FML. Otro beneficio importante de la FML es la estabilidad microbiológica que se consigue con ella, ya que el consumo de málico y de otros nutrientes consiguiente a la FML dificulta el crecimiento de otras bacterias y con ello la posterior alteración del vino.

Oenococcus oeni, LA BACTERIA LÁCTICA DEL VINO

O. oeni son cocos formando pequeñas cadenas, Gram (+) catalasa (-), que realizan la fermentación heteroláctica a partir de azúcares y la FML a partir de L-málico. Pueden crecer a pH 3-4 y etanol 10%, con lo cual se encuentran exclusivamente en el vino y su entorno.

El número de BL en el mosto y durante la FA es usualmente bajo (cerca de 10⁴/ml) y predominan especies de *Lactobacillus*. Sin embargo, al final de la FA y durante la FML, *O. oeni* es la especie predominante (Lonvaud-Funel y col. 1991), con poblaciones superiores a 10⁶/ml.

Aunque *O. oeni* es fácilmente aislada de vinos y en bodega, se supone que su origen (y el de otras BL del vino) ha de ser la superficie de las uvas, pero hasta

ahora no se había referenciado su aislamiento (Bae y col. 2006), aunque sí se ha identificado su presencia mediante el DNA (Renouf y col. 2007). Recientemente se han conseguido aislar e identificar cepas de *O. oeni* directamente de uvas, tras enriquecimiento en medio rico (Franquès y col. 2014).

IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Oenococcus oeni*

Para controlar la FML es necesario disponer de técnicas eficaces de identificación que distingan las distintas especies de BL y de otras bacterias. Para identificar los aislados de *O. oeni*, una de las técnicas más utilizadas es una PCR con cebadores de un fragmento del gen del enzima maloláctico de *O. oeni* (Zapparoli y col. 1998), con un amplificado específico de 1025 pb.

También es importante tipificar las cepas para conocer la dinámica de poblaciones, su distribución geográfica y relación filogenética, además de poder confirmar la imposición de la cepa inoculada, si es el caso. Una de las técnicas de tipificación muy discriminatorias entre cepas de *O. oeni* es la de RAPD-PCR con cebadores arbitrarios cortos (10-15 bp), de la que se ha optimizado su reproducibilidad con una técnica multiplex usando simultáneamente un cebador RAPD y otro de PCR específica (Reguant y col. 2003). Por otro lado, un método de tipificación más precisa es el del número variable de repeticiones en tándem (VNTR), en el que se amplifican diversos loci por PCR y se detectan por electroforesis capilar (Claisse y col. 2014).

MECANISMOS MOLECULARES DE LA ADAPTACIÓN DE *Oenococcus oeni* AL VINO

Dado que las demoras o paradas de la FML son un problema para la calidad del vino, es preciso conocer los mecanismos por los que las cepas de *O. oeni* pueden adaptarse y sobrevivir a las difíciles condiciones del vino. Uno de los mecanismos es el mismo consumo del málico, que conlleva la producción de ATP y el aumento del pH externo. El metabolismo del citrato también da lugar a la producción de ATP y se relaciona con la respuesta al estrés debido al etanol y el pH (Olguín y col. 2009).

La síntesis de proteínas de estrés tiene un papel relevante en la supervivencia de *O. oeni*. Algunas de las proteínas descritas son Lo18, que parece favorecer la integridad de la membrana en las condiciones de estrés (Coucheney y col. 2005), y las Clp, proteasas que degradan proteínas anormales (Beltramo y col. 2004).

El mantenimiento del equilibrio redox celular es otro mecanismo clave en la adaptación al vino, ya que

la toxicidad del etanol en parte es debida al aumento de los procesos oxidativos. El glutatión (GSH) es una de las moléculas antioxidantes que restablecen el equilibrio redox, porque reduce los enlaces disulfuro de proteínas. En este sentido, parece que la adición de GSH al medio de preinóculo mejora el crecimiento de cepas de *O. oeni* en presencia de etanol (Margalef y col. 2014).

De esta manera, el conocimiento de los mecanismos moleculares de adaptación de estas bacterias al vino puede facilitar una selección de cepas más eficaces y el diseño de mejores protocolos de adaptación, manteniendo las cualidades organolépticas del vino.

BIBLIOGRAFÍA

- Bae, S., G.H. Fleet, G.M. Heard. 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* 100:712-727.
- Beltramo, C., C. Grandvalet, F. Pierre, J. Guzzo. 2004. Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* *clpP-clpL* locus expression in response to stress. *J. Bacteriol.* 186:2200-2205.
- Claisse, O., A. Lonvaud-Funel. 2014. Multiplex variable number of tandem repeats for *Oenococcus oeni* and applications. *Food Microbiol.* 38:80-86.
- Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P., Guzzo, J. 2005. A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* 1720:92-98.
- Franquès, J., B. Palahí, I. Araque, C. Reguant, A. Bordons. 2014. Selección y caracterización de bacterias lácticas autóctonas de uvas y vinos del Priorato. XIX Congreso SEM Microb. Alimentos, Zaragoza.
- Lonvaud-Funel A., A. Joyeux, O. Ledoux. 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.* 71:501-508.
- Margalef, M., I. Araque, A. Bordons, C. Reguant. 2014. Mejora del crecimiento y la adaptación al estrés de *Oenococcus oeni* por la adición de glutatión. XIX Congreso SEM Microb. Alimentos, Zaragoza.
- Olguín, N., A. Bordons, C. Reguant. 2009. Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 26:197-203.
- Reguant, C., A. Bordons. 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 95:344-353.
- Renouf, V., O. Claisse, A. Lonvaud-Funel. 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:149-164.
- Zapparoli G, S. Torriani, P. Pesente, F. Dellaglio. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 243-246.



Albert Bordons de Porrata-Doria es Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona. Es Catedrático Emérito desde 2011, vinculado a la Facultad de Enología de Tarragona, de la Universitat Rovira i Virgili (URV), y adscrito al Departamento de Bioquímica y

Biotecnología. Obtuvo experiencia profesional previa a la universidad (1973-1983) como técnico en investigación y desarrollo en empresas del sector alimentario. Como profesor universitario desde 1983, ha impartido principalmente Microbiología Industrial, Metabolismo de Microorganismos, Genética, Procesos Biotecnológicos y Biotecnología Enológica.

En investigación es especialista en microbiología industrial y en biotecnología enológica, y más en concreto en bacterias lácticas del vino y fermentación maloláctica. Ha publicado unos 50 artículos científicos, 35 de ellos en revistas de prestigio, como *Food Microbiology* o *International Journal of Food Microbiology*. Ha dirigido 9 tesis doctorales y actualmente está codirigiendo 3 más.

Ha sido coordinador de la 6ª Reunión de la Red Española de Bacterias Lácticas en Tarragona en 2012, y de la 1ª Jornada de Investigación de Enología y Viticultura de Cataluña en 2013. En la URV ha ejercido de Director del Departamento de Bioquímica y Biotecnología (1996-2001), Coordinador de Biotecnología (2005-2008), y Decano de la Facultad de Enología de Tarragona (2008-2011). Actualmente desde 2012 es coordinador del subcampus de Enología del Campus de Excelencia Internacional Cataluña Sur.

Capacidad de la microbiota oral humana para producir compuestos odorantes del vino a partir de precursores no odorantes de la uva

Carolina Muñoz-González, Carolina Cueva, M.Ángeles Pozo-Bayón y M. Victoria Moreno-Arribas

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, CEI UAM+CSIC, España, carolina.cueva@csic.es

Los precursores glicosídicos del aroma son compuestos inodoros que se encuentran de forma natural en las uvas y que representan un reservorio natural de moléculas odorantes en el vino. Debido a que el consumo de alimentos se inicia en la cavidad oral, el procesamiento de estos compuestos en la boca puede ser un factor importante que podría influir en la percepción del aroma del vino. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad de bacterias presentes en la cavidad oral para hidrolizar precursores glicosídicos de la uva y liberar las correspondientes agliconas aromáticas empleando ensayos *in vitro* y *ex vivo*. Para ello, en un primer experimento se evaluó el efecto de nueve bacterias representativas de la microbiota oral. Posteriormente, se llevó a cabo el mismo procedimiento experimental, pero utilizando el conjunto de la microbiota oral humana aislada de la saliva de voluntarios sanos. Las agliconas odorantes fueron extraídas y analizadas por HS-SPME-GC/MS. Los resultados mostraron la capacidad de los microorganismos orales para hidrolizar precursores glicosídicos de aroma liberando los correspondientes terpenos, norisoprenoides, derivados bencénicos, etc, que son moléculas caracterizadas por presentar bajos umbrales de olfacción y notas aromáticas positivas en el vino. Se comprobó que la actividad hidrolítica es bacteria-dependiente y está sometida a una gran variabilidad inter-individual. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la microbiota oral humana podría desempeñar un papel importante en la percepción del aroma retronasal durante el consumo de vino.

INTRODUCCIÓN

Los precursores glicosídicos del aroma son compuestos inodoros que se encuentran de forma natural en las uvas y que representan un reservorio natural de moléculas odorantes en el vino. Debido a que el consumo de alimentos se inicia en la cavidad oral, algunos parámetros fisiológicos, como son la composición de la saliva y de la microbiota oral, podrían influir en el procesamiento de estos compuestos, modificando la percepción del aroma del vino. De hecho, estudios recientes han comprobado que microorganismos anaerobios de la cavidad oral pueden hidrolizar precursores cisteínicos azufrados presentes en algunas frutas y verduras para liberar los correspondientes tioles volátiles, moléculas con gran impacto aromático (Starkenmann y col., 2008).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad de bacterias presentes en la cavidad oral para hidrolizar precursores glicosídicos de la uva y liberar las correspondientes agliconas aromáticas empleando ensayos *in vitro* y *ex vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar, se procedió a la obtención del extracto de uva, siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Bencomo y col. (2013). Este extracto se utilizó para llevar a cabo ambos tipos de ensayos, *in vitro* y *ex vivo*:

Ensayos *in vitro*. Para evaluar la biotransformación de precursores glicosídicos del aroma por bacterias orales se utilizó el método de microdilución descrito por Cueva y

col. (2010). Las bacterias utilizadas así como las condiciones de incubación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Bacterias orales utilizadas en el estudio.

Microorganismos	Condiciones crecimiento
Aerobios	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSB, 24 h, 37°C
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	
Anaerobios facultativos	
<i>Streptococcus sanguinis</i> DSMZ 20567	Modified TSB, 24h, 37°C
<i>Streptococcus oralis</i> CECT 907	BHI, 24 h, 37°C
<i>Streptococcus mutans</i> CECT 479	BHI, 24 h, 37°C
<i>Actinomyces naeslundii</i> CECT 806	Modified BHI, 48 h, 37°C
Anaerobios	
<i>Granulicatella adiascens</i> DSMZ 9848	
<i>Veillonella dispar</i> DSMZ 20735	WC, 24-48 h, 37°C
<i>Fusobacterium nucleatum</i> DSMZ 15643	

Ensayos *ex vivo*. Para conocer el papel del conjunto de la microbiota oral en la biotransformación de precursores glicosídicos del aroma, se recogieron muestras de saliva de 3 donantes sanos, que fueron incubadas durante 72 h, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, con el extracto de precursores de aroma.

Análisis. Las agliconas odorantes liberadas en ambos ensayos se aislaron mediante microextracción en fase sólida (HS-SPME), y después se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). A los resultados obtenidos se les aplicaron diferentes tratamientos estadísticos, que incluían el análisis de componentes principales (PCA) y el ANOVA de 3 vías.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de la microbiota oral humana para hidrolizar precursores glicosídicos de un extracto de uva se ha llevado a cabo utilizando 2 aproximaciones. En la primera se han utilizado bacterias orales representativas, mientras que en la segunda se ha tenido en cuenta el conjunto de la microbiota oral.

Ensayos *in vitro* con bacterias orales.

Los resultados obtenidos mostraron que, en general, todas las bacterias orales fueron capaces de hidrolizar los precursores glicosídicos, liberando las correspondientes agliconas aromáticas pertenecientes a distintas familias químicas, que incluían terpenos, derivados bencénicos y alcoholes (resultados no mostrados). Además, como se puede observar en la Figura 1, la liberación de agliconas fue dependiente tanto del tipo de bacteria como de sus condiciones de incubación. En concreto, la PC1 está fuerte y negativamente correlacionada con la liberación de terpenos como el linalool, lo que indica que los microorganismos situados a la izquierda de esta componente, como son *A. naeslundii* y la mayoría de los estreptococos, fueron los mayores liberadores de este compuesto volátil, relacionado con el aporte de notas florales positivas en los vinos. Este hecho, unido a que estos microorganismos son los primeros colonizadores en la formación del biofilm, podría influir en la percepción del aroma del vino durante el consumo.

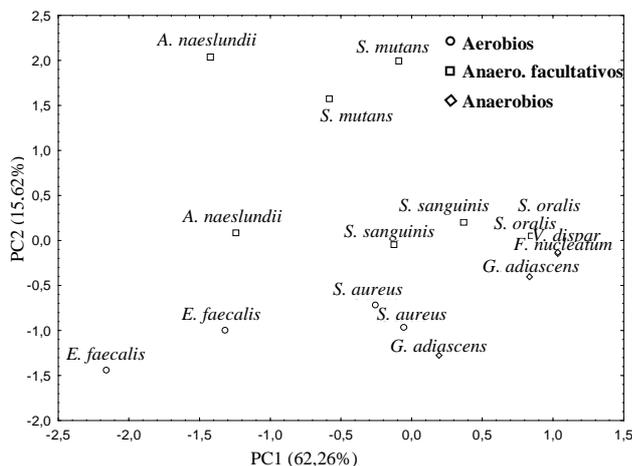


Figura 1: Análisis de componentes principales (PCA) llevado a cabo con los datos de las agliconas liberadas por diferentes bacterias orales a partir de los glicósidos de uva.

Ensayos *ex vivo* con microbiota oral.

Los resultados obtenidos con el conjunto de la microbiota confirmaron los obtenidos en los ensayos *in vitro*, esto es, la liberación de compuestos volátiles a partir de los precursores glicosídicos se produjo tanto en las muestras incubadas en condiciones

aerobias como anaerobias. Por otro lado, se comprobó que la liberación del aroma era dependiente del tiempo y tipo de incubación (aerobias/anaerobias), y además estaba sujeta a una gran variabilidad interindividual. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se muestra la liberación del linalool.

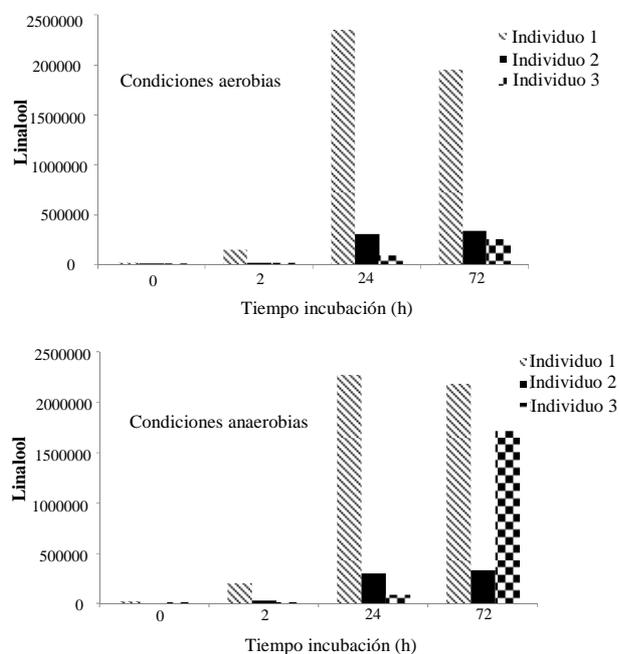


Figura 2: Linalool producido a diferentes tiempos (áreas de picos absolutos) tras la incubación de saliva con precursores glicosídicos de uva en condiciones aerobias y anaerobias.

En conjunto, estos resultados sugieren que la microbiota oral humana podría desempeñar un papel importante en la percepción del aroma retronasal durante el consumo de vino.

BIBLIOGRAFÍA

- Cueva, C., Victoria Moreno-Arribas, M., Martín-Alvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., López Rivas, C., Requena, T., Rodríguez, J.M., Bartolome, B. 2010, Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.*, 161:372-382.
- Li, J., Helmerhorst, E.J., Leone, C.W., Troxler, R.F., Yaskell, T., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Oppenheim, F.G. 2004, Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J. Appl. Microbiol.*, 97:1311-1318.
- Rodríguez-Bencomo, J.J., Selli, S., Muñoz-González, C., Martín-Álvarez, P.J., Pozo-Bayón, M.A. 2013, Application of glycosidic aroma precursors to enhance the aroma and sensory profile of dealcoholised wines. *Food Res. Int.*, 51:450-457.
- Starkenmann, C., Le Calve, B., Niclass, Y., Cayeux, I., Beccucci, S., Troccaz, M. 2008, Olfactory Perception of Cysteine-S-Conjugates from Fruits and Vegetables. *J. Agr. Food Chem.*, 56:9575-9580.

Inoculación de cepas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en fermentaciones alcohólicas en la DOQ Priorat

Beatriz González, Iara Izidoro, Paula López, Iris Traver, Gemma Beltran, Braulio Esteve-Zarzoso y Albert Mas

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, España, beatriz.gonzalez@urv.cat

Tradicionalmente, las levaduras no-*Saccharomyces* se han considerado como levaduras perjudiciales en la fermentación alcohólica. Estudios recientes desarrollados con levaduras no-*Saccharomyces* han mostrado una utilidad enológica que se desconocía hasta ahora. En el presente trabajo, tras un aislamiento y tipificación de cepas de levaduras aisladas de la DOQ Priorat, se hizo una primera selección de levaduras en función de las características enológicas deseadas, y las cepas seleccionadas se utilizaron como “starters” en fermentaciones alcohólicas en planta piloto. Se seleccionaron una cepa de *Hanseniaspora uvarum*, una cepa de *Candida zemplinina* y dos cepas de *S. cerevisiae*. Todas ellas se inocularon en forma de cultivo secuencial. El seguimiento de la fermentación se hizo por densidad y se analizó el comportamiento de las poblaciones de las especies de levaduras inoculadas. Al final de la fermentación se realizó un análisis sensorial y se detectaron los principales compuestos aromáticos volátiles para poder seleccionar que cepa, o grupo de cepas, presentaban mejores características organolépticas. Los resultados muestran una cinética fermentativa diferente según las cepas inoculadas, aunque la implantación de las cepas inoculadas fue en algunos casos dudosa. Los principales parámetros enológicos analizados muestran diferencias significativas entre los vinos finales obtenidos, al igual que los principales compuestos volátiles analizados, aunque a nivel sensorial las diferencias obtenidas carecieron de significación estadística.

INTRODUCCIÓN

El mercado del vino exige actualmente vinos de calidad superior. Diferentes especies y cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pueden modificar el perfil organoléptico del vino, ayudando a la complejidad y la riqueza del aroma y del sabor del vino.

La transformación del mosto en vino implica la sucesión y la coexistencia de diferentes especies de levaduras. Los microorganismos presentes en las bayas son principalmente levaduras no-*Saccharomyces*. A medida que avanza la fermentación estas especies acaban siendo remplazadas por la especie con mayor poder fermentativo y tolerancia al etanol, *S. cerevisiae*. A lo largo de los últimos años, ha crecido el interés para comprender el impacto de las levaduras no-*Saccharomyces* en los procesos de elaboración del vino, y a pesar de que siempre se las había considerado como perjudiciales, se ha demostrado que tienen actividades enzimáticas específicas, y son capaces de producir compuestos secundarios, aportando toda una serie de beneficios que aumentan la calidad del vino.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* con aptitudes enológicas, aisladas en viñedos pertenecientes a la DOQ Priorat, para ser utilizadas como cultivos mixtos en fermentaciones industriales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento y selección de levaduras. El aislamiento y la selección de las cepas de levaduras se había realizado previamente mediante microvinificaciones (2L) espontáneas llevadas a cabo en el laboratorio, con uvas de Garnacha tinta de la DOQ Priorat.

Con las cepas identificadas pertenecientes a las especies mayoritarias (*S. cerevisiae*, *H. uvarum* y *C. zemplinina*) se realizó el análisis de los parámetros enológicos, mediante fermentaciones individuales y por competencia inter e intraespecífica, y se seleccionó una cepa de cada especie para ser utilizadas en fermentaciones mixtas a escala piloto.

Identificación y tipificación. Las técnicas utilizadas para la identificación de levaduras fue la PCR ITS-RFLP. La tipificación de *S. cerevisiae* se hizo mediante la amplificación de los elementos delta y en el caso de las no-*Saccharomyces* se empleó la técnica TRtRNA descrita por Barquet y col. (2012).

Fermentaciones a escala piloto. Las levaduras seleccionadas fueron utilizadas como starters en fermentaciones a escala piloto (50L) llevadas a cabo en una bodega de la DOQ Priorat, con mosto de Garnacha tinta. Se realizaron 5 fermentaciones diferentes: una inoculada con la *S. cerevisiae* salvaje S1, tres fermentaciones mixtas secuenciales con levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (*H. uvarum* + *S. cerevisiae*, *C. zemplinina* + *S. cerevisiae*, *H. uvarum* + *C. zemplinina* + *S. cerevisiae*), en las que *S. cerevisiae* fue inoculada a las 48h, y una fermentación control inoculada con una cepa de *S. cerevisiae* comercial (AWRI796). Las fermentaciones se siguieron mediante la medida de la densidad y siembra de levaduras viables en placas YPD.

Análisis sensorial y composición volátil. Se evaluaron los vinos obtenidos mediante un panel de 12 catadores con experiencia previa. Se realizaron 2 tipos de análisis sensoriales: un análisis triangular diferenciando entre los vinos según las levaduras inoculadas, y un análisis descriptivo de los 5 vinos.

La composición volátil de los vinos fue determinada con microextracción en fase sólida (HS-SPME) acoplado a un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masas (GC-MS) de acuerdo con la metodología descrita por Torrens y col. (2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las diferentes fermentaciones se estudió la cinética fermentativa mediante densidad, la imposición de cepas inoculadas y la caracterización química y sensorial de los vinos finales.

Cinética fermentativa

Las fermentaciones más rápidas fueron las puras inoculadas con *S. cerevisiae*. La fermentación mixta inoculada con *H. uvarum* fue la segunda en consumir todos los azúcares, debido a que en el mosto inoculado con esta levadura, como se pudo comprobar con el análisis de la microbiota, había una gran población de *S. cerevisiae* desde el inicio. Las otras tres fermentaciones llevaron una cinética muy semejante acabando en todos los casos la fermentación.

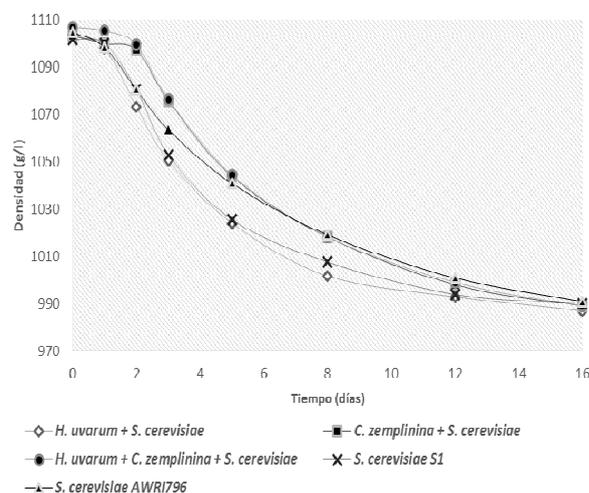


Figura 1: Cinética fermentativa de las cinco fermentaciones realizadas seguidas mediante medida de la densidad.

Imposición microbiológica

En las dos fermentaciones puras inoculadas con *S. cerevisiae* desde el inicio, ésta se impuso en la fermentación, desplazando a las no-*Saccharomyces* a partir del tercer día. Por el contrario, en los otros casos, cuando *S. cerevisiae* se inoculó a las 48 horas, ésta no mostró una imposición clara, siendo varias las

levaduras las que llevaron a cabo el proceso fermentativo. En estos casos las levaduras no-*Saccharomyces* estuvieron presentes hasta mitad de fermentación.

Análisis de la composición volátil

Con respecto al análisis de los compuestos volátiles (Figura 2), las fermentaciones puras de *S. cerevisiae* produjeron más alcoholes superiores que las mixtas. Sin embargo, la producción de acetatos fue más alta en las fermentaciones mixtas. La concentración mayor de los ésteres de etilo se obtuvo en la fermentación mixta con *H. uvarum*.

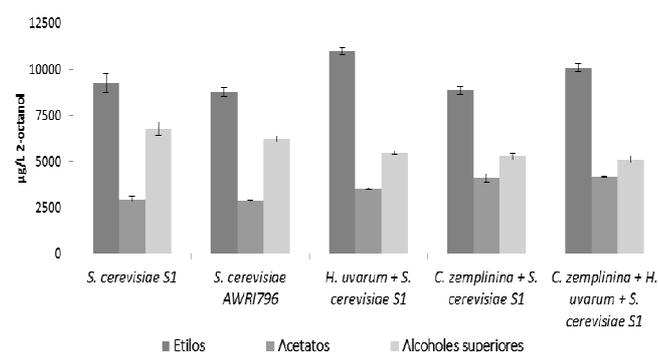


Figura 2: Producción de ésteres de etilo, acetatos y alcoholes superiores de los vinos.

Análisis sensorial

El resultado de los test triangulares no mostró diferencias significativas entre los vinos, aunque sí que hay una tendencia a la elección de las fermentaciones mixtas, frente a las puras. Esto concuerda con los análisis químicos ya que la concentración de compuestos deseados como ésteres es superior en las fermentaciones mixtas que en las puras. De la cata descriptiva, se observa que el vino de la fermentación mixta (*H. uvarum* + *C. zemplinina* + *S. cerevisiae*) destacó con respecto a los demás por sus características en boca, untuosidad, intensidad y postgusto; en cuanto a características aromáticas destacan su carácter floral y frutal.

BIBLIOGRAFÍA

- Barquet, M., Martín V., Medina K., Pérez G., Carrau F., Gaggero C. 2012, Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. Appl. Microbiol. Biotechnol., 93:807-814.
- Torrens, J.; Urpí, P.; Riu-Aumatell, M.; Vichi, S.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. 2008, Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. Int. J. Food Microbiol., 124, 48-57.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto financiado por la Unión Europea Wildwine (Ref. 315065).

Interacciones entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* durante la vinificación

Olga Lucio¹, Isabel Pardo¹, Jose María Heras², Sybille Krieger² y Sergi Ferrer¹

¹ ENOLAB- Departament de Microbiologia i Ecologia / ERI-ISIC BioTecMed / MCI IViSoCa. Universitat de València, Dr. Moliner, 50. E-46100, Burjassot, Valencia, Spain. olga.lucio@uv.es; sergi.ferrer@uv.es

² Lallemand S.A.

La especie *Lactobacillus plantarum* se encuentra de manera natural en mostos y vinos y también puede ser inoculada durante la vinificación como cultivo iniciador para inducir la fermentación maloláctica o acidificación biológica en los vinos. Para la inoculación de bacterias lácticas en la vinificación es importante tener en cuenta las interacciones que pueden establecer éstas con las levaduras, especialmente con *Saccharomyces cerevisiae*. Estas interacciones pueden ser tanto de sinergia como de antagonismo y son altamente dependientes de las cepas de levaduras y bacterias lácticas envueltas. Por tanto, la elección de las cepas más compatibles es un factor determinante. En este estudio se ha confirmado la dependencia de cepa de este fenómeno y se ha demostrado la efectividad de la acidificación biológica mediante la inoculación de cepas de *L. plantarum* independientemente de la cepas de levadura y bacteria utilizadas en la vinificación.

INTRODUCCIÓN

Como alternativa a la acidificación química y/o física de los vinos se ha desarrollado un método biológico basado en la inoculación en mosto de cepas seleccionadas de *L. plantarum*, productoras de elevadas cantidades de ácido láctico por fermentación láctica (FL) a partir de los azúcares del mosto (Lucio, 2014). Para la inoculación de bacterias lácticas (BL) durante la vinificación es importante tener en cuenta las interacciones que pueden tener lugar con las levaduras fermentativas, tanto de sinergia como de antagonismo, y que son altamente dependientes de las cepas implicadas (Boiron, 1969). El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la compatibilidad de 2 cepas de *L. plantarum*, previamente seleccionadas para inducir acidificación biológica en vinos, y 6 cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Para ello se observó tanto la dinámica poblacional de levaduras y BL como la composición química de los vinos finales inoculados con todas las combinaciones de levadura/BL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas microbianas utilizadas. Se utilizaron dos cepas de *L. plantarum*: E4607 y E4608, previamente seleccionadas para inducir acidificación biológica en vinos (Lucio, 2014) y seis cepas comerciales de *S. cerevisiae*: Uvaferm VN®, Uvaferm VRB®, Lalvin K1™, Enoferm M2™, Lalvin 4600® y Lalvin QA23™ (Lallemand).

Microvinificaciones. Se utilizó mosto blanco estéril suplementado con 0.3 g/L de Nutrient VitEnd®, pH 3.5. Dos matraces con 500 mL de mosto se inocularon con 2 x 10⁶ UFC/mL de las cepas E4607 y E4608 respectivamente y se incubaron a 28°C durante 3 días. Después, cada cultivo bacteriano se distribuyó en 7 matraces (50 mL/matraz). Seis

de éstos se inocularon con 2 x 10⁶ UFC/mL de las 6 cepas comerciales de levaduras, respectivamente. El matraz restante se utilizó como control de BL sin levaduras. Adicionalmente, otros 6 matraces con mosto se inocularon con las seis levaduras, sirviendo como control de levaduras sin BL. Un matraz con mosto sin inocular sirvió como control adicional sin levaduras ni BL. Las microvinificaciones se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer y fueron incubadas a 28°C durante 15 días.

Análisis de la dinámica poblacional de los microorganismos. Para el recuento de BL se utilizaron placas de MRS suplementado con cisteína (0.5 g/L) y Actistab (0.15 g/L), y para el recuento de levaduras placas de YPD (20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de agar). Las placas se incubaron a 28°C durante 6 días hasta observar colonias aisladas.

A partir de de las curvas de crecimiento de los microorganismos inoculados en las microvinificaciones se calculó el parámetro Área Bajo la Curva (ABC).

Composición química de los vinos. La composición química de las muestras extraídas al final de las microvinificaciones se analizó en un sistema HPLC (Agilent 1200) con el fin de obtener las concentraciones de azúcares, ácidos málico, láctico y cítrico, etanol y glicerol (Frayne, 1993). El pH de las muestras se midió con un electrodo Sentix81 (WTW) acoplado a un pHmetro pH330i (WTW).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dinámica poblacional de los microorganismos

En cuanto a las BL, E4608 se mantuvo en mayor población en coexistencia con levaduras que E4607. Se observó una mayor población de ambas cepas en combinación con las levaduras Uvaferm VN® y Uvaferm VRB®. Ambas BL disminuyeron más su

población en coexistencia con Lalvin K1™. La combinación mediante la cual se obtenía una mayor concentración de BL durante la vinificación era la de E4608 con Uvaferm VN® o con Uvaferm VRB® (Fig. 1A). La población de todas las levaduras se mantiene más baja en coexistencia con BL. Este efecto resulta más acusado en las levaduras Uvaferm VN®, Enoferm M2™ y Lalvin QA23™, y menos acusado en las levaduras Uvaferm VRB®, Lalvin K1™ y Lalvin 4600® (Fig. 1B).

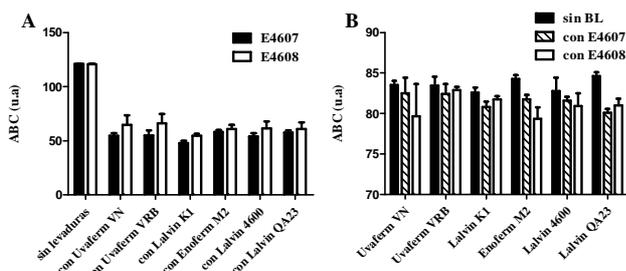


Figura 1. Representación del crecimiento de los microorganismos durante las vinificaciones, expresado en ABC, A) Bacterias lácticas inoculadas, B) Levaduras inoculadas.

Composición de los vinos finales

La composición de los vinos no fue significativamente diferente dependiendo de las combinaciones de levadura/BL utilizadas, pero sí dependiendo de la inoculación de BL. Los vinos inoculados con BL mostraron elevadas cantidades de ácido láctico (10-12 g/L), menos ácido cítrico (0.2-0.3 g/L) (Figs. 2E y 2F) y menor pH (0.1-0.3 unidades) que los no inoculados (Fig. 3). Además, éstos completaron la FML, al contrario que los no inoculados (Figura 2D). La capacidad fermentativa de las levaduras no se vio afectada por la presencia de BL, ya que la concentración de azúcares residuales fue similar en todos los casos (Fig. 2A). En cambio, la concentración de etanol y glicerol resultó menor en estos vinos (Figs. 2B y 2C). Esto fue debido a que los azúcares metabolizados por las BL para la síntesis de ácido láctico no fueron utilizados por las levaduras para la formación de estos compuestos.

Estos resultados demostraron que los fenómenos de antagonismo entre BL y levaduras dependen de cepa. Sin embargo, la efectividad de la acidificación biológica mediante la inoculación de cepas de *L. plantarum* no resultó comprometida en ninguna combinación de cepas utilizada.

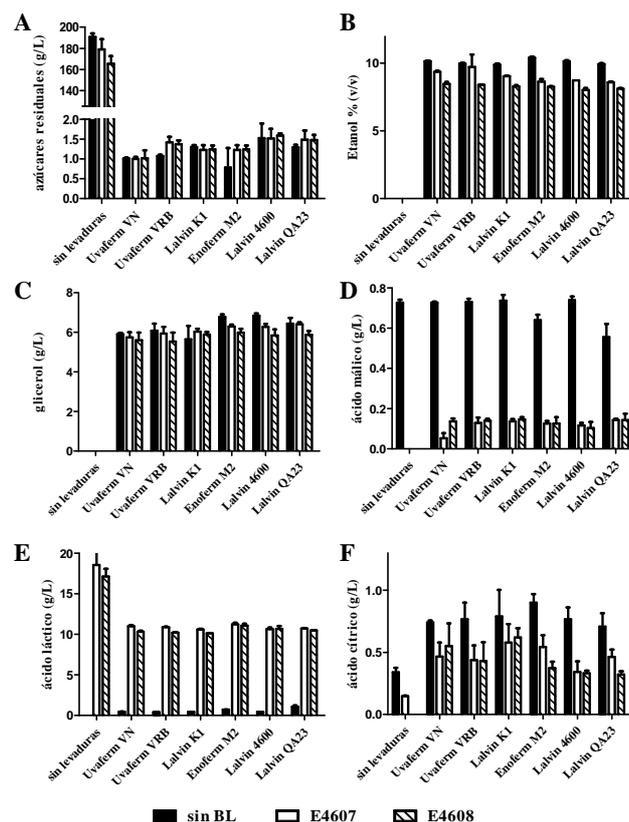


Figura 2. Composición química de los vinos obtenidos usando las diferentes combinaciones levadura/BL, A) azúcares residuales (g/L), B) etanol % (v/v), C) glicerol (g/L), D) ácido málico (g/L), E) ácido láctico (g/L), F) ácido cítrico (g/L).

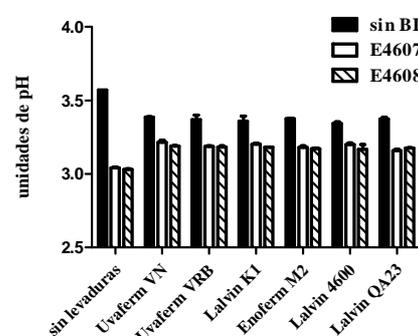


Figura 3. Valores de pH de los vinos finales obtenidos mediante las diferentes combinaciones de levadura/BL.

BIBLIOGRAFÍA

- Boidron, A.M. 1969. Etude de l'antagonisme entre les levures et les bactéries du vin. *Conn. Vigne Vin.* 3: 315-378.
- Frayne, R. F. 1986. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 281-287.
- Lucio, O. 2014. Acidificación biológica de vinos de pH elevado mediante la utilización de bacterias lácticas. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Mejora del crecimiento y la adaptación al estrés de *Oenococcus oeni* por la adición de glutatión

Maria del Mar Margalef, Isabel Araque, Albert Bordons y Cristina Reguant

Grup de Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades N4, 43007 Tarragona, mariadelmar.margalef@urv.cat

Oenococcus oeni, principal especie responsable de la fermentación maloláctica (FML) del vino, tiene que hacer frente a diferentes factores que ponen en juego su supervivencia, tales como pH bajo y concentraciones altas de etanol. El efecto antioxidante del glutatión (GSH) podría ayudar a *O. oeni* a mantener o mejorar su estado celular para desempeñar posteriormente la FML en el vino. En el presente trabajo se ha evaluado el efecto positivo sobre el crecimiento de cuatro cepas de *O. oeni* después de una adición de GSH en el medio de cultivo como parte de la adaptación a diferente pH y concentración de etanol. Se ha confirmado que el incremento del crecimiento es superior cuando se produce esta adición del antioxidante.

INTRODUCCIÓN

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. Actúa como antioxidante celular por el grupo tiol de la cisteína que neutraliza las especies ROS. También tiene numerosas funciones metabólicas (Smimova y Oktyabrsky, 2005) debido a que reduce los enlaces disulfuro de proteínas a cisteínas. *Oenococcus oeni*, principal especie responsable de la fermentación maloláctica (FML) del vino, como otras bacterias lácticas, no posee la capacidad de sintetizar el GSH pero puede incorporarlo del medio (Rathberger y col. 2009). El efecto antioxidante del GSH podría ayudar a *O. oeni* a mantener o mejorar su estado celular para desempeñar posteriormente la FML en el vino, contrarrestando los factores de difícil supervivencia como el bajo pH y la presencia de etanol.

Un estudio preliminar con una cepa de *O. oeni* mostró que la adición de GSH mejora su crecimiento a partir de una concentración de 1 mM. Este efecto positivo se incrementa con el aumento de GSH, observándose el máximo incremento con 5 mM de GSH. Adiciones superiores de hasta 10 mM disminuyen el efecto positivo observado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos. Glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y la glicina fueron suministrados por Sigma. El aminoácido L-cisteína hidrocloreto era de Fluka, y el ácido glutámico de AppliChem Panreac.

Cepas de *Oenococcus oeni*. Cuatro cepas de *O. oeni* se utilizaron en este estudio: CECT 217^T (ATCC 23279^T) obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) (referida en el texto como 217^T); las cepas 3P2 y 2T2 de la colección propia, previamente aisladas de vinos catalanes (de la DOQ de Priorat y la DO Tarragona respectivamente); y la cepa PSU-1 (ATCC

BAA-331), originariamente aislada de vino tinto de la Universidad Pennsylvania State.

Condiciones experimentales. Las cepas se obtuvieron de congelados a -80°C y se cultivaron hasta llegar a la fase exponencial en MRS (De Man y col. 1960) modificado suplementado con 5 g/L de ácido málico y 4 g/L de fructosa a pH 5.0. Los cultivos fueron crecidos a 28°C en un incubador de CO₂. Las células se recolectaron al final de la fase exponencial (OD_{600nm} = 1.6) y se inocularon (0.1 %) en las diferentes condiciones (pH 5, pH 4, pH 3.4, 6% y 12% etanol), con y sin GSH. En este estudio se utilizó un medio basado en el medio MRS disminuyendo la concentración de proteína: la bactopectona (10 g/L), el extracto de carne (10 g/L) y el extracto de levadura (5 g/L) se reemplazaron por peptona (20 g/L) y casaminoácidos (5 g/L) para evitar precipitaciones durante el experimento.

Medición de la densidad óptica (OD). La densidad óptica del cultivo fue seguida con un espectrofotómetro (SPECTroPOLAR).

En el presente trabajo se hizo un ensayo preliminar para determinar la acción del GSH sobre una cepa específica de *O. oeni*, a nivel conjunto y separando los aminoácidos que lo componen. Posteriormente se evaluó el efecto positivo sobre el crecimiento de cuatro cepas de *O. oeni* después de una adición de GSH, a 1 mM y 5 mM, en el medio de cultivo como parte de la adaptación a diferente pHs (5, 4 y 3,4) y concentraciones de etanol (6 y 12 %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de crecimiento de la cepa PSU-1 en las condiciones 5 mM de GSH, 5 mM de cisteína y mezclando los tres aminoácidos aportó un mismo perfil de crecimiento (Fig. 1). Los cultivos con una adición de 5mM de ácido glutámico, glicina o GSSG coincidieron con la curva del control. Por lo tanto, se puede determinar que la acción del aminoácido cisteína es la responsable del mayor crecimiento bacteriano.

En el posterior experimento, en todas las condiciones de cultivo, excepto al 12% de etanol en

que no hubo apenas crecimiento, se observó un efecto positivo derivado de la adición de GSH 1 mM (Fig. 2) y 5 mM (Fig. 3). Se ha confirmado en las cuatro cepas estudiadas que el incremento del crecimiento es superior con la adición de GSH 5 mM, aumentando más del 30% en algunos casos. Se pudo constatar que en las dos cepas de crecimiento más lento el efecto positivo del GSH se ve acentuado. La cepa PSU-1 es una de las que presenta más variación de crecimiento dependiendo si se le añade o no GSH. Esto puede deberse al crecimiento lento de la cepa que permite una mejor captación del antioxidante.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que la adición de GSH puede contribuir a mejorar las condiciones de recuperación y crecimiento de cepas de *O. oeni*, y por lo tanto podría ser aplicado a la preparación y pre-adaptación de inóculos para la FML.

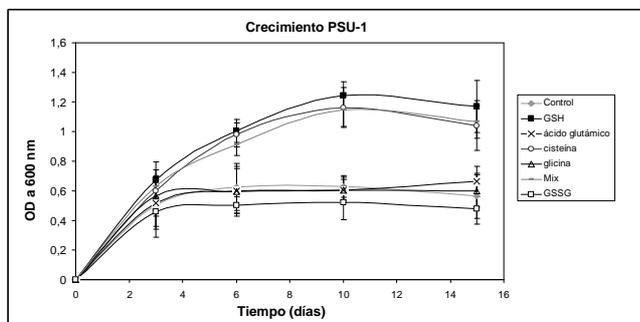


Figura 1: Crecimiento de *O. oeni* PSU-1 en medio rico con diferentes suplementaciones. ◆ Control; ■ GSH; -x- Ácido Glutámico; ○ Cisterna; △ Glicina; — Mix; □ GSSG.

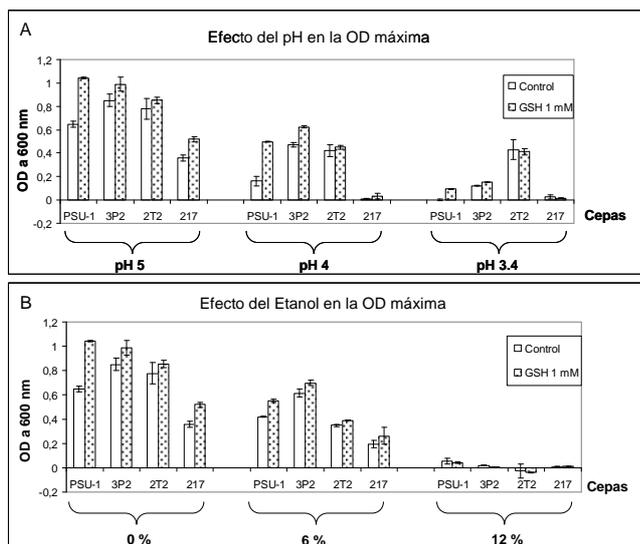


Figura 2: Crecimiento máximo (OD máxima) obtenida durante el crecimiento de cuatro cepas de *O. oeni* con y sin GSH 1 mM en diferentes condiciones de medio. A: Diferentes condiciones de pH. B: Diferentes condiciones de etanol.

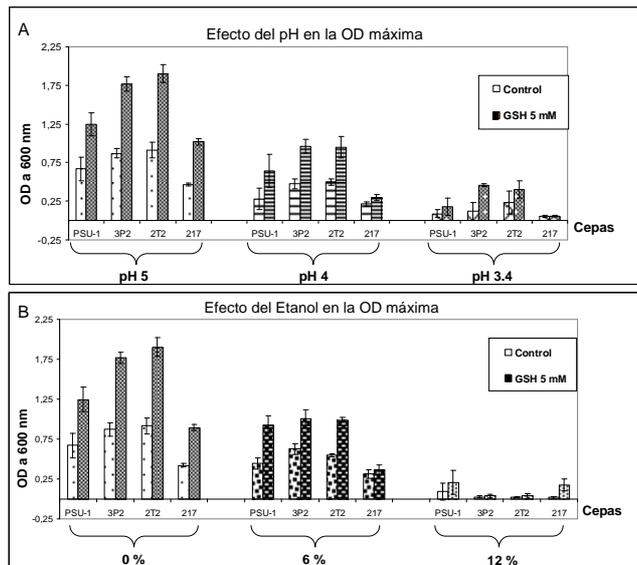


Figura 3: Crecimiento máximo (OD máxima) obtenida durante el crecimiento de cuatro cepas de *O. oeni* con y sin GSH 5 mM en diferentes condiciones de medio. A: Diferentes condiciones de pH. B: Diferentes condiciones de etanol.

BIBLIOGRAFÍA

Smimova G.V., Oktyabrsky O.N. 2005, Glutathione in Bacteria. Biochem-Moscow. 70 (11): 1199-1211.
 Rathberger M., Araque I., Olgún N., Bordons A., Reguant C. 2009, Estudio de la capacidad de captación de glutatión por *Oenococcus oeni* en diferentes fases de crecimiento y su efecto sobre la respuesta al estrés oxidativo. XXII Congreso Nacional de Microbiología SEM, Almería.
 De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960, A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bact. 23: 130-135.

Efecto de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente con actividad pectinolítica en vinos Cabernet Sauvignon

Mónica Fernández-González^{1,2}, Sergio Gómez-Alonso^{1,2}, Esteban García Romero³, Adela Mena Morales³ y Pedro M. Izquierdo Cañas^{2,3}

¹Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Universidad de Castilla-La Mancha, España,

²Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, España

³Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, España, pmizquierdo@jccm.es

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la composición físico-química, aminoacídica y fenólica de vinos de la variedad Cabernet Sauvignon elaborados con una levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CECT 11783) genéticamente modificada con el gen que codifica para la endopoligalacturonasa (*PGU1*), en fusión transcripcional con el promotor del gen de la fosfogliceratoquinasa (*PGK1*) ambos de origen *S. cerevisiae*. La gran mejora tecnológica observada fue la mayor extracción de fermentado a partir de las uvas tintas en los vinos elaborados con la cepa modificada (VM), obteniéndose un 6,1 % más de rendimiento con respecto al control (VC). Debido a la degradación de las pectinas de la uva se produjo un lógico incremento en la concentración de metanol en los vinos VM, sin embargo, estos valores se encontraron por debajo del valor máximo permitido en la legislación. En cuanto a los compuestos volátiles no existieron grandes diferencias entre los vinos, como tampoco las hubo para el color ni los compuestos fenólicos. Sin embargo, sí existió un aumento considerable en el contenido de aminoácidos en los vinos VM.

INTRODUCCIÓN

En vinificación se utilizan las pectinasas para mejorar los rendimientos de extracción de mosto, para aumentar la liberación de compuestos del color y del aroma en los mostos antes y durante la fermentación y la maceración, así como para facilitar la clarificación y filtración de los vinos (Villetaz, 1996). Estas preparaciones actúan sobre las pectinas, principales constituyentes de la lámina media y pared primaria celular de las plantas superiores. La mayoría de los preparados comerciales de pectinasas proceden de *Aspergillus niger*, sin embargo en la mayoría de los casos son mezclas de enzimas y es muy difícil comparar distintos preparados enzimáticos, cuando únicamente se busca la actividad principal (Whitehurst y col., 2009). Algunos autores describen un aumento en el contenido de antocianos y de intensidad colorante en los vinos tratados con enzimas, en cambio otros no observan ningún efecto o incluso una disminución.

La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* poseen el gen *PGU1* que codifica para una endopoligalacturonasa (Fernández-González y col., 2004), pero desafortunadamente carecen de actividad pectinolítica en condiciones enológicas.

Con este trabajo se pretende estudiar el efecto de una endopoligalacturonasa producida por una cepa de *S. cerevisiae* (CECT 11783) genéticamente modificada con el gen *PGU1*, en fusión transcripcional con el promotor del gen de la fosfogliceratoquinasa (*PGK1*) ambos de origen *S. cerevisiae* (Fernández-González y col., 2005), en la

composición físico-química, aminoacídica y fenólica de vinos de la variedad Cabernet Sauvignon.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron vinificaciones a escala de laboratorio a temperatura controlada con uvas de la var. Cabernet Sauvignon recogidas en el punto óptimo de madurez, se despalillaron y estrujaron y se distribuyeron en 6 lotes homogéneos de 6 Kg cada uno e introdujeron en depósitos de 8 L con sombrero sumergido. 3 depósitos se inocularon con 2×10^6 cel/mL de la cepa modificada genéticamente (CECT 11783) (VM) y otros 3 con la misma cepa sin modificar, que actuó como control (VC). Diariamente se controló la temperatura y la densidad, y tras la fermentación alcohólica las uvas se prensaron y se calculó el rendimiento de extracción.

Se realizaron recuentos en agar YPD y la implantación de la cepa inoculada mediante PCR utilizando los primers $\delta 12$ - $\delta 21$ (Legras y col., 2003).

Se analizaron los parámetros convencionales de los vinos según los métodos OIV (2011), los compuestos volátiles (Izquierdo y col., 2014), el contenido en aminoácidos (Gómez-Alonso y col., 2007) y compuestos fenólicos (Castillo-Muñoz y col., 2007, 2009, García-Romero y col., 2012)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa modificada realizó más rápidamente la fermentación alcohólica que la cepa control (Figura 1) y ambos procesos mostraron una adecuada viabilidad celular, obteniéndose recuentos propios en este tipo de fermentaciones. Respecto a la implantación de los cultivos, todos los aislados analizados presentaron idéntico perfil mediante el análisis de las regiones

delta al de los cultivos iniciadores, y los procedentes de las vinificaciones con la cepa 11783 mostraron, además, actividad poligalacturonásica.

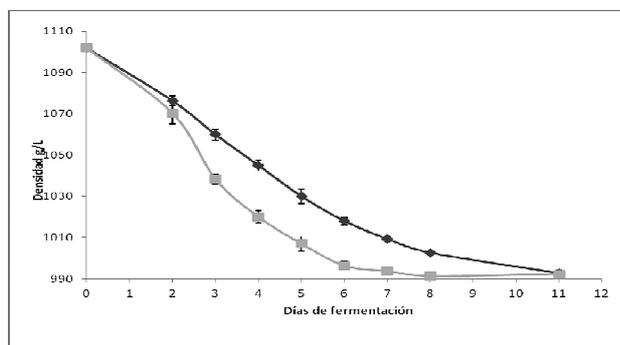


Figura 1: Evolución de la densidad respecto al tiempo de fermentación. (■) cepa modificada (●) cepa control.

La gran mejora tecnológica observada fue la mayor extracción de fermentado a partir de las uvas tintas en los vinos elaborados con la cepa modificada (VM), obteniéndose un 6,1 % más de rendimiento con respecto al control (VC). Además, se incrementó la concentración de metanol en los vinos VM, debido a la degradación de las pectinas de la uva, sin embargo, estos valores se encontraron por debajo del valor máximo permitido en la legislación. También aumentó ligeramente el contenido de acetaldehído, 1-butanol, acetoína, isobutanol y acetato de isoamilo en los vinos VM, disminuyendo el de 1-propanol y lactato de etilo.

Respecto otros compuestos volátiles minoritarios no existieron apenas diferencias para la mayoría de los compuestos estudiados, aunque algunas familias de compuestos como los ésteres etílicos y alcoholes lineales aumentaron en VM y en cambio los norisoprenoides, metoxifenoles y algunos ácidos disminuyeron.

Existió un incremento del 24,7% en el contenido total de aminoácidos en el VM, aumentando la mayoría de ellos, principalmente la prolina. Únicamente la suma de Asparragina e hidroxiprolina disminuyó en VM y para lisina, triptófano y metionina no se observaron diferencias entre los vinos.

No se observó ningún efecto en las características cromáticas del vino. Las diferencias existentes en la composición fenólica de los vinos fueron muy escasas. Tampoco se encontraron diferencias en el contenido total de antocianos, sólo se incrementaron en VM, los 3-glucosidos de delfinidina y cianidina, la vitisina B y el derivado cafeoilado del 3-glucósido de malvidina. En cuanto a los flavonoles, los únicos compuestos afectados fueron la miricetina y la quercetina libres, que disminuyeron muy ligeramente su concentración. El empleo de la levadura modificada tampoco tuvo ningún efecto en las

concentraciones de los flavan-3-oles, de los derivados de los ácidos hidroxicinámicos ni en la de los estilbenos. Considerando lo anterior y que la cepa modificada dio lugar a un mayor volumen de vino, se puede afirmar que también se produjo una mejor extracción de los compuestos fenólicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., Hermosín-Gutiérrez, I. 2009, Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 57:209-219.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2007, Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55:992-1002.
- Fernández-González M, Ubeda JF, Vasudevan TG, Cordero Otero RR, Briones AI. 2004 Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237:261–266.
- Fernández-González M., Ubeda J.F., Cordero-Otero R.R., Thanvanthri Gururajan V. Briones A.I. 2005, Engineering of an oenological *Saccharomyces cerevisiae* strain with pectinolytic activity and its effect on wine. *Int. J. Food Microbiol.*, 102:173–183.
- García-Romero, E., Castillo-Muñoz, N., Hermosín-Gutiérrez, I., Inarejos-García, A.M., Gómez, M.V., Gómez-Alonso, S. 2012, Optimization of proanthocyanidins analysis using pyrogallol as nucleophile. NMR adducts characterization. MACROWINE 2012, Bordeaux (France) 18-21 June.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín, I., García-Romero E. 2007, Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ion as aminoenones derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.*, 55:608-613.
- Izquierdo Cañas, P.M., García-Romero, E., Heras Mansó, J., Fernández-González (2014) Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. *Eur. Food Res. Technol.*, doi. 10.1007/s00217-014-2220-1.
- Legras J.L., Karst F. 2003. Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221:249-255.
- OIV Organización Internacional de la Viña y el Vino 2011, Compendium of international methods of wine and must analysis.
- Villetaz, J.C. 1996, Utilisation des enzymes en oenologie pour l'extraction de la couleur et por l'extraction et la revelation des arômes. *Bull. OIV.* 787, 843-869.
- Whitehurst, R. J., van Oort, M. 2009, In *Enzymes in Food Technology*, Second edition, Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Biodiversidad de cepas de *Hanseniaspora uvarum* en fermentaciones alcohólicas en la DOQ Priorat

Beatriz Padilla, Beatriz González, Paula López, Iara Izidoro, Gemma Beltran, Braulio Esteve-Zarzoso y Albert Mas

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, España, beatriz.padilla@fundacio.urv.cat

Durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica se ha descrito la presencia de diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces*. Estas especies son mayoritarias al principio de la fermentación, pero son reemplazadas por la especie de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la única especie aislada al final de la fermentación. De entre las especies de no-*Saccharomyces* presentes, la especie *Hanseniaspora uvarum* es la que se presenta en mayores proporciones. A pesar de que para otras especies de levaduras hay muchos métodos descritos de tipificación, para esta especie los métodos propuestos son difícilmente aplicables en rutinas de laboratorio. En el presente trabajo se han aislado levaduras durante los primeros días de fermentación espontánea en diferentes fermentaciones alcohólicas de la DOQ Priorat. Tras identificar por técnicas moleculares (amplificación y restricción de la región 5.8S-ITS, y secuenciación del dominio D1/D2 del gen 26S del rDNA) las diferentes colonias aisladas, se continuó el estudio sólo con las colonias pertenecientes a la especie *H. uvarum*. Estas colonias se caracterizaron por dos técnicas moleculares independientes basadas en PCR. Por un lado se amplificó una región entre una zona conservada del tRNA y una secuencia repetida, y por otro lado una amplificación al azar. Los resultados obtenidos muestran que la combinación de ambas técnicas permite una clara diferenciación de las diferentes cepas aisladas.

INTRODUCCIÓN

Estudios centrados en la biodiversidad levaduriforme demuestran que existe una amplia variedad de especies no-*Saccharomyces* durante las fases iniciales de la vinificación. Sin embargo, a medida que avanza dicho proceso, estas especies son reemplazadas por *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet, 2003).

Considerando la amplia diversidad y el potencial biotecnológico de las levaduras no-*Saccharomyces*, es de especial interés desarrollar metodologías de tipificación, que permitan discriminar entre los distintos aislados.

De entre las especies no-*Saccharomyces*, *Hanseniaspora uvarum* es una de las mayoritarias en los procesos de vinificación. Sin embargo, la mayoría de las técnicas de tipificación disponibles para esta especie son tediosas y difíciles de realizar en la rutina de un laboratorio.

Este trabajo tiene como objetivo llevar a cabo la tipificación de una población de aislados de *H. uvarum* procedentes de la DOQ Priorat mediante la combinación de diversas técnicas de genotipado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación. Una vez aisladas las levaduras de fermentaciones vínicas de la DOQ Priorat, los aislados se identificaron mediante la amplificación y restricción de la región 5.8S-ITS, y secuenciación del dominio D1/D2 del gen 26S del rDNA. A continuación, se

seleccionaron 98 aislados de *H. uvarum* para su tipificación, empleando los métodos que se detallan a continuación.

Tandem repeat-tRNA. Se amplificó una región entre una zona conservada del tRNA y una secuencia repetida adaptando el método propuesto por Barquet y col. (2012). Se combinó el cebador TtRNASc (5' GCTTCTATGGCCAAGTTG 3') bien con 5CAG (5' CAGCAGCAGCAGCAG 3') (RxA) o con ISSR-MB (5' CTCACAACAACAACAACA 3') (RxB).

RAPD M13. Para la amplificación de polimorfismos al azar en el ADN se empleó el cebador M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') adaptando el método descrito por Fadda y col. (2004).

Electroforesis. Los productos de las PCR se separaron mediante geles de agarosa al 2%.

Dendrograma. Las imágenes digitalizadas se analizaron con el programa BioNumerics version 6.5. La normalización se realizó con el marcador molecular de 100 pares de bases. Los niveles de similitud se calcularon empleando el coeficiente de correlación Dice y los dendrogramas se generaron empleando el algoritmo de UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 98 cepas de *H. uvarum* se tipificaron mediante las técnicas propuestas. Con todas ellas se consiguió diferenciar diversos perfiles genéticos, tal y como se puede observar en los tres dendrogramas incluidos en la Figura 1. Con RxA y M13 se observan 7 patrones distintos (A1-A7 y M1-M7), mientras que con RxB se pueden diferenciar hasta 10 (B1-B10). Cabe mencionar que con los tres métodos encontramos un

patrón claramente mayoritario, en el que se incluyen alrededor de 80 cepas, son los perfiles A3, B2 y M1. El resto de grupos se componen de un número menor de aislados, que oscila entre 1 y 11.

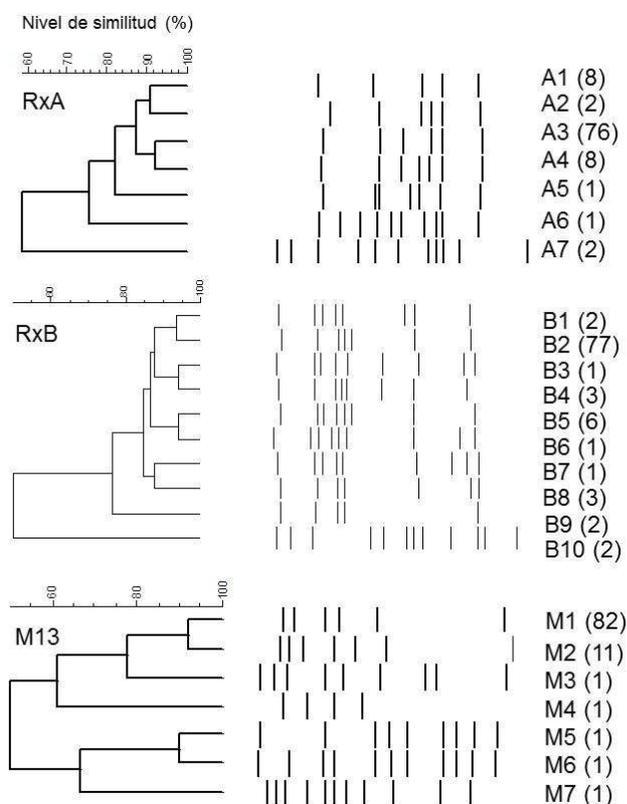


Figura 1: Dendrogramas donde se representa la relación de los aislados de *H. uvarum* para cada una de las técnicas empleadas. Se incluye sólo un representante de cada perfil. Entre paréntesis se indica el número de aislados que se incluyen en cada grupo.

Tanto con la combinación RxA como con RxB, se diferencian 3 grupos con un nivel de similitud del 80%, sin embargo, con RAPD-M13 al mismo nivel de similitud se pueden observar 5 grupos, lo que nos indica que los perfiles obtenidos con esta técnica están más alejados entre sí.

Para obtener una mayor diferenciación, se construyó un dendrograma combinando las técnicas propuestas, representado en la Figura 2. Así, se observa que se obtienen un total de 18 perfiles distintos (A-R), siendo E y B los que incluyen un mayor número de aislados. En este caso, con un nivel de similitud del 80% se diferencian 4 grupos, incluyéndose en el primero de ellos hasta 15 perfiles distintos (A-O).

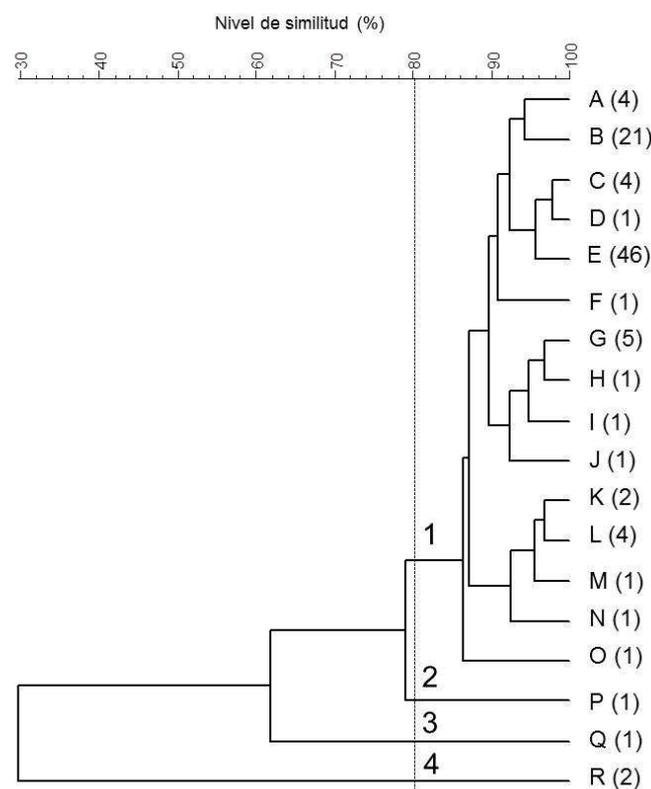


Figura 2: Dendrograma combinado donde se representa la relación de los aislados de *H. uvarum*. Entre paréntesis se muestra el número de aislados que se incluyen en cada grupo.

La combinación de las técnicas propuestas permite realizar una clara diferenciación de las diferentes cepas de *H. uvarum* aisladas de la DOQ Priorat.

BIBLIOGRAFÍA

- Barquet, M., Martín V., Medina K., Pérez G., Carrau F., Gaggero C. 2012, Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93:807-814.
- Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M., Cosentino, S. 2004, Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 95:51-59.
- Fleet, G.H. 2003, Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 87:11-22.

Agradecimientos: el presente trabajo se encuentra enmarcado en el Proyecto Europeo Wildwine (Ref. 315065).

Un nuevo medio de cultivo para la producción de cultivos iniciadores malolácticos de *O. oeni*

Carmen Berbegal, Yaiza Benavent-Gil, Isabel Pardo y Sergi Ferrer

ENOLAB. ERI BioTecMed/IViSoCa. Universitat de València, Dr. Moliner 50. Burjassot. Valencia
carmen.berbegal@uv.es; Sergi.Ferrer@uv.es

En este trabajo se presenta un medio de cultivo que permite obtener altos niveles de biomasa de *Oenococcus oeni* aclimatadas al vino. Para ello, se ensayaron 27 medios de cultivo de composición diferente. Todos contenían una base principal de mosto y vino, y complementos nutricionales con el fin de beneficiar el crecimiento bacteriano, como extracto de levadura, Tween 80, ácido málico y zumo de tomate, pero con diferentes valores de pH, niveles de etanol y concentración de mosto. Una vez desarrollada *O. oeni* en todos los medios de cultivo, se procedió a su inoculación en vino tinto y se estudió el consumo de ácido málico mediante cromatografía líquida. Los resultados mostraron que el medio de cultivo optimizado denominado OPM (*Oenococcus* Production Medium) permitía la obtención de elevadas cantidades de biomasa de *O. oeni* (1×10^9 ufc/mL) y la adaptación de las bacterias a las condiciones del vino, consumiendo estas todo el ácido málico en 6 días a un nivel de inoculo de 1×10^6 ufc/mL.

INTRODUCCIÓN

La fermentación maloláctica (FML) es fundamental para la calidad del vino, especialmente para los vinos tintos. Se trata de la transformación del ácido L-málico procedente de las uvas, de un gusto fuerte y áspero, en ácido L-láctico, de gusto más agradable, liberándose además CO₂ (Kunkee, 1991). Una de las estrategias utilizadas para controlar la realización de la FML de forma adecuada, consiste en la inducción de ésta con cultivos iniciadores malolácticos, que en general consisten en cepas de *O. oeni*. Los medios de laboratorio utilizados para el crecimiento de esta bacteria suelen producir unas cantidades elevadas de biomasa, pero con una baja o nula capacidad de aclimatación al vino. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un medio de cultivo líquido que consiguiera altas concentraciones de *O. oeni*, y que al mismo tiempo aclimatara las células a las condiciones del vino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos. *O. oeni* E5003 (Colección ENOLAB, Universitat de València).

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Se estudió el crecimiento de *O. oeni* E5003 en 27 medios de cultivo (Tabla 1). Todos ellos contenían de base: extracto de levadura (5 g/L), infusión de zumo de tomate (23 mL/L), Tween 80 (0.5 mL/L), ácido L-málico (3 g/L) y vino blanco concentrado reconstituido (400 mL/L). A la base se le añadió mosto blanco comercial concentrado, el cual se diluyó 4, 6 y 8 veces (576.5 mL/L), el pH se ajustó a 3.8, 4 y 4.5 y el grado de etanol a 4%, 6% y 8% (v/v). *O. oeni* E5003 se cultivó previamente en MLO (Zuñiga y col., 1993) hasta alcanzar la fase estacionaria y se inoculó en los 27 medios de cultivo a una concentración final de 1×10^6 ufc/mL. El crecimiento bacteriano fue determinado

midiendo la densidad óptica a 600 nm durante 7 días a 28 °C. La curva de crecimiento fue transformada en un valor de área bajo la curva (ABC) (Gagnon y col., 1998) mediante el programa GraphPad Prism 5. El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo mediante el test ANOVA y *post-hoc* de Tukey con el programa SPSS Statistics 19.

Tabla 1: Combinación de factores (mosto, etanol y nivel de pH) de 27 los medios de cultivo utilizados para el cultivo de *O. oeni* E5003.

MEDIO	MOSTO	ETANOL	pH
1	1/4	4	3.8
2	1/4	4	4
3	1/4	4	4.5
4	1/4	6	3.8
5	1/4	6	4
6	1/4	6	4.5
7	1/4	8	3.8
8	1/4	8	4
9	1/4	8	4.5
10	1/6	4	3.8
11	1/6	4	4
12	1/6	4	4.5
13	1/6	6	3.8
14	1/6	6	4
15	1/6	6	4.5
16	1/6	8	3.8
17	1/6	8	4
18	1/6	8	4.5
19	1/8	4	3.8
20	1/8	4	4
21	1/8	4	4.5
22	1/8	6	3.8
23	1/8	6	4
24	1/8	6	4.5
25	1/8	8	3.8
26	1/8	8	4
27	1/8	8	4.5

Fermentación maloláctica en vino. Las células que alcanzaron un valor de ABC superior a 2 en los medios anteriores se inocularon en vino filtrado para determinar la

actividad maloláctica. Se inocularon a razón de 1×10^6 ufc/mL. La composición del vino fue: 12% (v/v) de etanol, <1.0 g/L de azúcares, 3.0 g/L de ácido málico y con un nivel de pH de 3.5. La FML se realizó a 28 °C y se monitorizó periódicamente a través de la cuantificación de ácido málico siguiendo la metodología descrita por (Frayne, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del nivel de pH, grado de etanol y concentración de mosto sobre el crecimiento

El crecimiento de la cepa *O. oeni* E5003 en los 27 medios de cultivo se muestra en la Figura 1. Se observó que cuando el mosto blanco concentrado se diluyó 4 veces (medios 1-9) el crecimiento era inferior que cuando se diluía 6 (medios 10-18) u 8 veces (medios 19-27). En todos los casos, el crecimiento a pH de 4.5 resultó en un mayor valor de ABC que a pHs inferiores. El mayor crecimiento se obtuvo con el medio 12, que contenía el mosto diluido 6 veces, un grado de etanol del 4% (v/v) y un nivel de pH de 4.5 y el menor desarrollo se obtuvo en el medio 7, con el mosto diluido 4 veces, un grado de etanol del 8% (v/v) y un nivel de pH de 3.8.

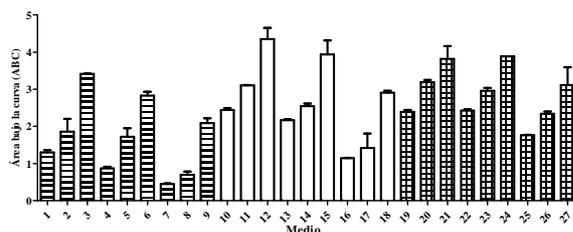


Figura 1: Valores de ABC de *O. oeni* E5003 en los 27 medios de cultivo tras la incubación 7 días de incubación a 28 °C.

El análisis de los datos mediante el test ANOVA mostró que las diferencias eran significativas ($p < 0.05$) para la dilución del mosto, la concentración de etanol y el nivel de pH y para las interacciones dilución de mosto-etanol y dilución de mosto-pH. Mediante el test *post-hoc* de Tukey se agruparon los medios en los que la bacteria presentaba un crecimiento similar. De todos ellos se descartaron aquellos que presentaron una ABC inferior a 2 (1, 2, 4, 5, 7, 8, 16, 17 y 25). Los 18 cultivos restantes se inocularon a vino tinto para determinar la actividad maloláctica.

Actividad maloláctica en vino tinto

Se encontraron diferencias en la actividad maloláctica de *O. oeni* E5003 en los vinos inoculados con células procedentes de distintos medios de cultivo (Figura 2). Las diferencias en la actividad maloláctica dependían principalmente del valor de pH del medio

de cultivo de procedencia. Los cultivos procedentes de medios de pH de 4.5 presentaron un menor consumo de ácido málico. Por el contrario, los cultivos procedentes de un medio con un pH de 3.8 eran capaces de consumir el ácido málico en 6 días. Estos resultados pueden relacionarse con el hecho de que este pH es más similar al pH del vino en el que se inocularon y por tanto las células estaban más adaptadas. De los 18 cultivos, los procedentes de los medios 10, 13, 19, 22 y 26 (Figura 2) consumieron el 100% de ácido málico en 6 días.

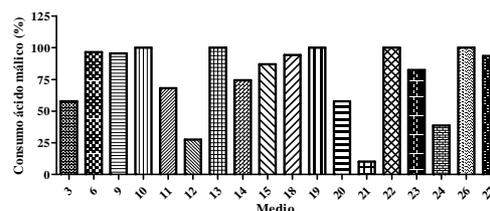


Figura 2: Consumo de ácido málico (%) a los 6 días en vino tinto por de *O. oeni* E5003 previamente cultivada en los distintos medios de cultivo.

CONCLUSIONES

Aunque entre estos cultivos no se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento de *O. oeni* E5003 (Figura 1), se escogió el medio 10 por ser en el cual la bacteria presentó el mayor valor de ABC. Este medio de cultivo, denominado *Oenococcus* Production Medium (OPM) era el que contenía el mosto diluido 1/6, un grado de etanol de 4% y un nivel de pH de 3.8. El cultivo de las células en OPM permite obtener una población de *O. oeni* de 1×10^9 ufc/mL en 7 días de incubación a 28 °C y una buena actividad maloláctica al ser inoculado en vino en una concentración final de 1×10^6 ufc/mL, consumiendo el 100% de ácido málico en 6 días.

BIBLIOGRAFÍA

- Frayne, R.F., 1986. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high-performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37: 281-287.
- Gagnon, R., Peterson, J., 1998. Estimation of confidence intervals for area under the curve from destructively obtained pharmacokinetic data. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, 26: 87-102.
- Kunkee, R.E., 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol. Rev.*, 88: 55-72.
- Zúñiga, M., Pardo, I., Ferrer, S. 1993. An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.*, 18: 37-42.

Interacciones entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora uvarum* en fermentaciones alcohólicas

Chunxiao Wang, Albert Mas y Braulio Esteve-Zarzoso

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo s/n, Tarragona 43007, España, braulio.esteve@urv.cat

La fermentación alcohólica es un proceso microbiológico complejo en el que diferentes especies de levaduras se encuentran involucradas. Las especies de levaduras no-*Saccharomyces* son mayoritarias al principio de la fermentación, pero que son reemplazadas por la especie de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* al final de la fermentación. Recientes estudios indican que el contacto entre células o compuestos “killer” producidos por *S. cerevisiae* son los responsables de esta dominancia. En este trabajo, se ha realizado el seguimiento de las poblaciones de levaduras en fermentaciones mixtas (*S. cerevisiae* y *H. uvarum*) en varios dispositivos, de manera que las células estaban en compartimentos separados (o no), utilizando diferentes volúmenes de cultivos entre los compartimentos. Los resultados muestran que las poblaciones de *H. uvarum* decrecen bruscamente cuando son inoculadas junto con *S. cerevisiae*, tanto juntas como en compartimentos diferentes. La capacidad de crecimiento en placa de cultivo disminuye cuanto mayor es la proporción de *S. cerevisiae* presente en el dispositivo. Por lo tanto, el contacto célula-célula no parece ser el principal responsable de la falta de cultivabilidad de *H. uvarum*. A partir de fermentaciones puras con las diferentes especies de levaduras, se recolectaron células para comprobar si la presencia de metabolitos excretados por *S. cerevisiae* eran los responsables de esta pérdida de cultivabilidad. Los resultados muestran que, a pesar de que el etanol se ha asociado siempre con esta mortalidad, la ausencia de compuestos nitrogenados, u otros factores, tienen un papel fundamental en la falta de cultivabilidad de *H. uvarum* en las últimas etapas de la fermentación alcohólica.

INTRODUCCIÓN

La transformación del mosto de uva en vino es el resultado de la acción de diferentes tipos de microorganismos, principalmente levaduras. Utilizando técnicas dependientes de cultivo se ha podido constatar que al principio de la fermentación alcohólica destacan levaduras denominadas de bajo poder fermentativo, o no-*Saccharomyces*, y que son reemplazadas por levaduras con mayor poder fermentativo, siendo mayoritaria la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Pero los mecanismos implicados en esta sucesión, entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, aún no están bien establecidos. Hay diferentes teorías, unas basadas en la diferente tasa de consumo de los nutrientes presentes (Albergaria y col., 2003), otras teorías sobre el efecto Crabree y la producción de calor para adecuar el ambiente (Salvadó y col., 2011); por otro lado también se ha estudiado la presencia de diferentes tipos de compuestos que puede afectar de diferente manera a ambos tipos de levaduras, y por último el contacto entre las células de los dos grupos (Nissen y col., 2003).

Para estudiar este aspecto, se han realizado fermentaciones alcohólicas en dispositivos en los que se separaba físicamente los dos tipos de levaduras y se analizaba la población tanto por placa como por microscopio óptico. También se realizaron ensayos para ver el efecto de los metabolitos procedentes de la

fermentación de *S. cerevisiae* en las poblaciones de *Hanseniaspora uvarum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de levaduras y medios. Las cepas de levaduras de *H. uvarum* y *S. cerevisiae* se aislaron en la DOQ Priorat y pertenecen a la colección privada del grupo. El mosto utilizado es una dilución a 200 g/L desde mosto natural concentrado. Las muestras se analizaron en placas de medio YPD y microscopio óptico.

Dispositivos compartimentalizados. El volumen utilizado fue de 20 ml, con una relación 1:1 en el caso de fermentaciones mixtas. La división se realizó de manera aséptica con una membrana de diálisis (Sigma-Aldrich, MWCO 12.4 kDa).

Interacción de metabolitos de fermentación. Se realizaron fermentaciones con mosto para obtener sobrenadantes de fermentaciones de *S. cerevisiae*. A partir de cultivos adaptados en mosto de *H. uvarum* se inocularon diferentes medios: i) sobrenadantes de fermentaciones de *S. cerevisiae*, ii) mosto sintético simulando las mismas concentraciones de Nitrógeno y Etanol, y III) medio de cultivo YPD.

Efecto del etanol en *H. uvarum*. A partir de células de *H. uvarum* adaptadas se comprobó la adaptación a diferentes concentraciones de etanol y a concentraciones crecientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se puede ver la evolución de las fermentaciones en dispositivos compartimentalizados

y sin separación. Aunque la cinética de fermentación es similar, cuando las células están en compartimentos separados el descenso de la cultivabilidad de *H. uvarum* se retrasa, manteniéndose los niveles de *S. cerevisiae* similares en ambos dispositivos.

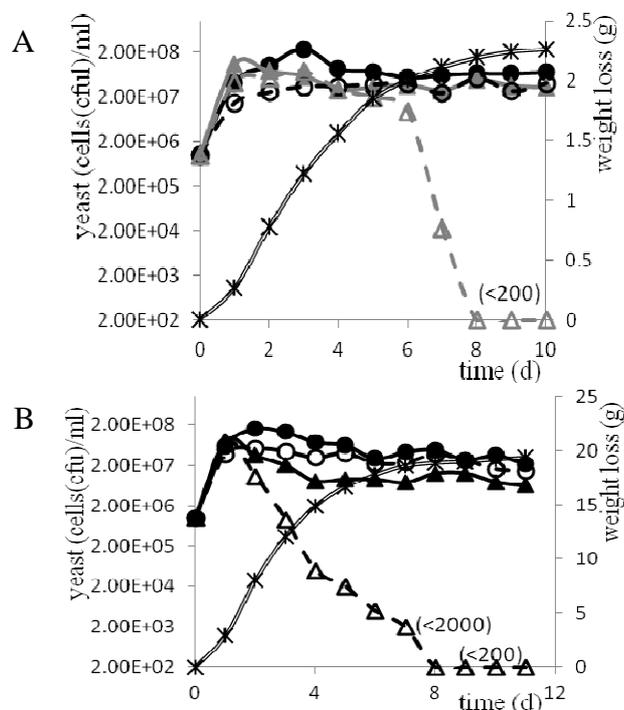


Figura 1: Evolución de las poblaciones de *S. cerevisiae* (●, ⊙), *H. uvarum* (▲, △), y pérdida de peso (✱). De fermentaciones mixtas separadas (A) y sin separación (B). Líneas continuas pertenecen a placas de cultivo, discontinuas microscopio.

Los resultados indican que la separación física de las células de las dos especies parece afectar a la cultivabilidad de *H. uvarum*. Pero no es el único factor a tener en cuenta, porque en compartimentos separados a partir de los seis días se observa una disminución de poblaciones cultivables de *H. uvarum*, por lo tanto esto nos hace pensar que se pueda tratar de la presencia de algún compuesto tóxico.

Para estudiar el origen de estos compuestos se sembró el mismo número de células de *H. uvarum* en los diferentes medios indicados en materiales y métodos. Las células adaptadas proceden de un cultivo en mosto a las 72 h y 96 h, con un contenido de azúcar de 34,0 y 9 g/L, y 10,1 y 10,3% de etanol, respectivamente. Después de inocular las de células se analizó la población viable tras 24 y 48h. Las células que se inocularon en medio de cultivo YPD o en mosto sintético han mantenido la viabilidad, pero cuando se inocula en sobrenadante procedente de una fermentación de *S. cerevisiae*, hay una disminución de la población a las 24 h, independientemente del momento de adaptación de las células (Figura 2). Pero

cuando se inocula en un mosto sintético que emula las condiciones de nitrógeno y etanol de un mosto en fermentación hay una disminución, aunque en este caso no fue tan pronunciada como cuando se utiliza el sobrenadante de la fermentación de *S. cerevisiae*.

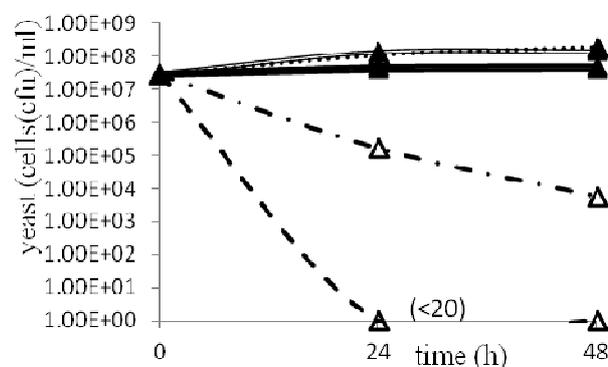


Figura 2: Evolución de las poblaciones de *H. uvarum* en diferentes medios: sobrenadantes de fermentaciones de *S. cerevisiae* (●, —▲—), mosto sintético “adaptado” (▲, —△—), mosto sintético (△, - - -), YPD (△, ···△···). Líneas continuas pertenecen a placas de cultivo, discontinuas microscopio.

Para comprobar que el etanol no es el único compuesto responsable, a la misma concentración de células se les añadió mosto sintético con diferentes concentraciones de etanol y el mismo nivel de azúcares. Los resultados mostraron que las células de *H. uvarum* adaptadas podían continuar fermentando azúcares, pero la viabilidad de estas células fue disminuyendo a medida que se incrementaba el nivel de etanol en el medio de partida.

Todos estos resultados parecen indicar que no hay un único factor como el principal responsable de la pérdida de viabilidad celular de *H. uvarum*. Sino que hay una serie de factores, entre los que destacan el etanol, los bajos niveles de compuestos nitrogenados y metabolitos con efecto “killer”, los verdaderos responsables del efecto letal en las células de *H. uvarum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Albergaria, H., Torrão, A.R., Hogg, T., Gírio, F.M. 2003. Physiological behaviour of *Hanseniaspora guillemontii* in aerobic glucose-limited continuous cultures. *FEMS Yeast Res.* 3:211-216.
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N. 2003. Viable *S. cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20:331-341.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., Guillamón, J.M. 2011. Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantages of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28:1155-1161.

Estudio de la implantación de cepas de bacterias lácticas autóctonas en la elaboración de queso Manchego

² Susana Seseña, ² Justa M^a Poveda, ¹ Lourdes Cabezas, ¹ José Fernández- Salguero, ² M^a de los Llanos Palop

¹ *Bromatología y Tecnología de Alimentos, Universidad de Córdoba, España, aolfecaj@uco.es*

² *Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Universidad de Castilla- la Mancha, España*

INTRODUCCIÓN

El queso Manchego es un queso curado, semiduro y de coagulación enzimática elaborado con leche de oveja de la raza Manchega, en la región de Castilla-La Mancha. La leche empleada en su fabricación puede ser cruda (queso artesanal) o pasteurizada (queso industrial). En la fabricación industrial, se emplea usualmente un cultivo iniciador comercial mixto, práctica que ha llevado a la pérdida de la biodiversidad propia de los procesos en los que tiene lugar una fermentación espontánea, y la consiguiente pérdida de las características organolépticas típicas de los quesos Manchegos artesanales. Para evitar este problema se propone la utilización como “starter” de cepas autóctonas obtenidas de quesos artesanales que presenten adecuadas propiedades tecnológicas.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de implantación de diferentes cepas de bacterias lácticas autóctonas para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de queso Manchego industrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos iniciadores para la fabricación de los quesos.

En la Tabla 1, se presentan las cepas utilizadas en la fabricación de los quesos y las proporciones en las que fueron añadidas. Las cepas empleadas para elaborar los lotes L1, L2 y L3 procedían de la colección de bacterias lácticas del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UCLM y habían sido previamente caracterizadas desde el punto de vista genético y tecnológico y seleccionadas por su potencial uso como cultivos iniciadores para fabricar queso Manchego. Para elaborar el lote control (LC) se utilizó un cultivo comercial (Choozit). Antes de proceder a la fabricación de los quesos, las cepas mantenidas en congelación fueron subcultivadas en leche desnatada esterilizada e incubadas durante 24 h a 30°C aquellas de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* y durante 48-72 h a 37°C las del género *Lactobacillus*.

Los quesos se elaboraron siguiendo la tecnología de fabricación del queso de D.O. “Manchego” (BOE, 1995).

Antes de la inoculación de cada uno de los cultivos iniciadores, la leche (70 L/cuba) se calentó a 30°C. La tasa de inoculación para el lote de quesos fabricado con el cultivo iniciador comercial fue de 1,5 g 100 L⁻¹ y en el caso de los quesos fabricados con los cultivos autóctonos (L1, L2 y L3) de 1,5% (v/v), alcanzando un recuento microbiano de 10⁸ ufc mL⁻¹. Para la coagulación de la leche en cada una

de las cubas, se añadieron 1,6 g de cuajo animal (1/150000; 94% quimosina y 6% pepsina (Rhodia, Dangé-Saint Romain, France). Los quesos se prensaron durante 4 h a 15°C, se salaron en una salmuera de NaCl 18% (v/v) durante 18 h a 10°C y se maduraron en cámaras a 12°C y con una H. R. del 85% durante 8 meses. De cada una de la cubas se obtuvieron 6 quesos de entre 3 y 3,5 kg de peso.

De cada uno de los 4 lotes, se elaboraron 2 replicados independientes en semanas consecutivas.

Tabla 1: Cepas empleadas en la fabricación de los quesos Manchegos.

QUESO	CEPAS	PROPORCIÓN
L1	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 7883 + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 7884	1:1
L2	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 7883 + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 7884 + <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CECT 7882	1:1:2
L3	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 7883 + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT 7884 + <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CECT 7882 + <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> CECT 7885	1:1:1,5:1,5
LC	2 cepas de <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	No especificado

Análisis microbiológicos. Los análisis microbiológicos se realizaron en la leche después de la inoculación, en la cuajada y en los quesos a 1, 10, 30, 60, 150 y 240 días de maduración.

La preparación de las muestras y las diluciones decimales para los recuentos microbiológicos se realizaron según la norma FIL- IDF Standard 112C (1992). Los medios de cultivo y condiciones de incubación utilizadas fueron los siguientes: agar Plate Count para el recuento de bacterias aerobias totales, 30°C durante 72 h; agar Rogosa para *Lactobacillus*, 37°C durante 48 h en anaerobiosis; agar M-17 para *Lactococcus*, 30°C durante 24 h y agar MSE para *Leuconostoc*, 22°C durante 4 días. Los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo (ufc g⁻¹).

Implantación de los cultivos inoculados. De las placas contables de los medios Rogosa, M17 y MSE, se picaron al azar un número representativo de colonias que se sembraron en los correspondientes medios de cultivo para su purificación. Una vez purificados se sembraron en MRS y se conservaron a -80°C, con un 20% (v/v) de glicerol. Los aislados puros y las cepas inoculadas fueron genotipadas mediante la técnica Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) y seguidamente se compararon los perfiles de los aislados obtenidos de las placas con aquellos de las cepas inoculadas. La implantación de cada una de las cepas inoculadas se calculó como el número de

colonias con el perfil RAPD-PCR específico, dividido por el número total de colonias picadas, expresado en tanto por ciento (Ruiz-Barba y col., 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los recuentos de bacterias lácticas en las muestras tomadas en cada uno de los tiempos indicados obtenidos en los medios M17, Rogosa y MSE para los 4 lotes de quesos fabricados con los distintos cultivos iniciadores.

De las placas de los recuentos de todos los lotes se obtuvieron un total de 960 aislados. El análisis de los perfiles RAPD-PCR de los aislados y de las cepas inoculadas, permitió el agrupamiento de los aislados en clusters y la obtención de un dendograma de similitud para cada uno de los lotes de quesos. El coeficiente de similitud aplicado para el agrupamiento de los aislados fue aquel obtenido en el estudio de reproducibilidad ($r = 80\%$).

El análisis de los perfiles RAPD-PCR permitió asignar los aislados a 3 diferentes orígenes: la leche, los cultivos iniciadores y otros. En la Figura 2, se muestra la proporción de aislados de los distintos orígenes en cada uno de los tiempos muestreados en los 4 lotes. La mayoría de las cepas procedían de la leche con porcentajes entre 7%-100%. Cuando se comparan los distintos cultivos iniciadores ensayados, puede observarse que las cepas de *Lactococcus lactis* procedentes del cultivo comercial mostraron la menor implantación ya que solo se encontraron en las muestras de queso de 60 y de 240 días de maduración. Por el contrario, las cepas autóctonas utilizadas en los diferentes lotes mostraron una buena implantación, en torno al 50%, excepto la cepa CECT 7885 de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* que sólo se recuperó en un 28,6% de las muestras analizadas.

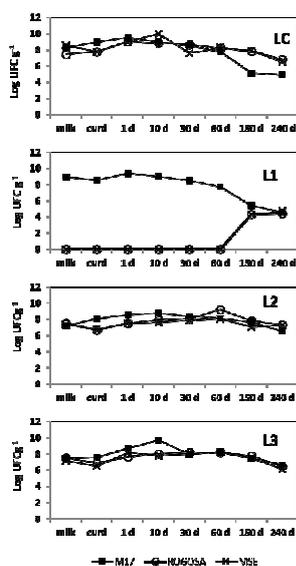


Figura 1: Recuentos de bacterias lácticas en los quesos Manchego elaborados con diferentes cultivos iniciadores.

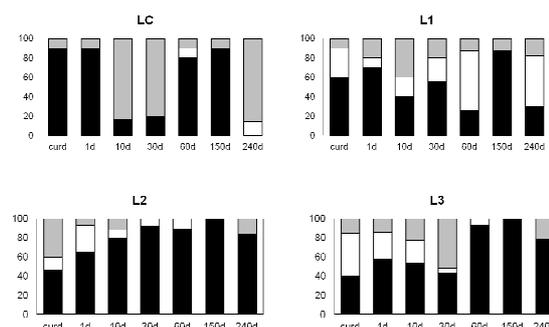


Figura 2: Proporciones relativas de las cepas de distinto origen durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso (d = días) leche ■ cultivo iniciador □ otros ▨

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permiten concluir que las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (CECT 7883 y CECT 7884) y de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (CECT 7882) son cepas bien adaptadas a las condiciones del proceso de elaboración del queso Manchego, por lo que podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores para fabricar quesos Manchegos industriales con mayor éxito de implantación que las comerciales, manteniendo además las características típicas de esta variedad de queso.

BIBLIOGRAFÍA

- BOE, 1995. Boletín Oficial del Estado de 19 de Mayo. Reglamento de la Denominación de Origen Queso Manchego y de su Consejo Regulador. Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de 11 de Diciembre de 1995, España.
- Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Warner, P. J., Jiménez-Díaz, R. 1994, Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2059–206

Efecto de los aminoácidos aromáticos y sus compuestos derivados bioactivos sobre el crecimiento de diferentes levaduras vínicas.

Jennifer Vázquez, Beatriz González, Gemma Beltran, M^a Jesús Torija y Albert Mas

Biotechnologia Enològica. Dept. Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia. Universitat Rovira i Virgili C/ Marcel·lí Domingo s/n. 43007 Tarragona, España 977558463. jenifer.vazquez@urv.cat

Algunos compuestos derivados del metabolismo de los aminoácidos aromáticos pueden actuar como reguladores del crecimiento y de la morfología de las levaduras (*quorum sensing*). De hecho, las levaduras son capaces de adaptarse de manera colectiva a las condiciones del medio, y uno de estos mecanismos de adaptación consiste en la secreción de sustancias que ejercen una señal intracelular, como algunos alcoholes superiores derivados del metabolismo de aminoácidos aromáticos (tirosol, triptofol, feniletanol). Asimismo, se ha descrito que la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), derivada del metabolismo del triptófano, se sintetiza durante la fermentación alcohólica, desconociéndose cuál es el papel que desempeña para la levadura. Otros metabolitos relacionados con ésta son la triptamina y la serotonina, que son asimismo compuestos bioactivos. El objetivo de este estudio es evaluar cómo afectan las diferentes concentraciones de estos compuestos bioactivos al crecimiento de diferentes especies y cepas de levaduras. Para ello, se monitorizó el crecimiento de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum*, *Mestchnikowia pulcherrima* y *Torulaspora delbrueckii*, a diferentes concentraciones de Melatonina, Serotonina, Triptófano, Triptofol y Triptamina. Los resultados obtenidos fueron diferentes para cada una de las levaduras estudiadas, pero se observó de forma general que los compuestos que causaron una mayor inhibición en la mayoría de las especies fueron la triptamina y el triptofol.

INTRODUCCIÓN

Durante la fermentación, el nitrógeno es uno de los nutrientes más limitantes para el crecimiento y la actividad de las levaduras. Sin duda, el mayor desequilibrio entre los nutrientes básicos se da entre la fuente de carbono (azúcares) y la fuente de nitrógeno (amonio y aminoácidos). Sin embargo no todas las fuentes de nitrógeno pueden ser consideradas igualmente óptimas en cuanto al aumento de biomasa producido. Entre las fuentes que producen un crecimiento rápido se encuentran aminoácidos como la glutamina, asparagina, glutamato y alanina, que producen derivados carbonados, que son rápidamente integrados en el metabolismo fermentativo de la levadura. Por el contrario, entre las fuentes que producen un menor crecimiento se encuentran los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) y ramificados (leucina, isoleucina y valina), que producen complejos cetoácidos, que deben ser convertidos en complejos aldehídos y alcoholes superiores para su eliminación (Beltran y col., 2005).

Estos alcoholes superiores además de su contribución en el aroma del vino, se han relacionado con la señalización celular y el *quorum sensing* en levaduras (Chen y Fink., 2006).

Adicionalmente, como resultado del metabolismo del triptófano, las levaduras producen otros metabolitos indólicos relacionados y que presentan

actividad biológica como la serotonina, triptamina y melatonina (Rodríguez-Naranjo y col., 2012). Dichas sustancias tienen un efecto también sobre el propio desarrollo de las levaduras, por lo que el conocimiento de su regulación y metabolismo pueden resultar interesantes.

El objetivo del presente trabajo es estudiar cómo afectan estos compuestos bioactivos presentes en bebidas fermentadas al crecimiento de diferentes especies y cepas de levaduras vínicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas vínicas utilizadas fueron tanto cepas comerciales como aislados naturales del género *Saccharomyces*: *S. cerevisiae* S1, *S. cerevisiae* SB, *S. cerevisiae bouldarii* (Levucell SC20), y cuatro cepas de levaduras no-*Saccharomyces*: *Candida zemplinina* Cz4, *Hanseniaspora uvarum* Hu4, *Mestchnikowia pulcherrima* Mpp y *Torulaspora delbrueckii* Tdp.

Condiciones de crecimiento. El medio utilizado para el crecimiento fue un medido mínimo con Yeast Nitrogen Base (YNB) sin aminoácidos ni amonio y suplementado con 300 mg/L de nitrógeno. Al medio se añadió el compuesto a estudiar: melatonina, serotonina, triptófano, triptamina, triptofol, feniletanol y tirosol. Se testaron diferentes concentraciones desde 0,1ppm hasta 1000ppm.

Metodología. En cada caso se inoculó 2×10^6 cel/mL y se monitorizó el crecimiento durante 48 h en un lector de microplacas, con lecturas cada 30 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Melatonina y Serotonina

La melatonina no afectó a la velocidad de crecimiento en ninguna de las cepas aunque sí se observó que a la concentración más alta (1000 ppm), en cepas de *S. cerevisiae* como la S1, SB y en la *T. delbrueckii* Tdp disminuía la OD máxima del cultivo.

Respecto a la serotonina el efecto que ejerce en cada una de las levaduras estudiadas es diferente. En algunas no tiene ningún efecto, sin embargo, en otras compromete fuertemente el crecimiento. En cepas como *S. cerevisiae* S1, a partir de 500 ppm, la velocidad de crecimiento se reduce drásticamente, así como su OD máxima (Figura 1). Lo mismo ocurre con la cepa SC20, aunque no en la SB, por lo que parece no ser un efecto cepa dependiente. Este mismo compuesto también produjo una disminución de la tasa de crecimiento y de la OD máxima de la *T. delbrueckii* Tdp.

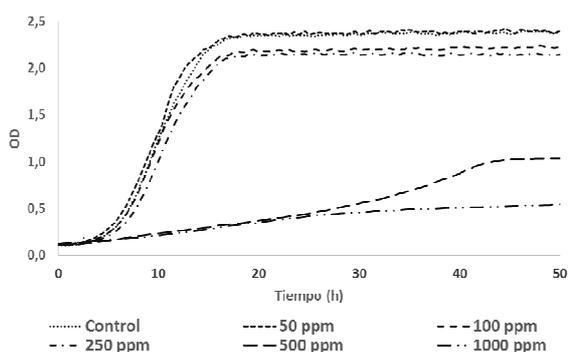


Figura 1: Cinética del crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* S1 a diferentes concentraciones de serotonina.

Triptófano y triptamina

El triptófano no afectó a la cinética de crecimiento en ninguna de las cepas estudiadas mientras que la presencia de triptamina en el medio ejercía un efecto negativo en el crecimiento de todas ellas, excepto en *M. pulcherrima* Mpp. A elevadas concentraciones, de 500 a 1000 ppm, la mayoría de cepas presentaba una fase de latencia más larga, incluso de hasta 15 h en *S. cerevisiae* S1 (Figura 2). En otras levaduras, como *H. uvarum* Hu4, altas concentraciones de esta amina biógena inhibieron el crecimiento. Este efecto puede ser debido a la toxicidad que puede ejercer esta amina sobre la levadura.

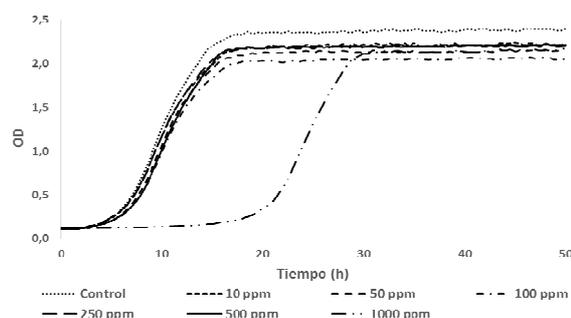


Figura 2: Cinética del crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* S1 a diferentes concentraciones de triptamina.

Alcoholes superiores

De los tres alcoholes superiores estudiados: triptofol, tirosol y feniletanol, el primero era el que más afectaba al crecimiento y desarrollo de las levaduras.

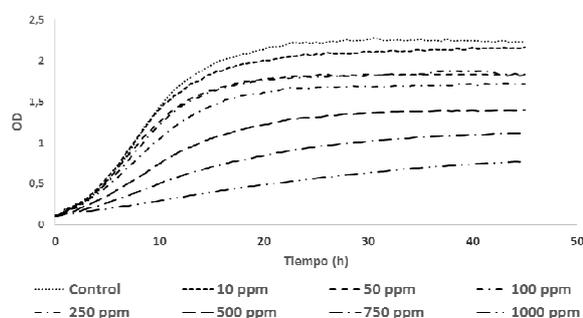


Figura 3: Cinética del crecimiento de la cepa de *H. uvarum* Hu4 a diferentes concentraciones de triptofol.

En todas las cepas, altas concentraciones de triptofol disminuían la velocidad de crecimiento, obteniéndose además una OD máxima muy inferior al control (Figura 3). Las concentraciones de los alcoholes tirosol y feniletanol ejercían un efecto negativo sobre el crecimiento a concentraciones muy altas como 750 y 1000 ppm. Esto puede ser debido a una posible toxicidad del grupo alcohol sobre las levaduras, especialmente en las no-*Saccharomyces*.

El presente trabajo forma parte del proyecto AGL2013-47300-C3-1-R del Ministerio de Economía y Competitividad.

BIBLIOGRAFÍA

- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozes, N., Mas, A., Guillamón, JM. 2005. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J Agric Food Chem.* 53:996-1002.
- Chen, H., Fink, GR. 2006, Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Develop.*, 20:1150-1161.
- Rodriguez-Naranjo, MI., Torija, MJ., Mas, A., Cantos-Villar, E., Garcia-Parrilla, MC. 2012, Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *J Pineal Res.* 53:219-224.

Selección y caracterización de bacterias lácticas autóctonas de uvas y vinos del Priorato

Judit Franquès, Bet Palahí, Isabel Araque, Cristina Reguant y Albert Bordons

Grup de Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades N4, 43007 Tarragona, juditfranques@gmail.com

Para conocer la diversidad de bacterias lácticas autóctonas de viñas y vinos de la DOQ (*Denominació d'Origen Qualificada*) Priorat, se tomaron muestras de fincas de dicha DOQ y se obtuvieron unos 1900 aislados de bacterias lácticas. La gran mayoría se confirmó que eran *Oenococcus oeni* mediante PCR específica y se tipificaron mediante VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*), obteniéndose un total de 180 perfiles diferentes. Los otros aislados (bacilos y otros cocos) se analizaron mediante 16S-ARDRA y se confirmaron por secuenciación del fragmento 16S. A partir de todos los aislados se seleccionaron 50 perfiles, en los que se ha estudiado su eficiencia de degradación de L-málico en vino simulado (con 12 y 14% etanol), y que se están caracterizando fenotípicamente y genotípicamente.

INTRODUCCIÓN

La fermentación maloláctica (FML) tiene lugar usualmente después de la fermentación alcohólica, sobre todo en vinos tintos, y contribuye al acabado más suave de los vinos, así como a la estabilidad microbiológica del producto final. La FML es llevada a cabo por bacterias lácticas (BL), sobre todo por cepas de *Oenococcus oeni*.

En los últimos años el cambio de preferencias de los consumidores hacia vinos más ecológicos ha propiciado nuevas oportunidades para las zonas vitivinícolas con *terroirs* peculiares y de tradición. Esto ha planteado estrategias nuevas, tales como el uso de BL autóctonas como inóculo para la FML. Por ello el objetivo de este trabajo ha sido aislar, seleccionar y caracterizar cepas autóctonas de BL de fincas y bodegas de la DOQ Priorat, zona vitivinícola catalana de prestigio y de especial suelo y microclima.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo. Se tomaron asépticamente 26 muestras de uvas garnacha y cariñena y 47 muestras de vinos de las mismas viñas, durante dos vendimias (2012 y 2013) en diferentes fincas de la DOQ Priorat. Se había efectuado un tratamiento minimizado de pesticidas y en las bodegas no se habían utilizado cepas comerciales de BL. Los vinos tenían un grado alcohólico alto (13.5-16%) y un pH de 3.4-3.6.

Aislamiento y condiciones de crecimiento. Las muestras de uvas se procesaron a través de un homogenizador (Stomacher-400 Circulator Seward) a 2500 rpm durante 2.5 min, y se recogió tanto el mosto así obtenido, como la pulpa y las uvas enteras. Estas muestras y las de vinos se sembraron en medio sólido MRSm3, que es MRS (De Man y col., 1960) suplementado con ácido L-málico (3 g/L), fructosa (5 g/L), nistatina (100 mg/L), azida sódica (25 mg/L), L-cisteína (0.5 g/L) y zumo de tomate (100 mL/L), más 20 g/L de agar, a pH 5. Tras 7-15 días de crecimiento en anaerobiosis a 27°C, se tomaron 30 colonias al azar de cada muestra y se sembraron en el mismo medio sin agar.

Estos aislados, una vez confirmados como BL (morfología, Gram +, catalasa -), se guardaron a -20°C con glicerol.

Identificación y tipificación de cepas. Los aislados con características similares a *Oenococcus* se confirmaron como *O. oeni* por PCR específica (Zapparoli y col., 1998). Posteriormente se tipificaron utilizando la técnica de *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) según describen Claisse y col. (2014). Los otros aislados fueron identificados como lactobacilos mediante el método 16S-ARDRA y posterior digestión con *MseI* según describen Rodas y col. (2003). La extracción del DNA se hizo según describen Ruiz-Barba y col. (2005). Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en 1.5% (w/v) en geles de agarosa con tampón TBE 1x (100V, 2h30), y teñidos con bromuro de etidio. Se utilizaron marcadores de 100 bp (Roche Diagnostics). Los diferentes perfiles obtenidos se confirmaron por secuenciación del fragmento 16S.

Degradación de L-málico en vino simulado de los aislados. Se utilizó el *Wine Like Media* (WLM) de acuerdo con Bordas y col. (2013), con 2 g/L L-málico. Las cepas a estudiar se crecieron en medio líquido MRSm3 hasta una A_{600nm} de 1.6. El pellet obtenido se inoculó (2%) en 50 ml de WLM al 12 y 14% de etanol. Estos ensayos se hicieron por duplicado para cada cepa, a 20°C. El consumo de L-málico se siguió enzimáticamente con el equipo Miura One (TDI S.A.), y se calculó la proporción de L-málico consumido y la velocidad fermentativa (mg/L de L-malato consumido por h).

Caracterización fenotípica y genotípica de las mejores cepas. Se están realizando tests de resistencia de las mejores cepas a lo largo del crecimiento en WLM, en 8 condiciones, combinando diferentes pHs (2.8, 3, 3.3, 3.6 y 4) y cantidades de etanol (6, 12, 14 y 16%) durante 3 semanas. Para descartar las posibles cepas productoras de aminos biógenas, con el DNA extraído se ha efectuado la detección de los genes histidina descarboxilasa (*hdc*), tirosina descarboxilasa (*tyrDC*) y ornitina descarboxilasa (*odc*), mediante PCR específicas con los cebadores y metodología descritos en Nannelli y col. (2008). Por último, también se están analizando las diferentes cepas mediante la técnica de polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) para obtener la relación filogenética entre ellas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todas las muestras se obtuvieron 1902 aislados de BL (Tabla 1). La gran mayoría se confirmó, mediante PCR específica, que eran *O. oeni*. En el caso de los bacilos y otros cocos se encontraron especies de BL, habituales en uvas y vinos, como *Lactobacillus mali*, *L. plantarum* (Figura 1), y otros menos habituales como *L. lindneri* y *Fructobacillus trophaeoli*. Algunas muestras de uvas fueron procesadas para su observación al microscopio electrónico de barrido (SEM) y se observaron formas probables de BL (Figura 2).

Tabla 1: Número de aislados de las diferentes especies de BL, de las muestras de uva y vino.

Bacterias lácticas	UVA	VINO	TOTAL
<i>Lactobacillus</i> y <i>Fructobacillus</i>	413	68	481
<i>Oenococcus oeni</i>	109	1312	1421
Total de aislados	522	1380	1902

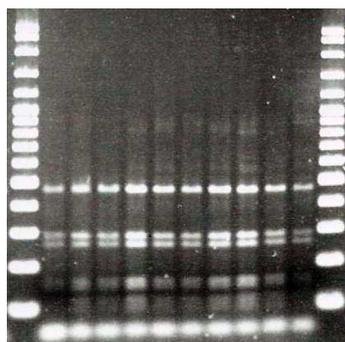


Figura 1: Perfiles de lactobacilos obtenidos por 16S-ARDRA y digestión con *MseI*. Los 10 mostrados coinciden con el perfil de *L. plantarum*. Marcadores de pesos moleculares en los extremos.

Los aislados identificados de *O. oeni* se tipificaron mediante VNTR (*variable number tandem repeat*), obteniéndose un total de 180 perfiles, o sea cepas, diferentes. Los 50 perfiles predominantes, tanto de *O. oeni* como de *Lactobacillus*, se caracterizaron por su eficiencia de degradación de L-málico en vino simulado y por su velocidad fermentativa (Tabla 2).

En base a los resultados de los tests de resistencia a diferentes pH y etanol se están seleccionando las mejores cepas. No se han detectado genes de tres aminas biógenas en ninguna de las cepas estudiadas, lo que contribuye positivamente a su posible utilización como cepas estarter de FML. Por otro lado, los resultados de SNPs sugieren que la mayoría de las cepas estudiadas de *O. oeni* están agrupadas en un mismo clúster filogenético.

Cabe señalar que en este trabajo se ha logrado aislar *O. oeni* directamente de la uva, hecho no

referenciado hasta ahora. Ello ha sido posible gracias a la exhaustiva toma de muestras y, sobre todo, al tratamiento de las mismas, al uso de medios mucho más enriquecidos y a los tiempos de incubación más prolongados.

Tabla 2: Degradación de L-málico (2 g/L) en vino simulado (WLM) de las cepas predominantes (duplicados).

Especie	Proporción de cepas	% L-málico consumido		Velocidad FML (mg/L/h)	
		12 g/L Etanol	14 g/L Etanol	12 g/L Etanol	14 g/L Etanol
<i>O. oeni</i>	64%	100	100	25-40	20-28
	12%	100	80-100	13-17	3-6
	4%	100	<50	18	2
	4%	80-100	80-100	4	4
<i>Fr. trophaeoli</i>	4%	100	66	15	3
<i>L. mali</i>	4%	100	73	15	3
<i>L. lindneri</i>	4%	100	51	15	2
<i>L. plantarum</i>	4%	36	33	4	1

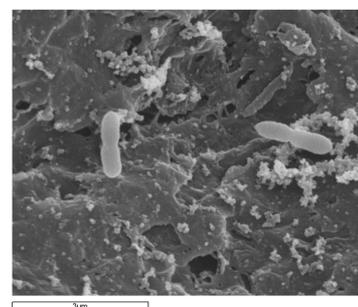


Figura 2: Bacilos, probablemente de BL, en una muestra de piel de uva (SEM, Servei de Recursos Científics i Tècnics, URV).

BIBLIOGRAFÍA

- Bordas, M., Araque, I., Alegret, J.O., El Khoury, M., Lucas, P., Rozès, N., Reguant, C., Bordons, A. 2013. Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *Inter. Microbiol.* 16:113-123.
- Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. 2014. Multiplex variable number of tandem repeats for *Oenococcus oeni* and applications. *Food Microbiol.* 38:80-86.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.
- Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P.M. 2008. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 47:594-599.
- Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I. 2003. 16S-ADRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *System Appl. Microbiol.* 26:412-422.
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado-Barragán, A., Jiménez-Díaz, R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal. Biochem.* 347:333-335.
- Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P., 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.* 27:243-246.

Bioproducción de colorantes a partir de melaza de mandarina. Escalado y métodos de extracción.

María Garrido, Carolina González y Raquel Virto

Área de I+D+i, Microbiología Industrial, Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA). Ctra. NA-134, Km. 53, 31570 San Adrián, Navarra, mgarrido@cnta.es

Los carotenoides son pigmentos industrialmente importantes producidos por muchas bacterias, hongos, levaduras y plantas. La biosíntesis de carotenos en levaduras está asociada a mecanismos de respuesta a condiciones de estrés. En este trabajo se estudiaron varias cepas de levaduras de la especie *Sporobolomyces roseus* (CECT 13019, CS1 y CS2) como posibles productoras de carotenos para valorizar un subproducto de la industria cítrica (melaza de mandarina) que se utilizó como fuente de sustrato. La biosíntesis de carotenos se llevó a cabo inicialmente en biorreactor de laboratorio (3 litros) y una vez establecidas las condiciones óptimas de fermentación se procedió al escalado a biorreactor de planta piloto (60 litros). Para la extracción de los carotenos producidos por las levaduras se utilizaron dos métodos: método convencional de extracción con disolventes, y un método alternativo basado en la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV). Todas las cepas estudiadas fueron capaces de crecer y producir carotenos en las condiciones óptimas en biorreactor de 3 litros, siendo la cepa CS2 la mayor productora (~2.2 µg β-caroteno/mL melaza). Tras el escalado a biorreactor de 60 litros la levadura presentó una capacidad de producción de carotenos similar, llegando a obtenerse 2 µg β-caroteno/mL melaza. Se ha establecido por lo tanto un proceso de fermentación industrial para valorizar subproductos de la industria de cítricos utilizando una cepa salvaje de la especie *Sporobolomyces roseus*.

INTRODUCCIÓN

El color juega un papel especial en los alimentos que consumimos. Habitualmente, el consumidor relaciona un color “no atractivo” con un alimento alterado o poco saludable (Clydesdale y col., 1993). Los colorantes se obtienen habitualmente por extracción química a partir de plantas mediante la utilización de apropiadas mezclas de disolventes así como de correspondientes temperaturas de proceso, lo que hace posible extraer colorantes de carotenos, especialmente β-caroteno, a partir de materiales naturales sólidos, secos o secados. Pero el interés actual está en producirlos por procesos biotecnológicos a partir de plantas, hongos, levaduras y bacterias. En el caso de las levaduras (investigación que nos ocupa) la biosíntesis de carotenos está asociada a mecanismos de respuesta a condiciones de estrés (Marova y col., 2004, 2010). Esta producción es intracelular, por lo que es necesario recuperar la biomasa producida en el medio y proceder a la ruptura de la pared celular para facilitar su extracción y recuperación.

El objetivo principal de esta investigación es valorizar el subproducto de mandarina para convertirlo en sustrato de fermentación de una especie de levadura (*Sporobolomyces roseus*) caracterizada en un estudio previo como hiperproductora de carotenos y evaluar su potencial para la producción de estos compuestos en el subproducto cítrico seleccionado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas. En este estudio se probaron tres cepas diferentes de la especie *Sporobolomyces roseus*: *S. roseus* CECT 13019 (cepa de referencia), y dos cepas salvajes, *S. roseus* CS1 y CS2 aisladas de vinagre. Las cepas fueron conservadas en Potato Dextrosa agar (PDA) a 4°C.

Cultivo de levaduras. Las tres cepas fueron inoculadas en caldo sintético YUCCA (10mL) compuesto por extracto de levadura (2g/L), KH₂PO₄ (10g/L), MgSO₄ (2g/L) y glucosa (10g/L) e incubadas a 23°C durante 24 horas en agitación constante y presencia de oxígeno. Estos preclínicos se utilizaron para la inoculación del subproducto cítrico seleccionado.

La melaza de mandarina (subproducto seleccionado para el estudio) fue obtenida de una empresa de cítricos y su composición fue la siguiente: humedad (94,59g/100g), nitrógeno (0,32g/100g), cenizas (0,17g/100g), hidratos de carbono (4,57g/100g), fructosa (0,10g/100g), glucosa (3,95g/100g) y sacarosa (0,32g/100g), y con un pH de 3,4. Previo a la inoculación, la melaza fue clarificada mediante la eliminación de posos y posteriormente el pH fue ajustado a 6 con NaOH.

Cultivo en biorreactor de laboratorio (3 L). Los experimentos se llevaron a cabo en biorreactor de laboratorio utilizando 2 L de melaza de mandarina pH 6, con el fin de definir los parámetros óptimos de proceso (temperatura, agitación, oxigenación y tiempo de fermentación), así como seleccionar la mayor cepa productora de colorantes en el subproducto.

Las tres cepas fueron inoculadas a una concentración inicial de 10⁵-10⁶ UFC/mL. La fermentación se llevó a cabo durante 10 días en presencia de luz, temperatura 23°C,

agitación 200 rpm y oxigenación constante (flujo másico de 25% v/v).

Cultivo en biorreactor de planta piloto (60 L). La cepa seleccionada en los estudios previos en fermentador de laboratorio fue inoculada a una concentración de 10^5 - 10^6 UFC/mL en 30 L de melaza de mandarina pH 6, y la fermentación se llevó a cabo durante 10 días en condiciones de temperatura 23°C, agitación 680 rpm y oxigenación constante, con el fin de establecer si el escalado industrial de producción de colorantes es posible.

Extracción y análisis de colorantes. La extracción de carotenoides se llevó a cabo mediante una extracción S-L con una mezcla de disolventes éter dietílico/acetato de etilo (1/1, v/v). La suspensión fue agitada en GenoGrinder® durante 5 min a 480 min^{-1} . Este proceso fue realizado por duplicado. Los sobrenadantes se reunieron y se adicionó cloruro de sodio saturado con el objetivo de favorecer la separación de fases que se realizó mediante centrifugación (10 min. a 10.000 rpm).

Se tomó un volumen conocido de la fase superior que fue evaporado en corriente de nitrógeno.

Los carotenoides extraídos se disolvieron en 4 ml de acetona. La disolución fue filtrada a través de $0,45 \mu\text{m}$ y se midió su absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro. La cuantificación se realizó mediante calibración externa con disoluciones de β -caroteno en acetona (0,2-10 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados se expresaron como μg de β -caroteno/ml de muestra.

Como método alternativo a la extracción convencional, se ensayó la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) para mejorar la transferencia de materia en la extracción posterior y eliminar así el uso de DMS. Se trabajó a temperatura ambiente, en un equipo de ocho cámaras de IATA-CSIC, en el que se establecieron los siguientes parámetros operacionales: intensidad de campo eléctrico, 35 kV/cm; anchura de pulso, 2,5 μs ; caudal, 60 mL/min (3,6 L/h); tiempo, 300 μs ; frecuencia, 1.232 Hz; n° pulsos_{total}, 120; n° pulsos_{cámara}, 15; energía: 929,7 J/mL; $\Delta T_{\text{teórico}}$, 27,67 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento y producción de colorantes por levaduras en condiciones óptimas en biorreactor de laboratorio

Las tres cepas de *S. roseus* estudiadas fueron capaces de crecer y producir colorantes en melaza de mandarina pH 6 a las condiciones óptimas estudiadas. La cepa salvaje CS2 obtuvo unos recuentos de crecimiento de casi un ciclo logarítmico más respecto a las otras dos cepas, lo que se corresponde con un consumo más rápido de la glucosa (principal azúcar fermentable) disponible en la melaza, siendo la mayor productora de colorante ($\sim 2.2 \mu\text{g}$ β -caroteno/mL melaza) y en menos tiempo (168 horas).

Crecimiento y producción de colorantes por levaduras en condiciones óptimas en biorreactor de planta piloto

Una vez seleccionada la cepa CS2 como la mayor productora de colorantes, se probó el escalado del proceso a biorreactor de planta piloto y se observó que la levadura era capaz de fermentar el subproducto cítrico y producir colorantes al mismo nivel que en el caso anterior (2 μg β -caroteno/ ml melaza) (Figura 1).

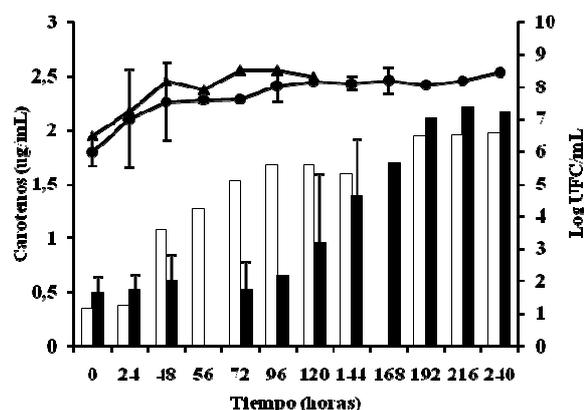


Figura 1: Crecimiento y producción de carotenos de la cepa *S. roseus* CS2 en melaza mandarina pH 6 (▲) (□) Biorreactor 60 L; (●) (■) Biorreactor 3 L.

La concentración de carotenoides obtenida mediante el tratamiento de PEAV como método de ruptura celular ha sido similar a la conseguida mediante el método de extracción convencional. Sin embargo, es necesario confirmar estos primeros resultados con futuros experimentos.

Se ha establecido por lo tanto un proceso de fermentación industrial para valorizar subproductos de la industria de cítricos utilizando una cepa salvaje de la especie *Sporobolomyces roseus*. En estudios futuros se intentará valorizar dicho subproducto de melaza a pH original sin modificar.

BIBLIOGRAFÍA

- Clydesdale, F. M. 1993, Color as a factor in food choice. Critical Reviews Food Sci. Nutr., Vol. 33, No 1, pp. 83-101.
- Marova, I.; Breierova, E.; Koci, R.; Friedl, Z.; Slovak, B; Pokorna J. 2004, Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. Annals Microbiol., 54 (1):73-85.
- Marova, I.; Carnecka, M.; Haličniková, A.; Koci, R., Breierova, E. 2010, Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeast *Rhodotorula glutinis* grown under external stress. Food Tech. Biotech., 48 (1): 56- 61.
- Marova, I.; Carnecka, M.; Haličniková; Dvorakova, T., Hronikova A. 2011, Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. J. Environ. Management. Suppl S3:38-42.

SESIÓN VI: Retos microbiológicos en la industria alimentaria I.

Descontaminación en canales

Elena González Fandos

*Tecnología de los Alimentos, Universidad de La Rioja, España, elena.gonzalez@unirioja.es
Microbiología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España*

INTRODUCCIÓN

La preocupación por la seguridad microbiológica de la carne ha aumentado considerablemente durante los últimos años, especialmente porque con frecuencia la carne y productos derivados se han visto involucrados en brotes de intoxicaciones e infecciones alimentarias. Las bacterias patógenas más frecuentemente asociadas con la carne son: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus* (ICMSF, 1998, Sofos 2008).

Según el último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) en el año 2012 la enfermedad transmitida por alimentos más frecuente en la Unión Europea fue la campylobacteriosis con 214.268 casos humanos confirmados, seguida por la salmonelosis con 91.034 casos. Respecto a las infecciones por *Escherichia coli* verotoxigénico se confirmaron un total de 5.671 casos en 2012. El número de casos de listeriosis en humanos fue de 1.642 (EFSA 2014).

Respecto a la presencia de bacterias patógenas en la carne destacan la elevada presencia de *Campylobacter* en carne de pollo (23,6% muestras positivas) y *Salmonella* que se detectó con mayor frecuencia en carne y productos derivados que en otros alimentos, especialmente en carne fresca de pollo (5,5% de muestras positivas), porcino (0,7% muestras positivas) y vacuno (0,2% muestras positivas). *Escherichia coli* verotoxigénico se detectó ocasionalmente en carne de vacuno (EFSA 2014).

El porcentaje de muestras de carne de pollo con presencia de *Campylobacter* osciló entre 0 y 80,6% según el Estado Miembro. En 2012 en España en el 54,2% de las canales de pollo en mataderos se encontró presencia de *Campylobacter* (EFSA 2014).

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan un importante problema para la salud pública. A pesar de los esfuerzos llevados a cabo: mejora de la higiene, formación del personal manipulador de alimentos, información a los consumidores etc., los problemas relacionados con el consumo de alimentos siguen estando hoy presentes en nuestra sociedad. Esta situación justifica la preocupación por reducir, en la medida de lo posible, el grado de contaminación microbiana en la carne.

Puesto que, incluso con unas prácticas higiénicas adecuadas, es imposible obtener canales exentas de contaminación superficial, se han llevado a cabo en los últimos años distintas investigaciones encaminadas a encontrar algún sistema de descontaminación que, siendo inocuo para el consumidor y sin modificar las características organolépticas y nutritivas de la carne, consiga eliminar (o al menos reducir sustancialmente) los microorganismos patógenos y alterantes presentes en las canales recién obtenidas. No obstante, la descontaminación de canales debe ser considerada como una medida complementaria para reducir la carga microbiana y aplicada únicamente como parte de un programa de control integrado a lo largo de toda la cadena alimentaria.

DESCONTAMINACIÓN DE CANALES

Los procedimientos de descontaminación de canales se pueden dividir en tres tipos: físicos, químicos y biológicos. Entre los métodos de descontaminación físicos podemos destacar: tratamientos basados en la utilización de agua (agua fría, agua caliente, vapor), irradiación y congelación. Entre los tratamientos químicos se pueden destacar los siguientes: ácidos orgánicos, cloro, clorito sódico acidificado, peroxiácidos y fosfato trisódico. Entre los métodos biológicos destacan las bacteriocinas.

A continuación se comentan algunos de los aspectos más relevantes de los tratamientos de descontaminación con especial referencia a los tratamientos químicos.

Tratamientos basados en la utilización de agua

Estos tratamientos incluyen, entre otros, la utilización de agua fría, agua caliente, vapor de agua, y agua a presión. Los factores que deben ser controlados y que pueden influir en la eficacia descontaminante del agua son: temperatura, tiempo de exposición presión y método de aplicación.

El agua elimina la suciedad macroscópica de la superficie de las canales, su eficacia antimicrobiana aumenta al aumentar la temperatura, la aplicación a temperaturas entre 80 y 85°C puede ser una alternativa. En este sentido, Bosilevac y col. (2006) consiguieron reducir la flora mesófila en vacuno en

2,7 unidades logarítmicas aplicando agua caliente a 74°C durante 5,5 s. Además, este tratamiento resultó eficaz frente a *E. coli* O157:H7.

No obstante, este tratamiento plantea algunos inconvenientes como el efecto sobre las características organolépticas de la canal (apariencia y color), además presenta el problema de la posible redistribución de la carga microbiana.

Una alternativa a la utilización de agua caliente es el vapor a 100°C. Un tratamiento con vapor de 20 s a presión atmosférica reduce las poblaciones de *Campylobacter jejuni* y *E. coli*, pero afecta negativamente al aspecto de las canales (James y col., 2007).

Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes son eficaces como procedimiento de descontaminación, consiguiéndose reducciones de 2-3 unidades logarítmicas de bacterias patógenas no esporuladas, como *Salmonella*. La aplicación de dosis de 1,5-2,5 kGy en pollo son eficaces frente a *Campylobacter*, no detectándose dicho patógeno en las canales irradiadas (Farkas 1998). Sin embargo, la irradiación tiene el inconveniente del rechazo por parte del consumidor.

Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos a concentraciones del 1-3% reducen la flora alterante en canales entre 1 y 3 unidades logarítmicas (González-Fandos y Dominguez, 2006, 2007, Smulders y Greer 1998). Según Gill y Landers (2003) los tratamientos de descontaminación se pueden considerar cuando consiguen reducciones de más de 0,5 unidades logarítmicas, por lo que la descontaminación con ácidos orgánicos se puede considerar eficaz.

La eficacia de los ácidos orgánicos depende del tipo y concentración del ácido orgánico, temperatura, tiempo, método de aplicación, tipo de carne, tipo de microorganismo y contaminación inicial. En general, el tratamiento con ácidos orgánicos es más eficaz en canales de vacuno o porcino que en pollo, ya que el pH de la carne de pollo es más elevado (González-Fandos y Herrera 2013a).

La utilización de ácidos orgánicos ha despertado gran interés, ya que en general son sustancias reconocidas como seguras (GRAS). Además a concentraciones entre el 1-3% no afectan al color, olor, textura y apariencia de la carne (González-Fandos y Herrera 2013b; Smulders y Greer 1998)

Existen numerosos estudios sobre la eficacia del ácido láctico, ácido acético y cítrico tanto frente a flora alterante como patógena (González-Fandos y col., 2009, Maya 2012). En relación con el ácido

propiónico, según Mani-Lopez y col. (2012) puede ser un tratamiento de interés sobre todo en canales de aves, ya que este ácido orgánico es más eficaz frente a *Salmonella* que el ácido láctico, cítrico o acético.

En relación con *Campylobacter*, uno de los patógenos que ha suscitado mayor preocupación en los últimos años, un importante factor a considerar es su baja dosis infectiva, bastan 500 células de *Campylobacter jejuni* para causar la enfermedad. Además, aunque esta bacteria no crece a bajas temperaturas, sobrevive durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración (Bell y Kyriakides 2009). En evaluaciones del riesgo realizadas se ha estimado que una reducción de 2 unidades logarítmicas en los recuentos de *Campylobacter* en carne de pollo supondría una reducción de 30 veces en los casos de campylobacteriosis humana (Rosenquist y col., 2003). Por ello, parece oportuno abordar estrategias para reducir la incidencia de *Campylobacter jejuni* en aves como la descontaminación. El tratamiento de pollo con ácido cítrico, ácido acético y propiónico a concentraciones del 2% reduce las poblaciones de *C. jejuni* 2,66; 2,35 y 1,62 unidades logarítmicas, respectivamente (Maya 2012).

Clorito sódico acidificado

El clorito sódico acidificado en solución acuosa a una concentración de 500-1.200 mg/L se ha mostrado eficaz frente a bacterias patógenas y alterantes en canales. El clorito sódico acidificado se considera seguro para el consumidor si se emplea a bajas concentraciones, además no afecta al sabor, textura o calidad de la carne, tan sólo ocasiona una ligera decoloración si se utiliza a altas concentraciones (Kemp y col., 2001, Maya, 2012).

Fosfato Trisódico

El fosfato trisódico se utiliza en soluciones acuosas a concentraciones entre el 8 y el 12%. La FDA (Food and Drug Administration) en 1992 reconoció a este compuesto como GRAS, es decir sustancia reconocida como segura, permitiendo su utilización durante el procesado de canales de aves.

La eficacia antimicrobiana del fosfato trisódico frente a microorganismos patógenos y alterantes ha sido estudiada por diversos autores. Este compuesto es especialmente eficaz frente a bacterias Gram negativas como *Salmonella*. La descontaminación con fosfato trisódico no afecta negativamente a las características sensoriales de la carne (Maya 2012).

LA DESCONTAMINACIÓN DE CANALES EN LA UNIÓN EUROPEA: SITUACIÓN LEGAL.

La situación legal respecto a los tratamientos de descontaminación en canales difiere según los países. En algunos países como Estados Unidos, Canadá o Australia desde hace años se han autorizado distintos procedimientos de descontaminación de canales tanto físicos como químicos. Esta autorización se ha basado en la consideración de que la contaminación de los canales es inevitable incluso con las mejores prácticas higiénicas, por lo que procede un tratamiento higienizante que permita reducir el riesgo para la salud del consumidor.

En la Unión Europea tradicionalmente no se ha permitido el empleo de ningún sistema de descontaminación de los canales distinto al duchado con agua potable.

La evaluación científica de los tratamientos descontaminantes de la carne se inició en la Unión Europea con dos informes del Comité Científico Veterinario sobre medidas relativas a la Salud Pública en los años 1998 y 2003 (SCVPH, 1998, 2003). En dichos informes se puso de manifiesto la utilidad de los tratamientos de descontaminación de la carne, pero considerados como medios adicionales para reducir la carga microbiana y aplicados únicamente como parte de un programa de control integrado a lo largo de toda la cadena alimentaria.

El Reglamento CE 853/2004 abrió la posibilidad de la autorización de compuestos para la descontaminación de canales en mataderos. En dicho Reglamento se indica que “los operadores de la empresa alimentaria no utilizarán para la eliminar la contaminación de la superficie de los productos de origen animal ninguna sustancia distinta del agua potable a menos que dicha sustancia haya sido autorizada. A partir de dicho Reglamento La EFSA ha realizado evaluaciones científicas de distintos tratamientos químicos (fosfato trisódico, clorito sódico acidificado, peroxiácidos, dióxido de cloro, ácido láctico, etc) como descontaminantes de canales. La EFSA ha emitido varios dictámenes científicos sobre la eficacia y la inocuidad de las sustancias para eliminar la contaminación microbiana de la superficie de alimentos de origen animal (EFSA 2005, 2006a, 2006b, 2008, 2011a, 2011b). En muchos casos se ha puesto de manifiesto la escasez de datos en relación con el posible riesgo de su empleo para el consumidor y para el medio ambiente. En este sentido preocupa la posible aparición y diseminación de cepas de microorganismos resistentes a los antibióticos, o la potenciación del crecimiento de los microorganismos patógenos más resistentes. Estas lagunas son una de las principales causas por las que se ha retrasado la

autorización en la Unión Europea los tratamientos de descontaminación de la carne.

En 2006 los Comités de la EFSA BIOHAZ (Panel on Biological Hazards) y AFC (Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food) elaboraron una guía para la evaluación de sustancias destinadas a la descontaminación de superficies de alimentos de origen animal (EFSA 2006c). Este documento fue revisado en 2010 por el Comité BIOHAZ (EFSA 2010). El alcance de este documento es servir de orientación sobre los principales factores y datos que un expediente de evaluación debe contener en relación con la información técnica, evaluación de la seguridad y eficacia de las sustancias que se pretendan aplicar para la descontaminación.

En 2013 el Reglamento UE 101/2013 ha autorizado la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de la superficie de los canales de bovino.

BIBLIOGRAFÍA

- Bell, C., Kyriakides, A. 2009. *Campylobacter*. A practical approach to the organism and its control. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Bosilevac, J. M., Nou, X., Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur, T. M., Koohmaraie, M. 2006. Treatments using hot water instead of lactic acid reduce levels of aerobic bacteria and Enterobacteriaceae and reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on previsceration beef carcasses. *J Food Protection*, 69, 1808–1813.
- EFSA 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the evaluation of the efficacy of peroxyacids for use as an antimicrobial substance applied on poultry carcasses. *EFSA Journal*, 306, 1–10.
- EFSA 2006a. Opinion from the Scientific Panel on Biological Hazards on the evaluation of the efficacy of L(+) Lactic acid for carcass decontamination. *EFSA Journal*, 342, 1–6.
- EFSA 2006b. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the European Commission related to the evaluation of the efficacy of SAN-PEL₂ for use as an antimicrobial substance applied on carcasses of chickens, turkeys, quails, pigs, beef, sheep, goats and game and in washing the shells of eggs. *EFSA Journal*, 352, 1–6.
- EFSA 2006c. Joint AFC/BIOHAZ guidance document on the safety and the efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin. *EFSA Journal*, 388, 1–9.
- EFSA 2008. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. Assessment of the possible effect of four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *EFSA Journal*, 659, 1-26.
- EFSA 2010. Revision of the joint AFC/BIOHAZ guidance document on the submission of data for the evaluation of the safety and efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin intended for human consumption. *EFSA Journal* 8: 1544, 1-32.
- EFSA 2011a. Opinion from the Scientific Panel on Biological Hazards on *Campylobacter* in broiler meat production: control

- options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, 9, 2015: 1–141.
- EFSA 2011b. Scientific Opinion from the Panel on Biological Hazards on the evaluation of the safety and efficacy of Lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. *EFSA Journal*, 9: 2317, 1–35.
- EFSA 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12: 3547, 1-312.
- Farkas, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 189–204.
- Gill, C.O., Landers, C. 2003. Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. *Meat Sci.*, 65, 1005–1011.
- Gonzalez-Fandos, E., Dominguez, J.L. 2006. Efficacy of lactic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *J. Appl Microbiol.*, 101, 1331-1339.
- Gonzalez-Fandos, E., Dominguez, J.L. 2007. Effect of potassium sorbate on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 18, 842-846.
- Gonzalez-Fandos, E., Herrera, B, Maya, N. 2009. Efficacy of citric acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *Int. J. Appl Microbiol.*, 44, 262-268.
- Gonzalez-Fandos, E., Herrera, B. 2013. Efficacy of propionic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. *Food Control* 34, 601-606.
- González-Fandos, E., Herrera, B. 2013. Efficacy of malic acid against *Listeria monocytogenes* attached in poultry skin during refrigerated storage. *Poultry Science* 92, 1936-1941.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1998) Microorganisms in foods. Vol 6. Microbial specifications of food commodities. London: Blackie Academic & Professional.
- James, C., James, S. J., Hannay, N., Purnell, G., Barbedo-Pinto, C., Yaman, H., et al. (2007). Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, 195–203.
- Kermp, G.K., Aldrich, M.L., Guerra, M.L., Schneider, K.R. 2001. Continuous online processing of fecal and ingesta contaminated poultry carcasses using an acidified chlorite antimicrobial intervention. *J. Food Protection*, 64, 807-812
- Mani-López, E., García H.S, López-Malo, A 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research Int.*, 45, 713-721.
- Maya, N. 2012. Efecto del tratamiento de *descontaminación* y envasado en atmósferas modificadas en la seguridad microbiológica de la carne de pollo con especial referencia a *Campylobacter jejuni*. Tesis Doctoral, Universidad de La Rioja.
- Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- Reglamento (UE) 1001/2013 de la Comisión de 4 de febrero de 2013 relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovino.
- Rosenquist H., Nielsen N.L., Sommer H.M, Norrung B., Christensen B.B. 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.*, 83, 87-103.
- SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health) (1998). Report on benefits and limitations of antimicrobials treatments for poultry carcasses. European Commission, Bruselas.
- SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health). 2003. Opinion on the evaluation of antimicrobial treatments for poultry carcasses. European Commission, Bruselas.
- Smulders, F.J.M., Greer, G.G. 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 149-169.
- Sofos, J.N. 2008. Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Sci.*, 78, 3-13



Elena González Fandos es licenciada y Doctora en Veterinaria por la Universidad de León, y actualmente ejerce como Catedrática de Tecnología de Alimentos en la Universidad de La Rioja y responsable del Grupo de Investigación "Tecnología e Higiene Alimentaria". Tiene una amplia experiencia docente centrada en tecnología y seguridad alimentaria.

Su investigación se ha centrado principalmente en las siguientes líneas: evaluación de riesgos de origen microbiológico asociados al consumo de alimentos, influencia de los tratamientos tecnológicos sobre la calidad y seguridad de los alimentos.

Ha organizado y participado en distintos cursos, jornadas y conferencias sobre seguridad alimentaria tanto en el ámbito nacional como internacional. Es revisor de más de 15 revistas internacionales de reconocido prestigio. Ha participado en distintos programas de doctorado y másteres relacionados con alimentos.

Ha publicado más de 50 artículos en revistas internacionales de reconocido prestigio en temas de calidad y seguridad alimentaria. Ha participado en 28 proyectos de investigación, 3 de ellos financiados por la Unión Europea. Ha participado en 7 contratos de investigación con empresas. Ha presentado más de 125 comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales. Ha publicado 6 libros y 16 capítulos de libros. Ha formado parte del Comité Científico de Congresos nacionales e internacionales relacionados con la Microbiología y Seguridad Alimentaria.

Listeria monocytogenes en productos cárnicos

Antonio Español

Servicio de Seguridad Alimentaria, Salud Ambiental y Coordinación de la Dirección General de Salud Pública del Gobierno de Aragón, España. aespanol@aragon.es

La presencia de *Listeria monocytogenes* en los productos cárnicos supone un problema de primera magnitud en las industrias. Este riesgo tiene dos vertientes, la que corresponde al riesgo sanitario como agente zoonótico que puede comprometer la seguridad alimentaria de los productos elaborados, y la que hace referencia al riesgo comercial, por su importancia en la exportación a determinados terceros países. Este segundo aspecto no es desdeñable porque puede bloquear las expectativas de ampliación de mercados que puedan haberse trazado.

En cuanto a la listeriosis humana, simplemente pretendo hacer una reflexión sobre las tasas de incidencia que se obtienen y el hecho de que no se trate de una Enfermedad de Declaración Obligatoria, con las consecuencias que esto comporta a la hora de la investigación de las causas de los potenciales casos.

Para las industrias que exportan o pretenden exportar productos cárnicos a los Estados Unidos, Canadá, Japón o la Unión Aduanera –Rusia, Bielorrusia y Kazajstán- además de otros países del entorno de los citados que requieren exigencias similares, el control de *Listeria monocytogenes* es fundamental para conseguir la preceptiva autorización, y posteriormente para mantenerla. A través del contacto directo con estos establecimientos en Inspecciones, Auditorías, Tomas de muestras, Visitas de delegaciones de terceros países y otras actuaciones encaminadas a que consigan entrar en las listas de empresas autorizadas, hemos podido comprobar que se trata de una de las principales trabas comerciales, si no la primera. Además, el control analítico que se exige, a pesar de ser establecimientos de un excelente nivel higiénico-sanitario, supone un factor generador de incertidumbre, ya que la tolerancia 0 pretendida constituye, en algunos casos, un requerimiento desmedido.

La Unión Europea regula este riesgo en el Reglamento 2073/2005 sobre criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. En esta normativa *L. monocytogenes* se considera un criterio de seguridad alimentaria para los productos cárnicos listos para el consumo y se establece el límite de aceptabilidad en 100 ufc/g, siempre y cuando, el industrial sea capaz de demostrar a satisfacción de la Autoridad Competente que, a lo largo de su vida útil, no se superará ese nivel de

contaminación. También en su Artículo 5 establece la obligatoriedad de realizar muestreo de superficies en las industrias que elaboran listos para el consumo susceptibles de riesgo por *L. monocytogenes*. Las carnes frescas y los preparados de carne que, previamente a su consumo, sufrirán un tratamiento térmico no requieren analizarse.

El criterio de los Estados Unidos frente a *L. monocytogenes* ha sido seguido mayoritariamente por los países enumerados y es Ausencia en 25g en listos para el consumo. Además los EEUU establecen la obligación de acogerse a una de las 4 Alternativas de Control que estipula su legislación dependiendo fundamentalmente de los agentes o procesos antimicrobianos utilizados en su elaboración y de la existencia de exposición post-letal. También marca los muestreos de superficies tanto de contacto directo como no. Para Japón y el resto de países el criterio aplicado es asimismo Ausencia en 25g.

La Unión Aduanera va mucho más allá, exigiendo Ausencia en 25g también para las canales, las carnes frescas y los preparados de carne. Tratándose de productos frescos y estando ante una contaminación ambiental de muy difícil erradicación, resulta muy complicado acercarse a poder ofrecer estas garantías.

Por otra parte, se realizan controles en destino y, ante un positivo en producto, además de decomisarse o devolverse la mercancía sin ninguna posibilidad de defensa, por tratarse de muestras de prospección, se abre una no conformidad cuya resolución es exigente y conlleva muchas verificaciones analíticas tanto de Autocontrol como Oficiales. En este periodo debe actuarse con la máxima diligencia dado que, de alguna manera, las garantías de la autorización quedan en entredicho y hay que recuperar el estatus lo antes posible.

Las muestras positivas en superficies también necesitan actuaciones inmediatas al haberse evidenciado posibles vías de contaminación del producto. Debe restituirse la condición sanitaria de dichas superficies y establecer medidas preventivas que eviten la recurrencia.

Por tanto, nos encontramos con unas exigencias microbiológicas de tolerancia 0 frente a *L. monocytogenes* que, en ocasiones, son muy difíciles de cumplir y que pueden echar por tierra todo el esfuerzo de adaptación tanto estructural como documental que se ha hecho en la industria para poder

exportar a determinados países y que pueden constituir una barrera comercial insalvable.

Es absolutamente imprescindible disponer de un Plan de Control de *L. monocytogenes* adaptado a cada industria, y que capacite al establecimiento para una respuesta rápida. Lógicamente será diferente si se trata de salazones, productos cárnicos crudo-curados, productos cárnicos cocidos, platos cocinados cárnicos, loncheados u otro tipo de productos. A esto se añade que los establecimientos suelen tener distintas líneas de producción, muchas de ellas de carnes frescas y preparados cárnicos y que solo algunas está/n implicada/s en la exportación, pero que dentro de la propia empresa pueden comunicarse y compartir áreas de producción y equipos.

Por relacionar las diferentes herramientas que el Plan puede considerar para reducir al máximo el riesgo de *L. monocytogenes* se pueden citar: el diseño de la planta y de los equipos, los momentos de producción, las exigencias solicitadas para homologar a todos los proveedores, la descripción detallada de los productos- ingredientes cárnicos y no cárnicos, condimentos y especias, aditivos y aromas con sus justificaciones de uso y valoración conjunta, coadyuvantes tecnológicos, cultivos estériles, enzimas, etc.-; el envasado –tipo, materiales, momento y lugar-; lote y su definición; estudios de vida útil, procesos de fabricación –tratamientos subletales, letales y post-letales-; las Buenas Prácticas de Higiene; el Programa Normalizado de Control de la Higiene que debe tener una participación muy importante, el Plan de Limpieza y Desinfección con un Plan específico frente a áreas en las que se ha detectado *L. monocytogenes* y sus sistemas de verificación, el control de la contaminación ambiental, el APPCC y particularmente el Análisis de Peligros referido a *L. monocytogenes* y los PCC's relacionados con su control, los laboratorios considerando métodos de muestreo, métodos analíticos y acreditaciones y todas aquellas medidas que contribuyan a reforzar ese control.

En otro orden de cosas, existen grandes expectativas en cuanto a la negociación que está teniendo lugar en relación con el Acuerdo Transatlántico sobre Comercio e Inversión entre los EEUU y la UE. Una de las partes objeto de negociación es el reconocimiento de nuestra legislación alimentaria. Al menos, sería esperable una flexibilización de las posturas en este marco de cooperación que contribuyese a facilitar el control de *Listeria monocytogenes* hasta un punto en el que la seguridad alimentaria quedase garantizada sin la rigidez de los actuales planteamientos.



Antonio Español Pueyo obtuvo la licenciatura en Veterinaria en la Universidad de Zaragoza, en 1990. Desde junio de 1994, ejerce como Veterinario de la Administración Sanitaria, en la Dirección General de Salud Pública del Gobierno de Aragón, en el Servicio de Seguridad Alimentaria. Ha superado la Oposición General COM/A/1046 a funcionario de la Comisión Europea

en la especialidad de Seguridad Alimentaria. Posee experiencia profesional amplia en los siguientes campos: inspección Sanitaria de Industrias Alimentarias (mataderos, cárnicas, lácteas, frutas y verduras, catering y comedores colectivos), implantación del Autocontrol (APPCC), análisis microbiológico de alimentos y aguas.

Ha colaborado con el Instituto Aragonés de Administración Pública, como profesor, y con el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, como Profesor Asociado. Ha realizado diversos trabajos académicos e impartido cursos de formación en relación al control de *Salmonella* y *Listeria* en la industria cárnica.

Toxoplasma gondii en la industria cárnica

Susana Bayarri Fernández

Nutrición y Bromatología, Universidad de Zaragoza, España, sbayarri@unizar.es

Toxoplasma gondii, protozoo causante de la toxoplasmosis, es un parásito intracelular obligado capaz de infectar a una amplia variedad de hospedadores. Es de distribución universal y, probablemente, el agente más frecuente de infección protozoaria en el hombre.

De entre los principales patógenos reseñados como los agentes principales de enfermedades de transmisión alimentaria, *Toxoplasma* se sitúa en segundo lugar, superado únicamente por *Salmonella* en cuanto al número de muertes anuales que provoca (Scallan y col., 2011).

Los parásitos causan menos brotes que las bacterias y los virus. Sin embargo, en muchas ocasiones, su impacto en grupos poblacionales de riesgo es considerable, ya que provocan enfermedad grave, discapacidad e incluso la muerte. Esto va unido al elevado coste que suponen las técnicas diagnósticas, la hospitalización y el tratamiento (EFSA, 2007). Este patrón es aplicable a *Toxoplasma gondii*. La toxoplasmosis, por lo general, cursa de forma leve o asintomática, pero en personas inmunocomprometidas es una enfermedad severa. En mujeres embarazadas existe el riesgo de transmisión al feto con graves consecuencias, desde abortos espontáneos, nacimientos prematuros y/o enfermedades severas en el niño como hidrocefalia, retinocoroiditis, calcificaciones intracerebrales y daños encefálicos, que reducen significativamente su calidad de vida.

El ciclo de este parásito consta de una fase de reproducción sexual que tiene lugar en el gato y otros felinos, que son los hospedadores definitivos, y otra de reproducción asexual en los huéspedes intermediarios, como el hombre y otros mamíferos, o cualquier otro animal de sangre caliente como las aves. El huésped intermediario se infecta por la ingestión de oocistos esporulados, o por la ingestión de carne que contiene quistes con bradizoítos. Una vez en el organismo, los taquizoítos, que es la forma activa de replicación del parásito, se distribuyen por el sistema circulatorio y linfático, dirigiéndose principalmente al tejido muscular y nervioso donde el parásito se multiplica de forma lenta (bradizoíto), produciéndose la formación de quistes como mecanismo de defensa del hospedador ante el parásito. En los animales de abasto los quistes pueden persistir durante toda la vida del animal, constituyendo el consumo de carne cruda o poco

cocinada infectada uno de los principales riesgos asociados con la toxoplasmosis humana.

En general, en los animales productores de carne, los quistes de *Toxoplasma* se detectan más frecuentemente en cerdos, ovejas y cabras, y menos frecuentemente en ganado vacuno, pollos, conejos y caballos. Dado su carácter omnívoro, los cerdos tienen grandes posibilidades de adquirir la infección por *T. gondii*. Además, los quistes pueden persistir durante más de dos años, siendo el consumo de carne de esta especie una de las fuentes más importantes de infección en el hombre.

Se han llevado a cabo numerosos estudios serológicos para determinar la prevalencia de *T. gondii* en animales de abasto, y los resultados muestran una gran variabilidad entre países, y entre regiones de un mismo país. Las tasas de infección están directamente relacionadas con las prácticas de producción, pudiéndose reducir significativamente el riesgo en los animales de abasto mediante el uso de adecuadas medidas de higiene. Con respecto al porcino, el riesgo de detectar anticuerpos frente a *Toxoplasma* en granjas de producción extensiva es estadísticamente mayor que en granjas de producción intensiva. Éste es un dato importante en el proceso de evaluación del riesgo, teniendo en cuenta las tendencias actuales en el consumo de carne de animales de granjas orgánicas, que producen sus cerdos en extensivo, lo que podría provocar una reemergencia de las tasas de infección.

La toxoplasmosis no es una enfermedad de declaración obligatoria, y, aunque se transmite a través del consumo de carne, en la actual legislación de la Unión Europea no existen criterios para su detección en matadero. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria considera *T. gondii* como uno de los riesgos biológicos más relevantes en el contexto de la inspección de la carne de cerdo, y recomienda que se establezcan normas que incluyan indicadores de bienestar animal y de las principales enfermedades endémicas porcinas, para que se evalúe de manera continua la calidad de la salud y el bienestar de los animales durante la inspección (EFSA, 2011).

Las medidas de prevención y control deben comenzar en la granja, con la aplicación de Buenas Prácticas de Higiene (BPHs) (Reglamento CE nº 852/2004), y continuar en la industria cárnica, con la aplicación de tratamientos tecnológicos que afecten a la viabilidad del parásito, reduciendo el riesgo. En este sentido, se han realizado estudios que han demostrado que los

quistes tisulares presentes en la carne son susceptibles a diferentes tratamientos físicos como el tratamiento térmico con calor, la congelación, la irradiación o las altas presiones.

Jacobs y col. (1960) fueron los primeros en demostrar que el calor podía inactivar los quistes de *Toxoplasma*. A 50°C es necesaria una hora para inactivarlos, mientras que se produce una destrucción inmediata cuando la temperatura interna de la carne alcanza los 67°C. Sin embargo, el cocinado con microondas de carne infectada no garantiza la destrucción del parásito debido, probablemente, al reparto no uniforme del calor (Lake y col., 2002).

El efecto de la congelación en la viabilidad de los quistes de *Toxoplasma* fue descrito por primera vez en 1965 (Sommer y col., 1965). En general, la congelación puede inactivar los quistes tisulares de *T. gondii*, pero es necesaria una combinación adecuada de temperatura y tiempo para conseguir una eficacia del 100%.

La irradiación gamma puede ser efectiva frente a *T. gondii*, a dosis de entre 0,4 y 0,7 kGy hasta 1,0 kGy. Sin embargo, la utilización de este tratamiento para la conservación de la carne está prohibida en Europa (Aymerich y col., 2008). Asimismo, se ha demostrado que los tratamientos con altas presiones a 300 MPa pueden ser efectivos en la destrucción del parásito (Lindsay y col., 2004).

Se han realizado diversos estudios sobre el efecto que ejercen técnicas de curado como la adición de sal, el ahumado o la fermentación, sobre la viabilidad de los quistes. Algunos estudios advierten que el proceso de curado podría ser insuficiente para destruir el parásito, y estudios epidemiológicos apuntan al consumo de productos cárnicos curados como un factor de riesgo de adquirir toxoplasmosis durante el embarazo. Además, aunque los nitritos previenen el crecimiento de microorganismos patógenos, su efecto sobre la viabilidad de los quistes de *T. gondii* todavía es desconocido.

España es un país con una larga tradición en la elaboración y consumo de productos cárnicos curados. Lo diverso de nuestra producción chacinera, que se extiende a todos los rincones de nuestro país, forma parte de nuestro acervo cultural y gastronómico, y es apreciada dentro y fuera de nuestras fronteras. De los elaborados con carne de cerdo, el jamón curado es, sin lugar a duda, uno de los productos más emblemáticos de la gastronomía española, siendo nuestro país el primer productor mundial de jamones y paletas curados. Cualquier tipo de riesgo sanitario, genera una respuesta inmediata y contundente por parte del consumidor, que trae como consecuencia el abandono del consumo de un producto determinado. Por ello, la demanda de los consumidores de alimentos libres de

patógenos lleva a las empresas del sector cárnico a la necesidad de conocer datos científicos sobre el efecto de los tratamientos tecnológicos que aplican para poder garantizar la seguridad alimentaria.

Nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio pionero en aportar datos sobre la influencia del proceso tecnológico de elaboración de jamón curado en la viabilidad de *T. gondii*, utilizando la técnica de bioensayo en ratón para evaluar el riesgo de una infección derivada del consumo de este producto cárnico. Este método es el de referencia para el aislamiento de *Toxoplasma* en alimentos. El estudio determinó que el tiempo de curado era fundamental para destruir el parásito, no detectándose quistes viables en el producto final (14 meses), mientras que a mitad del proceso de curación (7 meses) se aislaron formas infectantes del parásito (Bayarri y col., 2010). Este estudio se completó con el análisis de la prevalencia de *T. gondii* en muestras de carne de cerdo y jamones curados de diferentes modalidades disponibles en el comercio (paleta y jamón de cerdo blanco o ibérico, producto en lonchas, piezas enteras, etc). El parásito fue detectado en el 8% de las muestras de carne fresca, no detectándose en las muestras de jamón curado (Bayarri y col., 2012).

Estos resultados aportan datos que hasta el momento eran desconocidos por la falta de estudios al respecto. Sin embargo, es necesario estudiar otros productos con tiempos y condiciones de curado diferentes para poder conseguir realizar una evaluación del riesgo completa. La reducción del tiempo de curado en jamón conlleva una disminución considerable de los costes de producción y por tanto puede ser una herramienta de mejora de competitividad de la empresa. Sin embargo, es un imperativo de mercado garantizar la seguridad alimentaria de los productos comercializados.

Actualmente estamos llevando a cabo un proyecto INNFACTO IPT-2012-0189-060000 titulado "Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*". Con respecto a *T. gondii*, la finalidad de este proyecto es evaluar la eficacia del procesado del jamón curado en la inactivación del parásito, y contribuir a establecer las medidas preventivas y de control adecuadas en las distintas etapas del proceso de producción (en producción primaria, en matadero y en el secadero), que pueden ser utilizadas por la empresa cárnica para poder ofrecer al consumidor un producto seguro y de calidad.

Con los datos obtenidos pretendemos establecer la gestión del riesgo en la etapa más apropiada de la cadena de producción que permita a la empresa certificar un producto inocuo con vistas al comercio

nacional e internacional, siendo que los requisitos para la exportación son cada vez más exigentes en materia de seguridad alimentaria. Además, los resultados obtenidos supondrán una importante contribución a la mejora de la salud en general y en particular a los grupos poblacionales de riesgo, que tienen actualmente vetado el consumo de este tipo de alimentos.

Miembros del equipo de investigación: M^a Jesús Gracia, Laura Herrero, Consuelo Pérez-Arquillué, Marta Herrera, Regina Lázaro, Sara Remón, Carmen Rota, Miriam Labrador y Antonio Herrera.

Agradecimientos. Ministerio de Economía y Competitividad (INNPACTO IPT-2012-0189-060000), Grupo de Investigación Consolidado A01 del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M. 2008. Meat Sci. 78: 114–129.
- Bayarri, S., Gracia, M.J., Lazaro, R., Perez-Arquillue, C., Barberan, M., Herrera, A. 2010. J. Food Prot. 73(12): 2239–2243.
- Bayarri, S., Gracia, M.J., Perez-Arquillue, C., Lazaro, R., Herrera, A. 2012. J. Food Prot. 75 (3): 597-600.
- EFSA, 2007. EFSA Journal, 583: 1-64.
- EFSA, 2011. EFSA Journal 2011;9(10): 2371.
- Jacobs, L., Remington, J.S., Melton, M.L. 1960. J. Parasitol. 46: 11–21.
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P. 2002. Risk profile: *Toxoplasma gondii* in red meat and meat products. Institute of Environmental Science and Research Limited. Report prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services (pp. 1-43).
- Lindsay, D.S., Collins, M.V., Mitchell, S.M., Wetch, C.N., Rosypal, A.C., Flick, G.J., Zajac, A.M., Lindquist, A., Dubey, J.P. 2004. J. Parasitol. 90: 1054-1057.
- Reglamento (CE) n° 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios (DOUE L 139 de 30.4.2004).
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. 2011. Emerging Infections Diseases 17(1): 7-15.
- Sommer, R., Rommel, M., Levetzov, R., 1965. Fleischwirtsch 45: 454–45.



Susana Bayarri Fernández es doctora en Veterinaria por la Universidad de Zaragoza, distinguida con el Premio Extraordinario de Doctorado (1997). Profesora Titular de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza desde el año 2000, impartiendo

docencia en Grado, Posgrado y Doctorado. Ha sido coordinadora de distintas ediciones del curso "Seguridad alimentaria: el papel de la legislación desde la granja hasta la mesa" dentro de los Cursos de Verano de la Universidad de Zaragoza, así como de cursos dirigidos a empresas agroalimentarias. Además, ha participado en proyectos de innovación docente, siendo responsable de diversos proyectos relacionados con la legislación alimentaria. Coordinadora Erasmus con las Universidades italianas de Bolonia, Perugia, Catania y Sassari.

Desde su constitución en el año 2002, es miembro del Grupo de Investigación Consolidado del Gobierno de Aragón "Análisis y Evaluación de la seguridad alimentaria". A lo largo de estos años, ha publicado más de 30 artículos en revistas internacionales de alto impacto, y es coautora de 60 contribuciones a Congresos nacionales e internacionales. Ha participado en 28 proyectos de investigación, siendo investigadora principal de 9 proyectos. Su experiencia investigadora se completa con la realización de estancias en el Istituto Superiore della Sanità de Roma. Ha dirigido 3 tesis doctorales, y una en fase de realización. Actualmente está coordinando el proyecto INNPACTO titulado "Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*".

Vida útil de lacón cocido loncheado envasado en atmósfera modificada

Marta Mourelle, Ana Sanjurjo, J. Antonio Salazar, Ana Barreiro y Montserrat Cabaneiro

Micral Análisis Alimentarios S.L., Lugo, España micral@micral.net

El presente estudio tiene como objetivo mostrar la estabilidad sanitaria y comercial, mediante estudio de durabilidad, de un producto cárnico cocido (lacón) y posteriormente loncheado, para su comercialización en envase unitario de 120g en barqueta con atmósfera protectora. Se tratará de estudiar el efecto del *choque de frío* en la velocidad de crecimiento de las bacterias posibles alterantes.

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios muestran la importancia de la temperatura en la velocidad de crecimiento microbiano y, particularmente, la influencia de los cambios de temperatura en la fase *lag* microbiana (fase de latencia) (Dens y col., 2005).

En el presente estudio, someteremos envases de lacón cocido y loncheado a diferentes condiciones de temperatura ($0^{\circ}\text{C} / \leq -18^{\circ}\text{C}$), aplicada inmediatamente después del loncheado. Comprobaremos el efecto de esas condiciones y del tiempo (10 días) en la vida útil del producto, mantenido a temperaturas dentro del rango de refrigeración (simulación de condiciones de transporte y exposición durante la venta). La duración de la fase *lag* será condicionante de la vida útil del producto. Cualquier parámetro que afecte a la velocidad de crecimiento, así como lesiones en las bacterias como consecuencia del posible daño subletal, repercutirán en la prolongación de dicha fase *lag*.

Se seleccionan los parámetros microbiológicos indicadores de la estabilidad sanitaria y comercial (organoléptica), realizando su seguimiento en condiciones de temperatura regulada y a tiempo real estimado de vida útil (40 días).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se toma una muestra representativa, compuesta de 80 unidades de una partida de fabricación estándar, tomadas inmediatamente después del proceso de envasado. La muestra se divide en 3 lotes, sometiéndolos a diferentes rangos de *choque frío*:

Lote 1: compuesta de 32 bandejas que se introducen en cámara de refrigeración mantenida en límite de $T^a \leq 7^{\circ}\text{C}/40$ días.

Lote 2: compuesta de 24 bandejas que se introducen en cámara de refrigeración en límite de $T^a \leq 0^{\circ}\text{C}/10$ días + $T^a \leq 7^{\circ}\text{C}/30$ días.

Lote 3: compuesta de 24 bandejas que se introducen en cámara de congelación en límite de $T^a \leq -18^{\circ}\text{C}/10$ días + $T^a \leq 7^{\circ}\text{C}/30$ días.

Los días de estudio se muestran en tabla 1.

Análisis microbiológicos: Se procede a la determinación de los siguientes parámetros microbiológicos, relacionados con la estabilidad sanitaria y comercial (organoléptica) del producto elaborado:

Gérmenes aerobios mesófilos (TVC)

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Enterobacteriaceas totales (ENT)

Mohos y levaduras (YM)

Listeria monocytogenes (LMO)

Técnicas analíticas:

TVC Tempo TVC de Biomerieux validado según ISO 4833

BAL Tempo BAL de Biomerieux

ENT Tempo EB de Biomerieux validado según ISO 21528-2

YM Tempo YM de Biomerieux validado por AEOC

LMO ELFA VIDAS Biomerieux validado según ISO 11290-1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto de la temperatura en la fase *lag* de los gérmenes posibles alterantes, compararemos los recuentos encontrados de TVC y BAL en las diferentes condiciones de procesado en los diferentes días de estudio, según se indica en tabla 1.

Tabla 1: Días de estudio

DÍA ESTUDIO	$\leq 7^{\circ}\text{C}/40$ días	$0^{\circ}\text{C}/10$ días $+\leq 7^{\circ}\text{C}/30$ días	$\leq -18^{\circ}\text{C}/10$ días $+\leq 7^{\circ}\text{C}/30$ días
0	0		
5	5		
10	10	10	10
14	14	14	14
20	20	20	20
25	25	25	25
30	30	30	30

El control de temperatura se realiza con termómetro Datalogger Testo 174.

A continuación se muestran los resultados encontrados.

Figura 1: Niveles microbiológicos TVC y BAL encontrados, entre día 0 y día 10, en unidades mantenidas a $T^a \leq 7^{\circ}\text{C}$ (valores media logarítmica)

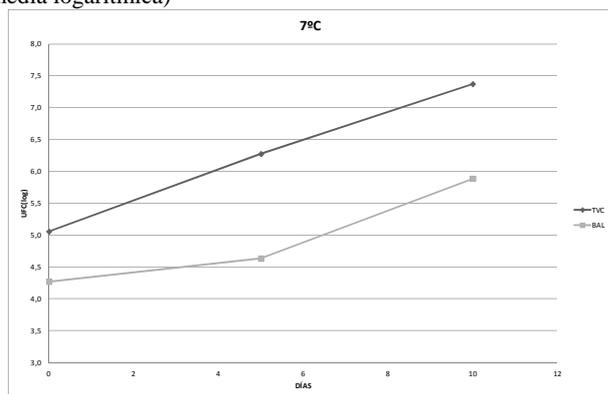


Figura 2: Resultados log₁₀ UFC TVC/g. Comparativa entre lotes (valores media logarítmica)

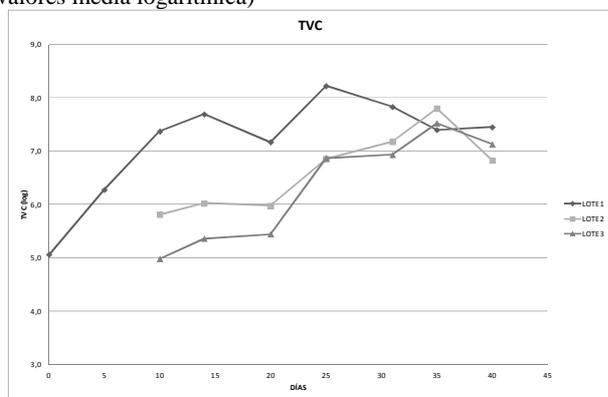
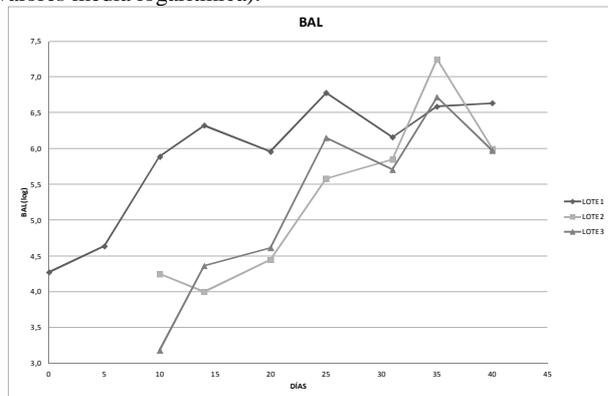


Figura 3: Resultados log₁₀ UFC BAL/g. Comparativa entre lotes (valores media logarítmica).



En ninguna de las unidades analizadas se detecta presencia de *Listeria monocytogenes*. En ninguna de las unidades analizadas se detectan recuentos significativos de ENT y YM.

Los resultados encontrados muestran presencia de contaminación inicial, a partir de TVC y BAL.

A día 10 de estudio, los niveles de TVC se mantienen estables a $T^a \leq -18^{\circ}\text{C}$ (respecto a día 0), experimentando un ligero incremento de $<1 \log_{10}$ en las muestras mantenidas a 0°C y de $>2 \log_{10}$ en las muestras mantenidas a $\leq 7^{\circ}\text{C}$.

Los niveles de BAL a día 10 presentan un incremento de $1 - 2 \log_{10}$ en muestras mantenidas a $T^a \leq 7^{\circ}\text{C}$; se mantienen estables en las muestras mantenidas a 0°C y presentan un ligero descenso en las muestras mantenidas a $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

Hasta el día 31, se observa una diferencia significativa entre las muestras que previamente fueron almacenadas a 0°C o $\leq -18^{\circ}\text{C}$ durante los 10 primeros días de vida útil y las muestras que no fueron sometidas a *choque de frío*. Se sospecha así un alargamiento de la fase *lag*, hasta el inicio de la fase de crecimiento exponencial, en especial de las BAL.

A partir del día 35 de vida útil, las diferencias en crecimiento exponencial son menos significativas.

A la vista de los resultados encontrados, se puede sospechar que, en el caso de productos cocidos que requieren enfriamiento tras el proceso de horneado, y donde se corta la cadena de frío durante la fase de loncheado y envasado, es importante asegurar refrigeración inmediata, siendo recomendable *choque frío* a temperaturas $\leq 0^{\circ}\text{C}$.

Es posible que la mayor parte de las bacterias alterantes que proliferan durante la vida útil, se encuentren ya en fase estacionaria cuando se enfriaron, como consecuencia de un enfriamiento lento y prolongado de las piezas. El mantenimiento de temperatura $\leq 0^{\circ}\text{C}$ en la fábrica, antes de la expedición del producto, puede retrasar el inicio de la proliferación microbiana de posibles gérmenes alterantes (en especial el grupo de BAL), de manera que se pueda prolongar la vida útil del producto durante la comercialización.

BIBLIOGRAFÍA

- Mossel, D.A.A., Moreno, B. y Struijk, C.B. 2002. Microbiología de los alimentos D Ed. Acribia
- Man, Dominique 2002. Caducidad de los Alimentos 29-33 Ed. Acribia
- Jay, J.A.1992. Microbiología moderna de los alimentos Ed. Acribia
- NF V08-401 Microbiologie des aliments. Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés.
- NF V01-003 Lignes directrices pour la réalisation de tests de vieillissement microbiologique
- EN SANCO /1628/ 2008 ver. 9.3 (26112008) Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs
- Dens, E.J., Bernaerts, K., Standaert, A.R., Kreft, J.U., Van Impe, J.F. 2005, Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag: Part II. Modeling lag phenomena induced by temperature shifts. Int. J. Food Microbiol., 101: 319-332.

Calidad microbiológica de la leche pasteurizada suministrada en máquinas expendedoras. Comunidad Autónoma del País Vasco. 2010-2013

Dolores Coll Jordá¹, Carmen Oria Easo¹, Belen Moreno Montoya¹, Inmaculada García Robles¹, Begoña de Pablo Busto¹, M^a Victoria Bravo Vázquez¹, Janire Elorduy Goyeneche¹ y Jon Uribarri Atutxa²

¹ Dirección de Salud Pública y Adicciones. Departamento de. Salud. Gobierno Vasco, dcoll@ej-gv.es

² Área de Salud Ayuntamiento de Bilbao

La venta de leche en máquinas expendedoras es una práctica comercial, que se ha desarrollado en los últimos años; en este trabajo se presentan los resultados del control e investigación analítica en máquinas expendedoras de leche pasteurizada en la Comunidad Autónoma del País Vasco entre 2010 y 2013, además de su evolución en el mercado. Los parámetros analizados han sido Enterobacterias a 37°C y *Listeria monocytogenes*.

Los parámetros microbiológicos han mejorado entre los años estudiados, pasando de un 36,5% de muestras correctas en 2010 (n=31) a un 96,9% en 2013 (n=32). Todos los incumplimientos corresponden a Enterobacterias a 37°C.

En cuanto al número de expendedoras de forma global han aumentado en el periodo estudiado (de 11 a 19), pero con una desigual distribución territorial; han aumentado en Gipuzkoa, mantenido en Álava y disminuido en Bizkaia".

INTRODUCCIÓN

La venta de leche pasteurizada en máquinas expendedoras se inició en el año 2010 en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Paralelamente ese mismo año se puso en marcha un seguimiento y control de las mismas, que incluye las condiciones de los establecimientos suministradores y de las máquinas expendedoras y la verificación analítica de la calidad microbiológica de la leche suministrada.

Objetivo: Describir la evaluación y evolución de los resultados analíticos de la leche pasteurizada suministrada por máquinas expendedoras en la CAPV entre los años 2010 y 2013. Describir la evolución del número de máquinas expendedoras y su distribución territorial

MATERIAL Y MÉTODOS

En todas las máquinas expendedoras de la CAPV fueron tomadas muestras, para la investigación analítica de recuento de Enterobacterias a 37°C, ISO 21528-2:2004, y *Listeria monocytogenes*, detección por ELFA, confirmación por cultivo y mediante detección por PCR a tiempo real y confirmación por cultivo. Se consideraron resultados correctos cuando el recuento de Enterobacterias a 37°C era inferior a <10 ufc/ml y ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 ml (Reglamento 2073/2005) Todas las muestras fueron analizadas en los laboratorios de Salud Pública del Gobierno Vasco y en el del área de Salud del Ayuntamiento de Bilbao en los que las técnicas utilizadas se encuentran acreditadas por ENAC bajo ISO 17025. Las muestras fueron tomadas en envases estériles, y

transportadas al laboratorio en recipientes isoterms con acumuladores de frío.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el periodo estudiado fueron analizadas un total de 146 muestras, de las cuales 72 fueron calificadas como incorrectas. En 2010 de un total de 31 muestras, 21 fueron incorrectas; en 2011 de 37, 22 fueron incorrectas; en 2012 de 46, 18 fueron incorrectas y en 2013 de 32 muestras únicamente 1 fue incorrecta.

En ninguna de las muestras fue detectada la presencia de *Listeria monocytogenes*. Todos los incumplimientos correspondieron a recuentos altos de Enterobacterias a 37°C. La evolución de los recuentos elevados por año se presenta en el grafico 1.

Aplicando Chi² a los porcentajes de muestras incorrectas obtenidas en los sucesivos años se obtiene una $p < 0,001$ por lo que se concluye que el porcentaje de muestras correctas aumenta cada año, y además los recuentos de Enterobacterias a 37°C, de las incorrectas son cada vez más bajos.

El número de máquinas expendedoras ha aumentado, pasando de 29 en 2010 a 32 en 2013. La distribución territorial de las máquinas expendedoras es desigual, existiendo un número más elevado en Gipuzkoa que ha ido aumentando desde 11 en 2010 hasta un total de 19 en 2013; en Álava ha pasado de 4 en 2010 a 7 en 2013, mientras que en Bizkaia ha disminuido de 14 en 2010 a 6 en 2013

Tabla 1: Recuento de Enterobacterias a 37°C en ufc/ml, por año y número de muestras.

AÑO	RECuento					Total	% Correctas
	≤10	>10 ^{-10²}	>10 ² -10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴		
2010	10	6	8	6	1	31	32,3
2011	15	14	8	0	0	37	40,5
2012	28	11	7	0	0	46	60,9
2013	31	1	0	0	0	32	96,9
Total	84	32	23	6	1	146	57,5

Los suministradores eran 9 en 2010, pasando a 13 en el 2013

De forma general la calidad microbiológica de la leche suministrada por máquinas expendedoras ha mejorado a lo largo del periodo estudiado, ya que aunque se mantiene en 2011 y 2012 un número elevado de resultados incorrectos, los recuentos son cada vez más bajos. En 2013 los resultados fueron muy buenos.

El patógeno investigado, *Listeria monocytogenes*, no ha sido detectado en ninguna de las muestras investigadas.

La distribución y evolución del número de máquinas expendedoras presenta una marcada diferencia territorial.

consumidores de la comarca de Pamplona. Aplicación al caso de la "leche de máquina expendedora". oai:academica-e.unavarra.es:2454/2126

Marcos, C. 2009. Canales de venta directa: vender leche en máquinas expendedoras, un hecho. *Agricultura: Revista agropecuaria*, (917), 270.

BIBLIOGRAFÍA

- Amante García, B., Gonçalves Ageitos, M., López Grimau, V., Durany, A., Peña, R. 2011. Nuevo modelo de distribución de leche. Congreso Internacional de Ingeniería de Proyectos. "ACTAS-XV Congreso Internacional de Ingeniería de Proyectos". Huesca: 2011.
- Bianchi, D. M., Barbaro, A., Gallina, S., Vitale, N., Chiavacci, L., Caramelli, M., & Decastelli, L. 2013. Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont, Italy. *Food Control*, 32(2), 435-439.
- D. O. de la Unión 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. DO L, 338, 1-26.
- Giacometti, F., Serraino, A., Finazzi, G., Daminelli, P., Losio, M. N., Tamba, M., Garigliani, A., Mattioli, R., Riu R., Zanoni, R. G. 2012. Field handling conditions of raw milk sold in vending machines: experimental evaluation of the behaviour of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni*. *Ital J Anim Sci*, 11(1).
- Giacometti, F., Serraino, A., Finazzi, G., Daminelli, P., Losio, M. N., Arrigoni, N., Piva, S., Florio, D., Riu, R., Zanoni, R. G. 2012. Sale of raw milk in Northern Italy: Food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis*, 9(4), 293-297.
- Labaca Aguirrebarrena, A. 2010. Estudio sobre la percepción de los diferentes atributos de la leche de vaca por parte de los

Evaluación de *Debaryomyces hansenii* como cultivo protector para reducir la presencia de ocratoxina A en productos cárnicos madurados

Belén Peromingo, Josué Delgado, Lourdes Sánchez-Montero, Elena Bermúdez, Mar Rodríguez y M^a Jesús Andrade

Higiene y Seguridad Alimentaria, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avenida de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, España.

belenperomingo@gmail.com

Durante el proceso de maduración de los productos cárnicos madurados, las condiciones ecológicas favorecen el desarrollo de una población fúngica en su superficie, entre la que se encuentran mohos capaces de producir micotoxinas como la ocratoxina A (OTA). Una de las posibles estrategias para controlar su presencia consiste en utilizar cultivos protectores, como las levaduras. *Debaryomyces hansenii* es la especie que con más frecuencia se aísla en estos productos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro cepas de *D. hansenii* aisladas de productos cárnicos madurados sobre el crecimiento y la producción de OTA de una cepa de *Penicillium verrucosum* aislada de jamón curado. Cada una de las levaduras se cultivó conjuntamente con el moho, del cual se determinó su crecimiento mediante peso seco del micelio así como la producción de OTA mediante UHPLC-MS/MS. Las cuatro cepas de *D. hansenii* evaluadas mostraron una inhibición del crecimiento de *P. verrucosum* que osciló entre el 64 y el 96%, no detectándose la presencia de OTA en tres de los co-cultivos. En el ensayo realizado en salchichón no se observó una inhibición significativa del crecimiento de *P. verrucosum*, pero se detectó un menor contenido de OTA encontrándose la reducción entre un 78 y un 93%. La cepa *D. hansenii* 226G fue la que proporcionó los mejores resultados tanto sobre el crecimiento del moho como sobre la presencia de la micotoxina en salchichón. En conclusión, esta cepa podría ser propuesta como cultivo protector para el control del peligro asociado a la presencia de OTA durante el procesado de los productos cárnicos madurados.

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de maduración de los productos cárnicos madurados tiene lugar la proliferación de una población fúngica en su superficie entre la que pueden encontrarse mohos capaces de producir micotoxinas, siendo la de mayor relevancia la ocratoxina A (OTA). Entre las estrategias capaces de controlar la presencia de mohos ocratoxigénicos en estos productos se encuentran las de biocontrol. Así, *Debaryomyces hansenii*, la especie de levadura más comúnmente encontrada en estos productos, ha mostrado capacidad antifúngica frente a mohos toxigénicos en jamón curado (Andrade y col., 2014; Simoncini y col., 2014). Sin embargo, esta capacidad no ha sido estudiada en otros tipos de productos cárnicos madurados. Por ello, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el efecto que originaban cuatro cepas de *D. hansenii* sobre el crecimiento y la producción de OTA por una cepa de *Penicillium verrucosum*, aisladas todas ellas de productos cárnicos madurados, con el fin de que puedan ser utilizadas como cultivos protectores en embutidos madurados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizaron 4 cepas de *D. hansenii* (125G, 253H, 226G y 29P) y una cepa ocratoxigénica de *P. verrucosum* (Pv45), procedentes de la colección de cultivos del Grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura.

Preparación del inóculo. Las levaduras se cultivaron en caldo YES (20 g/l de extracto de levadura, 125 g/l de sacarosa) a 25°C durante 72 h en agitación. Las esporas de *P. verrucosum* se obtuvieron tras su cultivo en agar extracto de malta (20 g/l extracto de malta, 20 g/l glucosa, 1 g/l peptona, 10 g/l agar bacteriológico) a 25°C durante 15 días. Tras la incubación, se prepararon las suspensiones de células de levaduras y de esporas del moho empleando agua ultra pura estéril. La concentración de los inóculos se calculó utilizando una cámara de recuento Thoma.

Evaluación de la capacidad antifúngica de *D. hansenii* en medio de cultivo. Cada cepa de *D. hansenii* (10^6 células/ml) se inoculó conjuntamente con *P. verrucosum* (10^5 esporas/ml) en caldo YES. Además se prepararon controles de todos los microorganismos inoculados individualmente. Tras la incubación a 20°C durante 15 días se determinó el crecimiento del moho mediante el peso seco del micelio obtenido por filtración y el desarrollo de levaduras mediante recuento en agar Dicloran 18% Glicerol (DG18). La producción de OTA se determinó tras extracción con cloroformo, evaporación del extracto, resuspensión en acetonitrilo, filtración y análisis por UHPLC-MS/MS. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Evaluación de la capacidad antifúngica de *D. hansenii* en embutidos. Para evaluar la actividad inhibidora de las levaduras en condiciones similares a las del procesado de los productos cárnicos madurados se llevó a cabo un ensayo en salchichón comercial. Se realizó una inoculación de *P. verrucosum* Pv45 (10^5 esporas/ml) en presencia o ausencia de cada cepa de *D. hansenii* (10^6 células/ml) en lonchas de salchichón obtenidas en condiciones asépticas y se incubaron en recipientes con humedad relativa del 84% a

20°C durante 21 días. Se realizaron dos ensayos por duplicado. Se determinó el crecimiento de las levaduras y el moho al final de la incubación, mediante recuentos en agar DG18, y se evaluó el contenido en OTA siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez y col. (2012) con algunas modificaciones. Los extractos obtenidos fueron analizados por UHPLC-MS/MS.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con el software IBM SPSS Statistics 19.0. Para comparar los valores medios de las muestras tratadas con el lote de control se aplicó la prueba de Dunnett. La significancia estadística se estableció en $P < 0,05$ y $P < 0,01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Efecto antifúngico de las cepas de *D. hansenii* en medio de cultivo.

En los recuentos alcanzados en los lotes inoculados individualmente con cada una de las cepas de levaduras (Tabla 1), todas alcanzaron valores aproximados de $4,5 \log_{10}$ ufc/ml, sin existir diferencias significativas entre las muestras inoculadas y siendo la cepa 226G en presencia del moho la única capaz de alcanzar valores superiores a $5 \log_{10}$ ufc/ml.

La determinación del peso seco del micelio permitió observar una disminución del crecimiento que osciló entre el 64 y el 96% con respecto al crecimiento en ausencia de levadura. Tres de las cuatro cepas de levaduras estudiadas mostraron una inhibición significativa ($P < 0,05$) del crecimiento del moho, siendo la cepa 29P la que presentó mayor capacidad inhibidora (Tabla 1). Cuando se analizó la concentración de OTA en los co-cultivos, sólo se detectó con la cepa 125G (Tabla 1), aunque los niveles detectados fueron significativamente menores a los del moho en ausencia de levaduras.

Efecto antifúngico de *D.hansenii* en salchichón.

En el ensayo realizado en salchichón, se observó que todas las cepas de levaduras estudiadas presentaron una adecuada implantación en el producto cárnico (Tabla 2). Sin embargo, no se observó una inhibición significativa del crecimiento de *P. verrucosum* Pv45, e incluso en el caso de la cepa 29P, se observó un mayor crecimiento del moho ($P < 0,05$; Tabla 2).

Por otra parte, en las muestras inoculadas conjuntamente con *P. verrucosum* Pv45 y cada una de las levaduras se detectó una reducción significativa de entre un 78 y un 93% del contenido de OTA ($P < 0,01$). Un efecto similar de *D. hansenii* ha sido descrito en jamón curado (Andrade y col., 2014).

Debido a que la cepa 226G fue la que proporcionó los mejores resultados tanto sobre el crecimiento del

moho como sobre la presencia de OTA en el ensayo en embutidos, ésta podría ser propuesta para su empleo como cultivo protector en la industria cárnica con el objetivo de controlar el peligro de la presencia de mohos productores de OTA. Esto resulta de gran interés para la implantación de los sistemas APPCC de las industrias cárnicas, ya que podría ser una medida preventiva adecuada para evitar el peligro asociado a la presencia de mohos productores de OTA y a la consiguiente presencia de la micotoxina en los productos cárnicos madurados.

Tabla 1: Recuento de mohos y levaduras y concentración de OTA en los ensayos de inhibición en medio de cultivo (media± desviación estándar).

Lote de tratamiento	Rto. levaduras (log ufc/ml)	Peso micelio (g)	OTA (µg/ml)
Pv45	-	0,128±0,050	0,085±0,082
125G	4,37±0,13	-	-
125G+Pv45	4,36±0,15	0,046±0,060	0,019±0,032
253H	4,71±0,07	-	-
253H+Pv45	4,3±0,50	0,007±0,000**	-
226G	4,73±0,26	-	-
226G+Pv45	5,12±0,64	0,015±0,010*	-
29P	4,88±0,04	-	-
29P+Pv45	4,26±0,84	0,004±0,010**	-

*: diferencias significativas con respecto al control Pv45 ($P < 0,05$).

** : diferencias significativas con respecto al control Pv45 ($P < 0,01$).

Tabla 2: Recuento de mohos y levaduras en los ensayos de inhibición en salchichón (media± desviación estándar).

Lote de tratamiento	Rto. levaduras (log ufc/cm ²)	Rto. mohos (log ufc/cm ²)	OTA (µg/Kg)
Control	-	-	-
Pv45	2,96±2,574	4,43±0,28	0,713±0,495
125G+Pv45	5,63±0,475	3,95±0,45	0,120±0,051**
253H+Pv45	5,47±0,223	4,41±0,20	0,085±0,071**
226G+Pv45	6,58±0,135	4,29±0,25	0,047±0,055**
29P+Pv45	7,47±0,108	6,17±0,00*	0,096±0,041**

*: diferencias significativas con respecto al control Pv45 ($P < 0,05$).

** : diferencias significativas con respecto al control Pv45 ($P < 0,01$).

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, M.J., Thorsen, L., Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Jespersen, L., 2014. Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 170, 70-77.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F., Córdoba, J. 2012. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* 27, 118-126.
- Simoncini, N., Virgili, R., Spadola, G., Battilani, P., 2014. Autochthonous yeasts as potential biocontrol agents in dry-cured meat products. *Food Control* 46, 160-167.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL2010-21623 del Ministerio de Ciencia e Innovación y con la ayuda GR10162 del Gobierno de Extremadura y FEDER.

SESIÓN VII: Retos microbiológicos en la industria alimentaria II.

Impacto en la Salud Pública de una extensión en el periodo de almacenamiento del huevo cáscara

Pablo Romero

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italia. Pablo.RomeroBarrios@efsa.europa.eu

El Panel de riesgos biológicos (BIOHAZ) ha valorado recientemente el riesgo para la Salud Pública que podría presentar *Salmonella* Enteritidis en huevos cáscara si el periodo de almacenamiento se prolongase. Dicha valoración se recoge en una opinión científica publicada recientemente (EFSA, 2014).

El Panel BIOHAZ basó sus conclusiones a este respecto en los resultados de un modelo cuantitativo que describe el comportamiento de *S. Enteritidis* transmitida verticalmente de la ponedora al huevo, ya que este serotipo ha sido identificado como el principal patógeno asociado a brotes de enfermedades alimentarias con origen en huevos al ser capaz de contaminar el contenido de los huevos durante su formación en ponedoras infectadas. La contaminación a través de la cáscara se considera de menor importancia en huevos obtenidos bajo condiciones modernas de producción. El papel de la contaminación externa de la cáscara en cuanto al riesgo para la Salud Pública no ha podido ser cuantificado por falta de datos.

El modelo cuantitativo está basado en un modelo previo (Thomas y col., 2006), que fue modificado para que se ajustase mejor a las condiciones europeas de producción y almacenamiento de huevos. El modelo actualizado excluye las etapas anteriores a la puesta, ya que se consideró que los posibles cambios en el tiempo de almacenamiento de los huevos sólo afectarían el crecimiento de *S. Enteritidis* desde el momento de la puesta en adelante. Por lo tanto el modelo no incluyó factores a nivel de granja. Se incluyó en el modelo información sobre la prevalencia de *S. Enteritidis* en el interior del huevo de cáscara, al combinar la proporción de huevos contaminados con *S. Enteritidis* producidos por manadas de ponedoras infectadas, obtenida a partir de información publicada en la literatura científica, con la prevalencia de dichas manadas en la Unión Europea (UE), estimada mediante datos de vigilancia armonizada.

Para el modelo se definieron una serie de escenarios. El escenario base fue definido de acuerdo a la situación actual con respecto a la fecha límite de venta y la fecha de consumo preferente en la UE. Para valorar el impacto de posibles cambios en el almacenaje de huevos cáscara, se desarrollaron varios escenarios alternativos, cambiando la duración y la temperatura de almacenaje de los huevos, tanto a nivel

de venta al por menor como en el de consumo en el domicilio. El modelo sólo consideró huevos de *Gallus gallus* ya que no se encontraron datos suficientes para las otras especies. La valoración del impacto de los cambios en las condiciones de almacenaje se realizó tanto en la cadena de distribución que acaba en el domicilio particular como para aquellos huevos que se destinan a la restauración o el catering. Así mismo, se consideró también el uso de huevos cuando estos son mezclados de antemano para aquellas preparaciones que así lo requieren.

Según los resultados del modelo, la prolongación del tiempo de almacenamiento de los huevos cáscara aumenta el número de casos de salmonelosis por millón de raciones salvo cuando los huevos están bien cocinados (por ejemplo, huevos cocidos). La magnitud de este aumento en el riesgo depende del tiempo adicional que los huevos permanecen en las tiendas o en el domicilio. Una manera eficaz para reducir este aumento en el riesgo sería el mantener los huevos refrigerados en ambas etapas.

Según los resultados del modelo, extendiendo la fecha límite de venta una semana (de 21 a 28 días), manteniendo al mismo tiempo la fecha de consumo preferente actual (28 días) resultaría en un riesgo relativo de salmonelosis de 1.4 y 1.5 para raciones hechas con huevos crudos o cocinados ligeramente respectivamente, comparado con el escenario base. Si la fecha de consumo preferente se ampliase una semana (de 28 a 35 días), el riesgo relativo estimado sería de 1.6 y 1.7 respectivamente. En el peor de los casos evaluados en este ejercicio (fecha límite de venta de 42 días y fecha de consumo preferente de 70 días), el riesgo relativo sería de 2.9 y 3.5. Hay que tener en cuenta en cualquier caso que el riesgo absoluto seguiría siendo mayor en productos que utilizan huevos crudos comparados con aquellos que usen huevos cocinados ligeramente.

En otros escenarios alternativos se valoró el uso de refrigeración aplicado a todos los puntos de venta de huevos cáscara tal y como se utiliza hoy en día en aquellos establecimientos donde ya está en uso (es decir, asumiendo temperaturas entre 0 y 12 C), lo que resultaría en una reducción del riesgo estimado. El riesgo de salmonelosis se reduciría si la prolongación en la fecha límite de venta no superara las tres semanas, o si la fecha de consumo preferente se incrementase una o dos semanas (con fechas límite de

venta de 35 y 28 días respectivamente). Si estas fechas se prolongasen más allá de las tres semanas, el riesgo de salmonelosis estimado resultante sería mayor que el actual, incluso si los huevos fuesen refrigerados en el punto de venta, asumiendo que la proporción de consumidores que no almacena los huevos en el frigorífico no cambiase.

En cuanto al uso de mezclas de huevos, tanto a nivel doméstico como en restauración o catering, el riesgo relativo de salmonelosis estimado mostraría un aumento conforme aumentase la duración del almacenamiento de los huevos cáscara que se utilizasen en la mezcla, con una magnitud del aumento similar a la de los huevos consumidos individualmente. Habría que tener en cuenta que el riesgo resultante del consumo de mezclas de huevos de distintos lotes aumentaría en mayor proporción si la duración o la temperatura del almacenamiento de la mezcla incrementasen significativamente (por ejemplo incumpliendo las normas básicas de higiene).

La incertidumbre asociada a las asunciones hechas, así como a los datos utilizados en esta valoración influyen los valores absolutos del riesgo estimados. El efecto combinado de las incertidumbres asociadas a esta valoración es difícil de calcular, pero en cualquier caso los valores absolutos estimados deben utilizarse con cautela. Los valores de riesgo relativo estimados están menos influenciados por esta incertidumbre, por lo que son más fiables.

A raíz de esta evaluación del riesgo derivado de aumentar la duración del almacenaje de los huevos cáscara, el Panel BIOHAZ recomienda el efectuar valoraciones de riesgo que tengan en cuenta el efecto de distintas temperaturas de almacenamiento de los huevos cáscara sobre el riesgo que presentan los patógenos que se encuentran en dichos huevos, como *S. Enteritidis*. Así mismo, se recomienda el investigar la presencia de dichos microorganismos en ovoproductos que se elaboren con huevos almacenados durante más tiempo que el actual.

BIBLIOGRAFÍA

- Thomas C, Daughtry B, Padula D, Jordan D, Arzey G, Davey K, Holds G, Slade J and Pointon A (Australian Egg Corporation Limited, Australia), 2006. An Egg: *Salmonella* Quantitative Risk Assessment Model for the Australian Egg Industry. Australian Egg Corporation Limited, Australia
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014. Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. EFSA Journal 2014; 12 (7): 3782, 147 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3782.



Pablo Romero obtuvo la Licenciatura en Veterinaria en 1994 (especialidad en Bromatología, Sanidad y Tecnología de los Alimentos) y la de Ciencia y Tecnología de los Alimentos en 1996, ambas en la Universidad de Zaragoza. En 2004 obtuvo un título de Máster en Epidemiología en la Universidad de Guelph, Canadá.

En 1997 se trasladó al Reino Unido, donde trabajó como inspector veterinario en varios mataderos y salas de despiece. Se incorporó a los servicios oficiales veterinarios en el año 2000, y estuvo involucrado en el control de diversos brotes epidémicos animales (fiebre aftosa, peste porcina y encefalopatía espongiforme bovina). Posteriormente ha trabajado en Canadá e Indonesia como epidemiólogo veterinario, en temas de salud pública, como la seguridad alimentaria y el control de la gripe aviar.

Desde 2009 trabaja en la *European Food Safety Authority* (EFSA), donde ha sido responsable de la coordinación de varios grupos de trabajo del Panel de expertos en Peligros Biológicos acerca de la inspección de la carne, transmisión de scrapie por transferencia de embriones y la conservación de huevos. En la actualidad está trabajando en un proyecto sobre herramientas para la priorización de peligros biológicos.

Desinfección de verduras mínimamente procesadas

Silvia García

Área I+D+i, Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria - CNTA, sgdelatorre@cнта.es

El desarrollo y comercialización de hortalizas mínimamente procesadas ha aumentado en los últimos años como consecuencia de la creciente demanda del consumidor de productos frescos, saludables y fáciles de usar. En el proceso de elaboración de estos alimentos, la etapa de lavado tiene como objetivo el eliminar la suciedad, el descenso del contenido microbiológico y eliminar los exudados que se producen tras el corte y que pueden favorecer el crecimiento microbiano. Sin embargo, esta operación no elimina completamente la carga bacteriana y por tanto existe un riesgo de presencia de patógenos en el material vegetal que pueden constituir un riesgo para la salud. De hecho este tipo de vegetales se ha visto involucrado en varios brotes de toxiinfecciones alimentarias en los últimos años asociados, principalmente, a presencia de *Salmonella* y *Escherichia coli* verotoxigénico. Por otra parte, el lavado tiene importantes implicaciones económicas y medioambientales por el gran volumen de agua que es necesario utilizar y el gran volumen de vertido que se origina. El reacondicionamiento y reciclado del agua es, por tanto, un reto para la industria y es recomendado por instituciones gubernamentales. Sin embargo, el agua de lavado puede ser un fuente de contaminación cruzada de microorganismos patógenos, riesgo que se ve incrementado cuando se reutiliza y la calidad no es la adecuada (Holvoet y col., 2014; Tomás-Callejas y col., 2012; Gil y col., 2009; Allende y col., 2008; Danyluk y Schaffner, 2001). Varios proyectos europeos como RESFOOD, en el que participa CNTA, VEGITRADE o SUSCLEAN, financiados por el 7º Programa Marco, abordan estos puntos críticos y retos, lo que pone de manifiesto la importancia y el interés en desarrollar nuevas estrategias y soluciones para los mismos.

La incorporación de desinfectantes en la etapa de lavado se ha estudiado y de hecho se está utilizando en varios países europeos con dos objetivos: aumentar la seguridad y la vida útil de los productos, así como para descontaminar el agua de lavado, evitando el riesgo de contaminación cruzada. El hipoclorito sódico, en varias formulaciones, es el desinfectante más comúnmente utilizado en la industria de vegetales mínimamente procesados. Su uso está autorizado en algunos países europeos como coadyuvante tecnológico. Sin embargo, su empleo se está viendo cuestionado dada su baja eficacia en presencia de altos contenidos en materia orgánica y por la formación de trihalometanos, compuestos potencialmente carcinogénicos o mutagénicos (Hrudey, 2009; Ölmez y Kretzschmar, 2009; Richardson y col., 2007). Por otra parte, en el caso en el que el uso de agentes antimicrobianos esté prohibido, situación que ocurre por ejemplo, en Alemania, Países Bajos, Dinamarca o Bélgica, el procesado de vegetales IV Gama se basa en el aporte y refresco de grandes cantidades de agua potable. El objetivo es minimizar la acumulación de microorganismos en el agua y la posible transferencia de microorganismos del agua al vegetal. Sin embargo, varios estudios destacan que a pesar de la utilización de grandes volúmenes de agua de alta calidad, si no se utilizan desinfectantes, los microorganismos patógenos pueden incorporarse y residir durante periodos prolongados en los tanques de lavado, constituyendo un riesgo de contaminación cruzada en

el producto final (Holvoet y col., 2014; Allende y col., 2008a). Por tanto, el uso de agentes desinfectantes en el lavado sería la única alternativa para eliminar patógenos en el agua de lavado antes de que puedan adherirse al material vegetal o internalizarse provocando la contaminación cruzada del material vegetal limpio.

Por todo ello, existe una necesidad de desarrollar métodos alternativos de desinfección. Entre los agentes químicos estudiados para la descontaminación de vegetales destacan el uso de ácidos orgánicos como el láctico y el cítrico, agua electrolizada, ozono, ácido peroxiacético, peróxido de hidrógeno o dióxido de cloro. Los resultados varían ampliamente dependiendo del dependiendo del tipo de vegetal, del microorganismo diana, del método de inoculación y de las condiciones de lavado utilizadas (dosis, tiempo de contacto, forma de incorporación del desinfectante, etc.). Pero, en general, cuando los ensayos se realizan simulando las condiciones reales en cuanto a tipo de contaminación, parámetros de proceso (principalmente tiempo de lavado y ratio entre volumen de agua y producto) y contenido de materia orgánica en el medio, se observa una limitada eficacia en la que respecta a la descontaminación del material vegetal (Ramos y col., 2013, Lopez-Galvez y col., 2013; Alexopoulos y col., 2013; Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2013; Ramos y col., 2013; Neal y col., 2012; Monnin y col., 2012; Ölmez y col., 2009; Ongeng y col., 2006). Los agentes químicos

estudiados, incluido el hipoclorito, pueden lograr, como mucho, una reducción de 1-2 log de la población de microorganismos, muy similar al resultado conseguido lavando sólo con agua fresca (López-Gálvez y col., 2013; Alexopoulos y col., 2013; Long y col. 2011; Allende y col., 2008b; Nthenge y col., 2007; Delaquis y col., 2004). Las causas de esta ineficiencia son la adhesión de las bacterias en lugares de difícil acceso, la internalización de las mismas dentro del material vegetal, la formación de biofilms y/o la exposición insuficiente de las superficies del vegetal a los agentes de lavado (Sapers, 2001; Sapers y col., 2003; Long y col. 2011). Se han observado mejores resultados en lo que respecta a la inactivación sobre el material vegetal aumentando las dosis del desinfectante o combinando estos agentes químicos con otros agentes físicos como son el uso de temperatura moderada o la aplicación de vacío o presión, pero estos métodos son de difícil aplicación en la industria y/o comprometen la calidad sensorial de las verduras (Bermúdez-Aguirre y col., 2013; RESFOOD, 2013; Neal y col., 2012; Kim y col., 2011; Huang y Chen; 2011)

Por tanto, en lo que respecta a la seguridad alimentaria, el uso de desinfectantes químicos tiene una limitada eficiencia en lo que se refiere a la reducción de microorganismos patógenos del material vegetal contaminado. Centrándose en la vida útil, aunque se ha sugerido que los desinfectantes tienen el potencial de prolongar la vida útil, muchos estudios muestran que no hay diferencia con un tratamiento control. Los microorganismos adheridos al vegetal pueden crecer rápidamente después del lavado por la disponibilidad de nutrientes y la falta de competencia, por lo que las posibles diferencias iniciales en la carga microbiana después de diferentes estrategias de lavado, desaparecen durante el almacenamiento (Allende et al., 2008; Gómez-López et al., 2008; López-Gálvez et al., 2010; Olmez y Akbas, 2010; López-Gálvez y col., 2013; RESFOOD, 2013). A este respecto hay que tener en cuenta además que varios estudios sugieren que el descenso de los niveles de la microbiota natural podría facilitar la supervivencia y/o crecimiento de microorganismos patógenos (Francis y O'Beirne, 2002). Por ello, más investigación es necesaria para conocer la conveniencia de continuar con la estrategia de disminuir la carga microbiológica en estos productos.

En vista de estos datos, el esfuerzo se está concentrando en la optimización del uso de desinfectantes en el agua de lavado para evitar la contaminación cruzada de patógenos, minimizando la aparición de residuos, sin afectar a la calidad del producto y que permita reducir el consumo de agua.

El desarrollo y selección de las alternativas más eficaces debe tener en cuenta su compatibilidad con las prácticas actuales, el coste del tratamiento, la seguridad de los trabajadores y otros aspectos como son el cumplimiento de los requisitos legales o la aceptación por parte del consumidor. El dióxido de cloro, el ácido peroxiacético y el agua electrolizada, usados correctamente, se muestran como las alternativas más prometedoras. El ácido peroxiacético y formulaciones en base a este compuesto, principalmente con peróxido de hidrógeno, están ganando aceptación entre los desinfectantes químicos alternativos al cloro ya que permite la higienización del agua de lavado incluso en condiciones de elevado contenido de materia orgánica, con las ventajas de ser de fácil aplicación y no generar residuos peligrosos. Hasta el momento, sólo se han identificado subproductos de la desinfección inofensivos, la mayoría de ellos derivados de su descomposición espontánea (Dell'Erba y col., 2007). Como desventajas, su alto coste y el aumento de la carga orgánica en el medio. Pero una creciente demanda, así como el ajuste de la dosis más conveniente puede convertirlo en un alternativa al cloro competitiva (López-Gálvez y col., 2013; Vandekinderen y col., 2009; López-Gálvez y col., 2009; Kitis, 2004). El dióxido de cloro tiene varias ventajas aceptadas o percibidas con respecto al NaClO principalmente su alta efectividad a bajas concentraciones y una menor reactividad con la materia orgánica (Tomás-Callejas y col., 2012; Gómez-López y col., 2007). Por otra parte, tiene desventajas con respecto a su uso, a destacar su inestabilidad y que es explosivo en forma de gas concentrado. En lo que respecta a los residuos tiene menor potencial de formación de trihalometanos, sin embargo, puede resultar en la formación de otros compuestos específicos como cloritos y cloratos (Ramos y col., 2013). El agua electrolizada, puede ser de dos tipos, ácida o neutra y se genera por electrolisis de una disolución de sal (NaCl). Se ha demostrado su efecto bactericida y su capacidad para desinfectar el agua de lavado de vegetales (Ongneg y col., 2006). Su efectividad sería mayor que la del cloro a la misma concentración de cloro disponible lo que supondría una menor formación de cloraminas y trihalometanos (Gómez-López y col., 2013). La generación *in situ* de este desinfectante es sencilla y poco costosa y reduce los riesgos asociados al transporte y manejo de soluciones de cloro, aunque el coste de inversión es elevado.

A pesar de estos prometedores resultados, es necesario generar más conocimiento al respecto. Las investigaciones futuras deberían concentrarse en la optimización del uso de desinfectantes para evitar la

contaminación cruzada en el proceso de elaboración de verduras mínimamente procesadas, reduciendo en la medida de lo posible las dosis aplicadas, aumentando así la rentabilidad y la seguridad de estos tratamientos. Asimismo, se hace necesario el contar con mayor conocimiento sobre la formación de residuos de la desinfección no sólo en el agua de lavado sino también sobre el producto.



Silvia García de la Torre es Ingeniera Agrónoma por la Universidad Pública de Navarra (2000). Desde 2002 trabaja en el Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA), primero como Responsable del Departamento de Tecnología de Alimentos del área de I+D+i, y desde 2013 como Responsable Técnico-Científica del área de

I+D+i.

Ha participado en más de 30 proyectos de I+D+i con financiación pública a nivel regional, nacional e internacional, así como en proyectos bajo contrato con empresas, en las áreas de formulación, tecnologías alternativas de conservación y estudio de la calidad y seguridad de alimentos. Asimismo ha participado y participa en redes, plataformas y grupos de trabajo nacionales e internacionales dedicadas al fomento de la cooperación y la transferencia en el sistema Ciencia-Industria. Este trabajo ha tenido como resultado la puesta en el mercado de nuevos o mejores productos alimentarios, la publicación de 2 patentes y la participación en numerosas actividades de difusión científico-técnica.

Actualmente es la coordinadora técnica en CNTA del proyecto europeo RESFOOD "Resource Efficient and Safe Food Production and Processing" (FP7), que tiene, entre otros objetivos, el desarrollo de tecnologías innovadoras para el tratamiento de agua, la descontaminación y la detección de patógenos en la industria de vegetales mínimamente procesados.

Descontaminación de harinas y frutos secos.

Nicolás Meneses

Departamento I+D Bühler (Suiza)



Nicolás Meneses es Doctor en Ingeniería por la Universidad Técnica de Berlín y licenciado de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Austral de Chile. Actualmente, trabaja como Jefe de Proyectos en el departamento "Corporate Technology" de la empresa Bühler AG, Suiza.

Entre los años 2008 y 2011 trabajó como Científico Asociado en la Universidad Técnica de Berlín, en el departamento de "Food Biotechnology and Food Process Engineering". Sus áreas de interés se centran en la seguridad de alimentos de bajo contenido de agua y la aplicación de tecnologías térmicas (tratamientos de vapor, tostado, microondas, radiofrecuencias e infrarrojo) y tecnologías no-térmicas (luz ultravioleta, pulsos de luz, plasma, pulsos eléctricos, etc.).

En su carrera, ha publicado más de 20 artículos científicos y ha sido ponente en más de 30 conferencias internacionales. Ha recibido varios premios en reconocidas conferencias de Ciencia de los Alimentos: IFT, Non-thermal Division (2008, 2010, 2011, 2012) Pulsed Power Conference (2009), Higher Value Foods, FIESTA (2010), Julius Maggi, EFCE (2010 como co-author y en 2011 representando a Alemania). Ha sido representante de estudiantes en Europa por la división "Non-thermal Processing, IFT (2011)" y es actualmente parte del Comité ejecutivo de esta división como representante de competencias científicas de estudiantes.

Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en pera mínimamente procesada en distintos estados de madurez

Pilar Colás¹, Immaculada Viñas¹, Marina Anguera², Marcia Oliveira¹ y Maribel Abadias²

¹ Departamento de Tecnología de los Alimentos, Universitat de Lleida, XaRTA-Poscosecha, Centro Agrotecnio, Lleida, pilar.colas@tecal.udl.cat

² IRTA, XaRTA-Poscosecha, Fruitcentre, Lleida

En la obtención de fruta mínimamente procesada (MP), la variedad, el estado de madurez en el momento de procesado, la atmosfera de envasado y la temperatura son factores que influyen en su calidad y vida útil. *Listeria monocytogenes* es un patógeno de transmisión alimentaria que puede crecer en un amplio rango de temperatura (-0.4 °C hasta 45 °C) y pH (4.4-7.0), por lo que puede ser un problema para los elaboradores de frutas y hortalizas MP, que no sufren ningún proceso que garantice su eliminación y se conservan a temperatura de refrigeración. En este trabajo se ha estudiado el efecto del estado de madurez del fruto antes del procesado en la supervivencia y crecimiento de *L. monocytogenes* en pera 'Conference' MP y conservada a distintas temperaturas (5, 10 y 20 °C). El estado de madurez se estableció en base a la firmeza del fruto. Se estudiaron 4 estados de madurez distintos: verde (54-60 N), parcialmente maduro (43-53 N), maduro (31-42 N) y sobre-maduro (<31 N). En los distintos estados de madurez se analizaron también pH, acidez y sólidos solubles de la fruta. A 5 °C, *L. monocytogenes* presentó un incremento de población de 2.0 unidades logarítmicas tras 8 días de conservación, independientemente del estado de madurez, mientras que a 10 °C, la población aumentó 3.4 y 4.0 unidades logarítmicas en la pera procesada en el estado verde y sobremaduro, respectivamente. En la conservación a 20 °C, a los 2 días la población de *L. monocytogenes* sobre la pera MP incrementó 3.6 unidades logarítmicas en la fruta procesada en estado verde y 4.2 unidades logarítmicas en el sobremaduro. En las condiciones óptimas de conservación (5 °C), el estado de madurez es un factor clave para la calidad del producto pero no influye en el crecimiento de *L. monocytogenes*. Independientemente del estado de madurez en la pera 'Conference' MP, el potencial de crecimiento (δ) de *L. monocytogenes* se vio incrementado con la temperatura. Por este motivo es importante destacar el papel que tiene el mantenimiento de la cadena de frío a lo largo de la vida útil de este tipo de productos listos para el consumo.

INTRODUCCIÓN

Son conocidas las propiedades saludables de la pera (*Pyrus communis* L.), rica en azúcares como fructosa, sorbitol o sacarosa y a la vez una excelente fuente de fibra vegetal y de vitaminas y minerales. En la actualidad, la pera es la tercera fruta (junto la nectarina) más producida en España (502.434 tn) y un elevado porcentaje de esta (49,8 %) se produce en Lleida (Magrama, 2012). En los últimos años se ha hecho presente el interés por parte del consumidor hacia alimentos saludables, frescos, con bajo contenido calórico y fácil preparación. Los productos de frutas y hortalizas mínimamente procesados (MP) se ciñen a estos requisitos. En los últimos años, se han incrementado las toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella*, *Escherichia coli* y *L. monocytogenes* en frutas u hortalizas. *L. monocytogenes* tiene la capacidad de poder sobrevivir a temperaturas por debajo de los 0°C y puede ser un problema para los elaboradores de frutas y hortalizas MP, ya que estos productos no sufren ningún proceso que garantice la eliminación de microorganismos patógenos y se conservan a temperatura de refrigeración. La variedad, el estado de madurez en el momento del procesado, la

atmósfera de envasado y la temperatura son los factores que tienen mayor efecto en la vida útil de estos productos. La variedad 'Conference' destaca por su buena aptitud ante el procesado, a la vez que permite un mayor tiempo de almacenamiento en frío y es una de las más producidas. Además, se conoce el estado de madurez en el momento del procesado más adecuado para obtener un producto MP con una buena calidad y vida útil, pero no se ha estudiado si el estado de madurez juega un papel en la supervivencia o crecimiento de *L. monocytogenes* en esta matriz, incrementando así el riesgo ante una listeriosis. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del estado de madurez de la pera en el momento del procesado en la supervivencia y/o crecimiento de *L. monocytogenes* sobre la pera 'Conference' MP almacenada a distintas temperaturas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estado de madurez se estableció en base a la firmeza del fruto, estudiando 4 estados de madurez distintos: verde (54-60 N), parcialmente maduro (43-53 N, madurez óptima para el procesado), maduro (31-42 N) y sobremaduro (<31 N), que se obtuvieron exponiendo frutos del mismo lote a 20 °C durante distintos tiempos. Las peras se lavaron y la

superficie se desinfectó con alcohol al 70 %. A continuación, se peló, descorazonó y se trocó en 10 gajos. Se determinó también pH, acidez y sólidos solubles de cada estado de madurez.

Se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* del serotipo 1/2a aislada de ensalada iceberg MP (Abadias y col., 2008). Se inoculó en caldo de cultivo TSB enriquecido con extracto de levadura y se incubó a 37 °C durante 18 h. Las peras se inocularon por inmersión en una suspensión de *L. monocytogenes* preparada a una concentración de 10⁵ ufc/mL a partir de un concentrado. La pera se envasó en recipientes de polipropileno con tapa (500 cc), que permite el intercambio de gases con el ambiente. La fruta inoculada se almacenó a 5, 10 y 20 °C. Periódicamente se realizaron recuentos en medio selectivo Palcam, incubando las placas a 37 °C durante 48 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La pera 'Conference' que se empleó en este ensayo presentó un pH entre 4.7 y 5.6, sólidos solubles entre 13.8 y 15.8 °Brix y una acidez titulable entre 0.84 y 1.60 g de ácido málico/L. El acondicionamiento a 20 °C no ocasionó cambios significativos en el pH, el contenido de sólidos solubles y la acidez, viéndose solo modificado el parámetro de firmeza.

L. monocytogenes presentó crecimiento en todas las temperaturas estudiadas, llegando a incrementar la población 2.0 unidades logarítmicas a 5 °C después de 8 días de almacenamiento, sin observarse diferencias entre los distintos estados de madurez al final de la conservación (Figura 1).

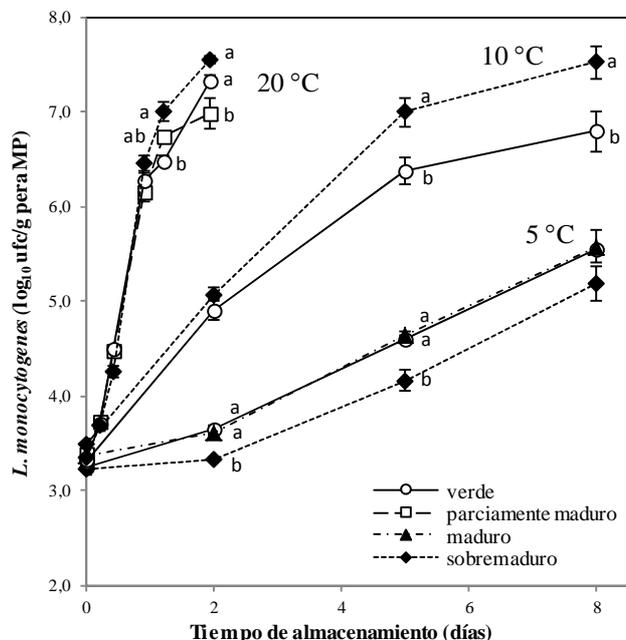


Figura 1: Recuento de la población de *L. monocytogenes* (log ufc/mL) sobre pera MP en 4 estados de madurez distintos y conservada a 5, 10 y 20 °C.

A 10 °C la población de *L. monocytogenes* sobre pera MP presentó un incremento de 3.4 unidades

logarítmicas a los 8 días en el estado de madurez 'verde' mientras que en el estado de madurez 'sobremaduro' se observó un incremento de 4.0 unidades logarítmicas, siendo el mayor incremento a esta temperatura. A 20 °C también se pudieron observar diferencias entre estados de madurez, donde la pera MP en estado 'maduro' y 'sobremaduro' presentó un incremento de 4.2 unidades logarítmicas mientras que el estado de madurez 'parcialmente maduro' presentó un incremento de población de 3.6 unidades logarítmicas después de 2 días de almacenamiento. De estos resultados se concluye que la pera de la variedad 'Conference', después de haber sufrido un procesado mínimo, es un sustrato óptimo para el crecimiento de *L. monocytogenes* incluso cuando se encuentra almacenada a 5 °C, temperatura aconsejada para una adecuada vida útil de productos de frutas y hortalizas MP.

A 5 °C se observó que tras 8 días de conservación, ningún estado de madurez permitió un mayor crecimiento del microorganismo. Sin embargo a 10 y 20 °C se observó que cuando menor fue la firmeza del fruto antes del procesado (más maduro) mayor fue el incremento de la población de *L. monocytogenes*. Independientemente del estado de madurez en el momento del procesado, el potencial de crecimiento (δ) de *L. monocytogenes* se vio incrementado con la temperatura, siendo de 0.32, 1.69 y 4.19 tras 2 días de conservación a 5, 10 y 20 °C, respectivamente. Esto reafirma la importancia que tiene el mantenimiento de la cadena de frío en el riesgo microbiológico de los productos listos para el consumo.

BIBLIOGRAFÍA

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solson, C., Vinas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 121-129.

Magrama (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente) 2012. Anuario de estadística 2012. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2012/default.aspx>. (consultado 11.02.2014).

Agradecimientos. Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto AGL-2012-38671). Universitat de Lleida, Grupo Alimentario Citrus y Banco Santander (beca predoctoral P. Colàs y proyecto UdL-Impuls).

Luz UV-C como método de descontaminación de alimentos pulverulentos

Santiago Condón-Abanto, María Gouma, Javier Raso e Ignacio Álvarez

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, nacho.alvarez@unizar.es

En este trabajo, se ha investigado el posible uso de la luz UV como método para la descontaminación de alimentos pulverulentos y en concreto de harina de trigo. Se estudió el efecto letal de esta tecnología sobre *Salmonella* Typhimurium y *Lactobacillus plantarum*, en medios de laboratorio de diferentes a_w , turbidez y coeficiente de absorción así como en harina. Los resultados iniciales mostraron una gran variabilidad, consiguiéndose entre 0,2 y 3 ciclos logarítmicos de inactivación, por lo que se estudió el posible efecto de la a_w , y efecto sombra sobre la eficacia de la luz UV. La investigación se culminó desarrollando un nuevo equipo para tratar estos productos que consigue reducir hasta 4 ciclos logarítmicos de *Lactobacillus plantarum*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una cierta preocupación por la presencia de microorganismos en productos pulverulentos que puedan utilizarse como materia prima para la elaboración de alimentos. El problema parece ser especialmente grave en las harinas, que pueden contener especies patógenas, como *Salmonella* spp (Berghofer y col., 2003).

En medios de baja a_w , como es el caso de los productos pulverulentos, los microorganismos contaminantes son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo; además, suelen mostrar en estas condiciones una gran resistencia al calor seco y los tratamientos con calor húmedo alteran su estructura, lo que impide su uso. Por estas razones, se hace necesario buscar alternativas tecnológicas para la descontaminación de las harinas. Una de estas alternativas podría ser la luz UV ya que se ha visto, en medios líquidos de laboratorio, que la a_w afecta poco a su eficacia letal, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de nuevas tecnologías.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de la luz UV para descontaminar harina y determinar el efecto de diferentes factores sobre la eficacia letal del tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron para el estudio *Salmonella* Typhimurium CECT 878 y *Lactobacillus plantarum* CECT 748.

Contaminación de la harina. Se extendieron homogéneamente 100 g de harina de trigo en una superficie de 1 m² y, con ayuda de un pulverizador, se añadieron 10 mL de cultivo microbiana con una concentración de 10⁹ UFC/mL. La harina se dejó secar durante 24 h en la cámara de flujo laminar a temperatura ambiente.

Aplicación de los tratamientos. Los tratamientos de las harinas contaminadas se aplicaron en tratamientos en estático en los que 1 o 0,1 gramos de harina se colocaban sobre un platillo vibratorio (1200 rpm), ubicado a una distancia de 5 cm de dos lámparas de 32W (VL-2089). En

los tratamientos en flujo continuo, se utilizó un equipo diseñado al efecto en nuestro laboratorio. El equipo consta de 8 lámparas de 36W (PHILIPS TUBE36W) y 4 de 32 W (VL-2089). Las lámparas formaban un túnel vertical, a través del cual se hacía fluir la harina a caudales entre 0,2 hasta 2,4 kg/h gracias a un sistema agitación con un tamiz de 200 µm colocado en la parte superior del túnel donde se colocaba la harina.

En los tratamientos sobre medios líquidos de distinta a_w (1 a 0,4), turbidez (0 a 1130 NTU) y coeficiente de absorción (4 a 40 cm⁻¹), se llevaron a cabo en un equipo diseñado en nuestro laboratorio, previamente descrito por Gayán et al. (2011).

Recuperación, siembra e incubación de supervivientes.

Para la recuperación en las muestras sólidas, se añadieron 1 o 0,1 gramos de la harina a 10 mL de agua de peptona y se homogeneizó en Stomacher. Para los tratamientos en los medios líquidos, se diluyó la muestra tratada en agua de peptona. El agar utilizado fue TSA+YE para *Salmonella* y agar MRS para *L. plantarum*. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h para *Salmonella* y a 30 °C en cámara de anaerobiosis (DW Scientific MACS-VA500) durante 48 h para *L. plantarum*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra las gráficas de supervivencia obtenidas de *Salmonella* Typhimurium inoculada en harina y tratadas en condiciones estáticas utilizando muestras de 1 y 0,1 gramo en cada tratamiento. Como se observa, la velocidad de inactivación en los primeros momentos es muy variable, pero a partir de un determinado momento se produce una cola en las gráficas de supervivencia que es más elevada cuando la cantidad de harina es mayor. Estos resultados indicarían que se produce un efecto sombra de las partículas de harina que protegería a los microorganismos de los fotones de luz UV. Evidentemente, cuanto mayor cantidad de harina o menos tiempo de tratamiento, menor será la eficacia letal del proceso. Se descartó que la variación en la eficacia letal se debiese a la baja a_w ya que la letalidad de *Salmonella* Typhimurium no se vió afectada

cuando se aplicaron tratamientos en medios de a_w que variaban entre 1,0 y 0,4 (datos no mostrados). La presencia de almidón en el medio (0,5%) tampoco afectó a la letalidad del proceso.

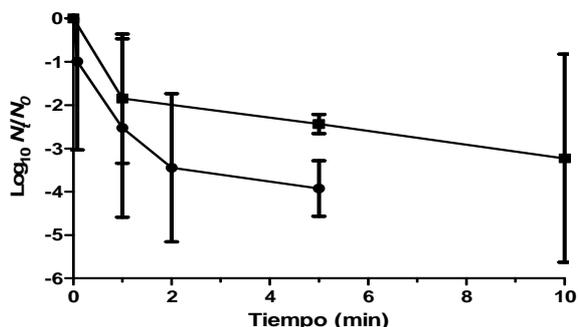


Figura 1: Inactivación de *Salmonella* Typhimurium STCC 878 en harina contaminada tratada en platillo vibratorio en cantidades de 1g (■) y 0,1g (●) por tratamiento.

Por el contrario, la absorbancia del medio de tratamiento así como la turbidez del mismo ejercieron un notable efecto en la letalidad. La Figura 2 muestra a modo de ejemplo el efecto del coeficiente de absorción en la letalidad de *Salmonella* Typhimurium. Como se observa, el primer aumento de 4 unidades de absorbancia supone un aumento del tiempo necesario para reducir 4 ciclos \log_{10} de 6,7 veces y los sucesivos aumentos suponen un incremento en torno a 1,5 veces. En el caso de la turbidez, un aumento de 600 unidades nefelométricas redujo 1 ciclo \log_{10} la eficacia letal del tratamiento. La notable influencia del coeficiente de absorción y la turbidez así como el efecto de la cantidad de harina tratada indicarían que el efecto sombra es el responsable de la variación de los resultados. Imágenes tomadas con microscopía electrónica de barrido de la harina contaminada con *Salmonella* Typhimurium permitieron observar como había microorganismos expuestos en la superficie de gránulos de almidón que serían fácilmente alcanzables por la luz UV, mientras que otros se encontraban localizados en zonas más ocultas quedando protegidos al UV.

Por todo ello y con el fin de aumentar la superficie de exposición, se hizo necesario diseñar una instalación que permitiera aplicar los tratamientos a gránulos de harina lo más pequeños posibles, pero permitiendo un cierto caudal de harina que hiciera viable su aplicación en flujo continuo. Como se ha descrito, la instalación permitía aplicar hasta 480W de luz UV con una fluencia de 10 mW/cm² con un tiempo de tratamiento total de 4 segundos. Para conseguir una pulverización de la harina, esta se hacía pasar sobre un tamiz vibratorio (1200 rpm) de 200 μ m. La harina tamizada caía por el su propio peso a modo de nube que recibía el tratamiento de luz UV-C.

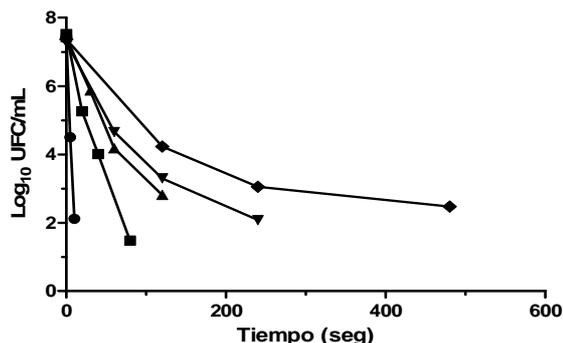


Figura 2: Efecto letal de la luz UV sobre *Salmonella* Typhimurium STCC 878 en medios líquidos de diferente coeficiente de absorción (×) 40 cm⁻¹, (*) 15 cm⁻¹, (▲) 12cm⁻¹, (■) 8 cm⁻¹, (◆) 4cm⁻¹.

La Figura 3 muestra la inactivación de *L. plantarum* alcanzada en dicha instalación a distintos tiempos de exposición y caudal a una potencia de 432W de luz UV-C. Como se observa, la inactivación aumentó exponencialmente con el tiempo de exposición siendo mayor la inactivación a menores caudales. A 0,2 kg/h se llegaron a inactivar 4 \log_{10} y a 2,4 kg/h 2 \log_{10} en tan sólo 4 segundos de tratamiento.

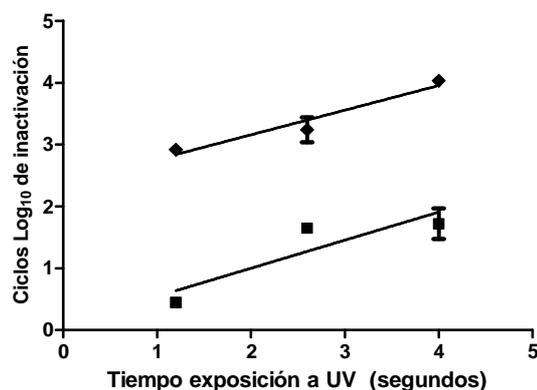


Figura 3: Eficacia letal de la luz UV (432W) sobre *L. plantarum* inoculada en harina de trigo tratada en flujo continuo (0,2 kg/h (●) y 2,4 kg/h (■)).

Estos resultados demuestran que es posible higienizar productos pulverulentos como es la harina de trigo mediante la aplicación de luz UV-C. Para ello, es fundamental conseguir la máxima superficie de exposición de la harina a la luz UV-C, como se ha conseguido con la instalación diseñada en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Berghofer, L.K., A.D. Hocking, D. Miskelly, E. Jansson. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of Food Microbiology, 85 (2003), pp. 137-149.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20), el Fondo Social Europeo y MENR de Grecia (2007-2013).

Efectividad de las defensas naturales del huevo contra la penetración de *Salmonella* spp.

Arantxa Muñoz¹, Nazaret Domínguez-Gasca¹, Concepción Jiménez-López² y Alejandro B. Rodríguez-Navarro¹

¹ Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, España, arantxa@ugr.es

² Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, España

El huevo es uno de los alimentos más consumidos debido a su gran valor nutricional y relativo bajo coste. No obstante, este alimento se asocia comúnmente con infecciones por *Salmonella* spp. Sin embargo, el huevo presenta distintas barreras tanto físicas como químicas que dificultan la entrada y contaminación del huevo por microorganismos. Para evaluar la importancia relativa de los diferentes tipos de defensas, se analizó la cutícula, cáscara (FTIR-ATR, SEM) y la composición en proteínas antimicrobianas del albumen (UPLC-masas) en huevos expuestos a una solución con *Salmonella*, y que presentaron desarrollo o no de contaminación en el albumen por este microorganismo. El estudio demostró que una cutícula totalmente desarrollada (6 h) previene la penetración por *Salmonella* (9 muestras positivas de un total de 180 huevos) mientras que una cutícula inmadura (3 h) no protege tan eficazmente (23 muestras positivas de un total de 180 huevos). En cuanto a la composición de la cutícula, se encontraron diferencias significativas entre las muestras contaminadas y las no contaminadas, particularmente en su contenido en proteínas y agua. Por otra parte, las muestras negativas mostraron un mayor porcentaje en proteínas antimicrobianas del albumen (lisozima y ovotransferrina) que aquellas muestras contaminadas. Los análisis por SEM mostraron un mejor recubrimiento de la cutícula en aquellas muestras no contaminadas.

INTRODUCCIÓN

El huevo es uno de los alimentos más consumidos debido a su gran valor nutricional y relativo bajo coste. No obstante, este alimento se asocia comúnmente con infecciones por *Salmonella* spp. Sin embargo, el huevo presenta distintas barreras tanto físicas como químicas que dificultan la entrada y contaminación del huevo por microorganismos y que se denominan “defensas naturales del huevo”. La primera línea de defensa del huevo es su cáscara mineral, que actúa como una barrera física contra la entrada de microorganismos. La cáscara está cubierta de una capa orgánica o cutícula, que bloquea la entrada de los poros de ésta aunque permitiendo el intercambio de agua y gases con el exterior. En el caso de que los microorganismos consigan penetrar esta primera barrera, se encontrarían con el albumen, rico en proteínas con actividad antimicrobiana (i.e., lisozima, ovotransferrina).

MATERIAL Y MÉTODOS

Lotes de huevos procedentes de gallinas ponedoras (Avícola Garrido García S.L.) fueron inoculados 3, 6 y 72 horas tras la puesta con una suspensión de *Salmonella* spp. Tras 2 y 21 días a 20 °C, estos huevos se analizaron para determinar:

Penetración de *Salmonella*. Una dilución 1:25 de yema y clara se preenriquecieron en BPW 24h a 30 °C para sembrarse posteriormente en agar XLD (48h a 30 °C). Las muestras positivas en *Salmonella* se caracterizaron por la presencia de colonias rosas-transparentes.

Análisis de la composición de la cutícula (FTIR-ATR).

La superficie externa de las cáscaras se midió sobre un cristal de diamante y el espectro de infrarrojos (IR) se obtuvo tras 100 escaneos a una resolución de 2 cm⁻¹ usando un espectrómetro FTIR (6200, JASCO).

Perfil proteico (UPLC-masas). La separación de las proteínas se realizó en el sistema binario Waters ACQUITY UPLC. Todas las medidas se obtuvieron en un sistema Waters SYNAPT HDMS. Para la fase reversa se utilizó una columna Waters ACQUITY UPLCCR BEH300 C4 1.7µm (2,1x50mm).

Estudio de la superficie de huevos (SEM). Fragmentos intactos de las cáscaras se recubrieron con carbón y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución a 15 kV (Zeiss).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Penetración de *Salmonella*

El número de huevos contaminados fue mayor en aquellas muestras inoculadas cuando la cutícula estaba inmadura (3 h) (23 huevos contaminados de un total de 180). Por el contrario, la incidencia de contaminación fue mínima en huevos con cutícula totalmente desarrollada (6 h), donde no se observó contaminación 2 días después de la inoculación (Figura 1). Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos, que determinan el papel de la cutícula en evitar la contaminación por *Salmonella* (Bain y col., 2013).

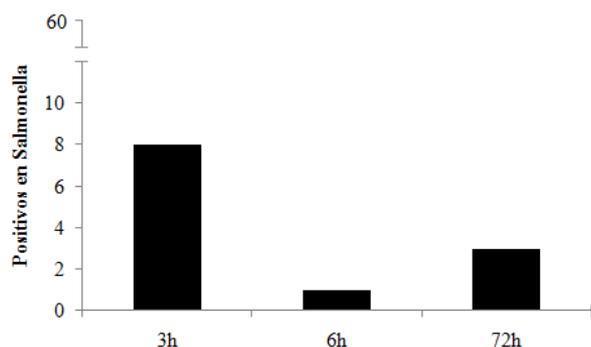


Figura 1: Número de huevos contaminados por *Salmonella*. Los resultados se presentan como número de muestras positivas en XLD.

Composición de la cutícula (FTIR-ATR)

Cuando se comparan los espectros IR de muestras contaminadas y no contaminadas, se observan diferencias notables en el espesor y/o composición de la cutícula a las 6 h. En general, los espectros IR de cáscaras procedentes de huevos contaminados mostraron una señal menor de amidas comparada con la de huevos no contaminados, indicando esto una cutícula más delgada que hace más accesibles los poros a la entrada de bacterias, facilitando, por tanto, la contaminación del interior del huevo. Además, en huevos contaminados con *Salmonella*, la señal de OH (agua) era significativamente mayor que en aquellos no contaminados, indicando una mayor permeabilidad de la cáscara que ayuda a la contaminación bacteriana (Figura 2).

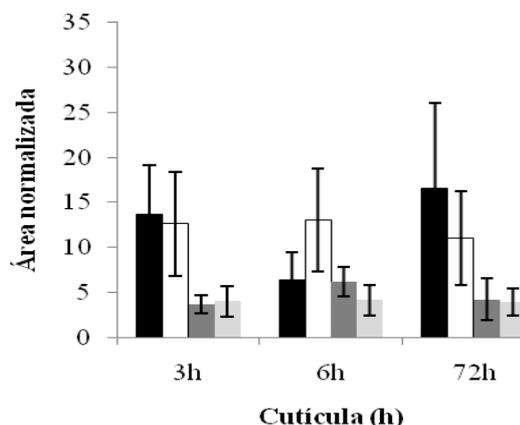


Figura 2: Diferencias composicionales ATR entre muestras contaminadas y no contaminadas. (■) Amidas muestras contaminadas; (□) Amidas muestras no contaminadas; (■) OH muestras contaminadas; (□) OH muestras no contaminadas.

Perfil proteico (UPLC-masas)

Los análisis de UPLC-masas de albúmenes de muestras contaminadas y no contaminadas pusieron de manifiesto que en las primeras, la abundancia relativa de lisozima y ovotransferrina era

considerablemente menor que en las muestras no contaminadas (Figura 3). Estas proteínas se caracterizan por su actividad antimicrobiana. La ovotransferrina permite un mayor acceso de la lisozima al peptidoglicano (Facon y col., 1996).

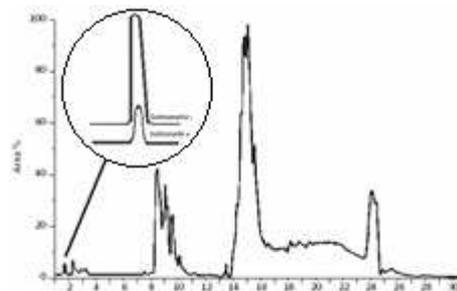


Figura 3: Abundancia relativa de lisozima entre muestras contaminadas y no contaminadas.

Estudio de la superficie de la cáscara (SEM)

Por regla general, el grado de recubrimiento de la cutícula es bueno. Sin embargo, aquellos huevos contaminados, mostraron o bien ausencia de cutícula o un recubrimiento pobre, dejando la superficie de la cáscara y los poros expuestos (Figura 4). En cualquier caso una calidad pobre de la cutícula facilitaría la contaminación del interior del huevo por *Salmonella*. Estas diferencias fueron más evidentes en gallinas jóvenes. Según estos resultados y los de Tung y col. (1979), la protección que ofrece la cutícula es temporal (hasta 72 h).

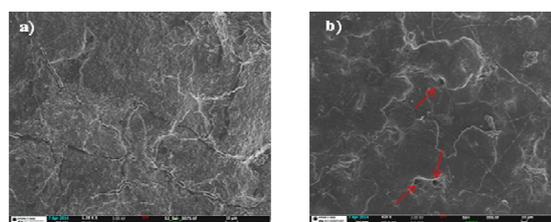


Figura 4: (a) Cáscara cubierta por la cutícula (b) Superficie expuesta (flecha: poros)

BIBLIOGRAFÍA

- Bain, M. M., Mcdade, K., Burchmore, R., Law, A., Wilson, P. W., Schmutz, M., Preisinger, R. and Dunn, I. C. 2013, Enhancing the egg's natural defence against bacterial penetration by increasing cuticle deposition. *Anim Genet.*, 44:661-668
- Facon, M. J., and B.J. Skura. 1996, Antibacterial activity of lactoferrin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *Int. Dairy J.*, 6:303-313
- Tung, M. A., M. R., Garland, and P. K. Gill. 1979, A Scanning Electron Microscope Study of Bacterial Invasion in Hen's Egg Shell. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 12:16-22.

Resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas en el aire de una granja de vacuno de leche

Susana Sanz¹, Enrique V. Navajas-Benito², C. Andrea Alonso², Carmen Olarte¹, Roberto Martínez-Olarte¹, Sara Hidalgo-Sanz¹, Sergio Somalo² y Carmen Torres²

¹ *Tecnología de los Alimentos, Universidad de La Rioja, Logroño, España, susana.sanz@unirioja.es*

² *Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, España*

El empleo de antibióticos en la práctica veterinaria ha sido señalado como una causa importante de aparición de resistencias a antibióticos en bacterias con implicaciones en salud pública. La forma en la que esas bacterias resistentes llegan hasta productos destinados a la alimentación humana no ha sido siempre totalmente explicada. Entre las posibles vías de diseminación, la transmisión por el aire no debe ser descartada. En este trabajo se ha estudiado la sensibilidad antibiótica en 38 cepas de *Escherichia coli* procedentes del aire del interior de una granja de vacuno. El 57,9 % de las cepas presentaron resistencia o sensibilidad disminuida a al menos uno de los antibióticos estudiados. No se detectaron resistencias frente a: ceftazidima, cefotaxima, imipenem ni amikacina. Los porcentajes de resistencia frente al resto de antibióticos estudiados fueron: tetraciclina (23,7%, 9 cepas); trimetoprim-sulfametoxazol (21,1%, 8); ampicilina y ácido nalidíxico (15,8%, 6); ciprofloxacino, cloranfenicol y tobramicina (7,9%, 3); gentamicina (5,3%, 2); y amoxicilina-ácido clavulánico y cefoxitina (2,6%, 1). Un 26,3% de las cepas (10 cepas) presentaron resistencia a antibióticos pertenecientes a dos o más familias.

INTRODUCCIÓN

El 48% de los antibióticos que se emplean a nivel mundial se utilizan en la práctica veterinaria. El empleo de antibióticos en este ámbito ha sido señalado como una causa importante de aparición de resistencias a antibióticos en bacterias con implicaciones en salud pública. La forma en la que esas bacterias resistentes llegan hasta productos destinados a la alimentación humana no ha sido siempre totalmente explicada. Entre las posibles vías de diseminación de estos microorganismos, la transmisión por el aire no debe ser descartada.

Como fue descrito en un trabajo anterior (Martínez-Olarte y col., 2013), el aire puede diseminar bacterias hasta distancias considerables y alcanzar, así, alimentos cultivados en las inmediaciones. El objetivo de este trabajo ha sido conocer la existencia de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos en el aire de una explotación ganadera y alertar de la posibilidad de que estos microorganismos resistentes puedan incorporarse, vía aérea, en la cadena alimentaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras. Se muestreó el aire de diferentes zonas de una granja de vacuno dedicada a la producción de leche. Para ello se emplearon dos sistemas: un procedimiento estático en el que las placas Petri con el medio de cultivo utilizado fueron expuestas al aire durante 4 horas, y un procedimiento mecánico en el que, mediante un muestreador AirIdeal (Biomerieux), 1.000 litros de aire fueron aspirados impactando sobre una placa con el medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en el muestreo fue Chromocult Coliform Agar (Merck). Se trata de un medio cromogénico en el que, tras incubación (37°C, 24 h), las colonias sospechosas de *E. coli* se diferencian por la aparición de un color violeta.

Confirmación de las colonias de *E. coli*. Las colonias sospechosas fueron confirmadas mediante tinción Gram, pruebas bioquímicas (indol, siembra en TSI) y PCR específica mediante amplificación del gen *uidA* (Heininger y col., 1999). Para el estudio de la relación clonal de los aislados de *E. coli* se llevó a cabo la digestión del ADN cromosómico mediante la enzima de restricción *Xba*I y los fragmentos resultantes fueron separados mediante cromatografía de campos pulsados (PFGE) para identificar y comparar los perfiles genéticos específicos (Arbeit y col., 1990; Tenover y col., 1995).

Estudio de sensibilidad a antibióticos. Se empleó el método de difusión por disco para determinar la sensibilidad a los siguientes antibióticos: ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, gentamicina, amikacina y tobramicina. Los resultados del antibiograma se interpretaron siguiendo los puntos de corte establecidos por el CLSI (2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 38 cepas de *E. coli* con patrones de PFGE diferentes en el aire del interior de la granja de vacuno muestreada y se estudió la sensibilidad antibiótica de las mismas.

El 57,9% de las cepas aisladas presentaron resistencia o sensibilidad disminuida a al menos uno de los antibióticos estudiados. Todas las cepas

analizadas fueron sensibles a ceftazidima, cefotaxima, imipenem y amikacina. Los porcentajes de resistencia frente al resto de antibióticos estudiados fueron: tetraciclina (23,7%, 9 cepas); trimetoprim-sulfametoxazol (21,1%, 8); ampicilina y ácido nalidíxico (15,8%, 6); ciprofloxacino, cloranfenicol y tobramicina (7,9%, 3); gentamicina (5,3%, 2); y amoxicilina-ácido clavulánico y cefoxitina (2,6%, 1) (Figura 1). Se detectó sensibilidad disminuida a ampicilina, tobramicina o ciprofloxacino en 10 (26,3%), 1 (2,6%) y 1 (2,6%) cepas, respectivamente (Figura 1). La expresión de β -lactamasas de tipo TEM o IRT por parte de la bacteria, podrían explicar la resistencia a ampicilina o amoxicilina-ácido clavulánico. La resistencia a la cefoxitina, por su parte, puede deberse a una hiperproducción de β -lactamasa cromosómica de tipo AmpC.

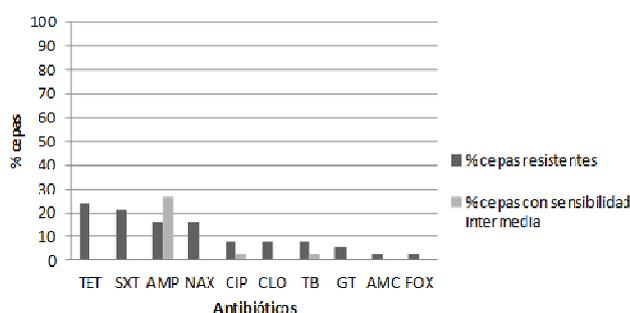


Figura 1: Distribución de cepas resistentes o con sensibilidad disminuida a los diferentes antibióticos. TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; AMP, ampicilina; NAX, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacino; CLOR, cloranfenicol; TB, tobramicina; GT, gentamicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; FOX, cefoxitina.

El 23,7% de las cepas presentaron un fenotipo de multiresistencia, que implica resistencia a antibióticos pertenecientes a 3 ó más familias.

Como conclusión, el estudio de sensibilidad antibiótica de las cepas de *E. coli* aisladas del aire del interior de la granja de vacuno refleja la existencia de una moderada tasa de resistencia adquirida, aunque inferior a las reportadas en estudios realizados en aislamientos clínicos. Cabe destacar la ausencia de resistencia a cefalosporinas de tercera generación o carbapenémicos entre los aislados de *E. coli* obtenidos en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Arbeit, R.D., Arthur, M., Dunn, R.D. Kim, C., Selander, R.K., Goldstein, R. 1990, Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.*, 161:230-235.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Third Informational Supplement Approved standard M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Heininger, A., Binder, M., Schmidt, S., Unertl, K., Botzenhart, K., Döring, G. 1999, PCR and blood culture for detection of *Escherichia coli* bacteremia in rats. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2479-2482.
- Martínez-Olarte, R., Olarte, C., Somalo, S., Hidalgo-Sanz, S., Sanz, S. 2013, Diseminación por el aire de *E. coli*. Libro del XXIV Congreso de Microbiología SEM, 287.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D. Goering, R.V., Mikelsen, P.A., Murray, B.E. Persing, D.H., Swaminathan, B. 1995, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33:2233-2239.

Origen de la contaminación de los vinos con *Brettanomyces*

Susana Sanz¹, Patrocinio Garijo², Lucía González-Arenzana², Isabel López-Alfaro², Teresa Garder-Cerdán², Rosa López², Pilar Santamaría² y Ana Rosa Gutiérrez^{1,2}

¹ Tecnología de los Alimentos, Universidad de La Rioja, Logroño, España, susana.sanz@unirioja.es

² ICVV, Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja, CSIC).

Brettanomyces bruxellensis es considerada actualmente como la principal causa de alteración de los vinos, debido a la formación de fenoles volátiles. La contaminación de muchos vinos con *Brettanomyces* durante la fase de elaboración, y antes del inicio de la crianza, quedó confirmado al analizar 100 vinos tintos recién elaborados en la campaña 2012, donde esta levadura se detectó en un porcentaje elevado de muestras (27%). Sin embargo, el nivel de *Brettanomyces* en la mayoría de los vinos fue bajo, en valores que todavía no originan defectos organolépticos. Por lo tanto, este trabajo confirma que muchos vinos están ya contaminados con *Brettanomyces* al finalizar la fase de elaboración. También se observó que en vinos con problemas durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica, la presencia y nivel de *Brettanomyces* es mayor. Por ello, es importante realizar un riguroso control durante el desarrollo de las fermentaciones y durante la conservación para evitar la alteración de los vinos con esta levadura.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras de la especie *Brettanomyces bruxellensis*, tienen la capacidad de alterar los vinos al producir etilfenoles, compuestos responsables de los aromas descritos como cuero, animal, granja, sudor de caballo, medicina. La presencia de *Brettanomyces* en vinos constituye una problemática que ha adquirido gran importancia a nivel internacional, ya que todas las zonas vitivinícolas se han visto afectadas en mayor o menor medida. Por ello, varios autores creen que controlar el desarrollo de estas levaduras en los vinos es el reto más importante de la enología actual (Wedral y col., 2010).

Tradicionalmente las barricas han sido consideradas como la principal fuente de contaminación del vino con *Brettanomyces*. Sin embargo, resultados recientes indican que las primeras etapas del procesado y elaboración en las bodegas deben ser estudiadas como posible origen de esta contaminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la vendimia de 2012 con 100 vinos tintos jóvenes que acababan de terminar las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Los vinos procedían de las distintas subzonas de la DOCa. Rioja: 30 de Rioja Alta, 30 de Rioja Baja y 20 de Rioja Alavesa. Los 20 restantes eran muestras que habían tenido problemas durante la vinificación. Los vinos se recogieron de las bodegas utilizando botellas estériles de vidrio de 500 ml. Las muestras de vino fueron analizadas mediante rtPCR, utilizando el sistema ETS Scorpions Systems. Para identificar y cuantificar la población se utilizó un real-time termocycler (Smart cycler II, Cepheid) y marcadores de fluorescencia.

Además 500 µl de todas las muestras se sembraron por duplicado en placas Petri con medio DBDM y fueron incubadas a 25°C durante 21 días. Transcurrido este tiempo se procedió al recuento y aislamiento de 5 colonias que posteriormente se identificaron mediante PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del DNA ribosomal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que el porcentaje total de vinos contaminados al final de la vinificación con levaduras *Dekkera/Brettanomyces* fue del 27% (Tabla 1). Al analizar los vinos contaminados en función del desarrollo de la vinificación encontramos que el mayor porcentaje de contaminación (40%) corresponde a los vinos con problemas durante las fermentaciones. En estudios previos, estas levaduras alterantes ya se habían asociado a fermentaciones lentas o paradas (Silva y col., 2004), y también se ha indicado que la fermentación maloláctica es otro punto crítico de contaminación (Oelofse y col., 2008).

Tabla 1: Presencia y nivel (cfu/ml) de *Brettanomyces* en vinos tintos.

Vinos	Muestras totales	Muestras positivas (%)	ufc/ml en Muestras Positivas			
			1-10	10-10 ²	10 ² -10 ³	>10 ³
RA	30	6 (20)	6	0	0	0
RB	30	6 (20)	4	2	0	0
RV	20	7 (35)	4	3	0	0
PS	20	8 (40)	2	1	0	5
Total	100	27 (27)	17	5	0	5

RA: Rioja Alta; RB: Rioja Baja; RV: Rioja Alavesa PS: Muestras Problemáticas

Los vinos provenientes de Rioja Alavesa presentaron porcentajes de contaminación del 35% y los de Rioja Alta y Baja del 20%. Estas diferencias podrían deberse a los métodos de vinificación empleados: en Rioja Alta y Baja todas las bodegas

elaboraban mediante estrujado y despalillado, mientras que en Rioja Alavesa muchos de los vinos habían sido elaborados mediante maceración carbónica. Las características específicas de estos últimos (alto pH, alta temperatura de vinificación, menor nivel de SO₂, etc.) podrían favorecer el desarrollo de *Brettanomyces* y explicar estas diferencias.

A pesar de esos porcentajes de contaminación, hay que indicar que los niveles de *Brettanomyces* (ufc/ml de vino) en la mayoría de las muestras contaminadas (22 de 27: 81%) son muy bajos y están lejos de los considerados peligrosos para la alteración del vino. El riesgo de acumulación excesiva de fenoles volátiles se produce cuando la población de *Brettanomyces* en el vino supera el nivel de 10²-10³ ufc/ml (Renouf y col., 2005). Sin embargo, sí se superó ese valor crítico en 5 muestras procedentes de los vinos problemáticos. Estos vinos ya presentaban una alteración detectable al olfato en el momento del análisis. El resto de vinos con contaminaciones bajas tendrán que cuidarse durante la conservación evitando la multiplicación de las levaduras, para evitar que desarrollen el problema.

Estos resultados concuerdan con lo indicado por Renouf y col. (2007). Estos autores afirmaban que son muy raros los vinos en los que *B. bruxellensis* no está presente, y que pensar en la ausencia total de este microorganismo a lo largo de la vinificación es irreal. Por ello, los enólogos sólo tienen la opción de limitar y controlar su multiplicación. En este contexto, la pregunta sobre el origen de *B. bruxellensis* es determinante para adelantarse a su multiplicación.

BIBLIOGRAFÍA

- Oelofse, A., Pretorius, I.S., Du Toit, M. 2008, Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. S. Afr. J. Enol. Vitic., 29(2):128-144
- Renouf, V., Lonvaud-Funel. A. 2005. Effet microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barriques anciennes. Revue Française d'Oenologie, 211:10-14.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel., A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl. Microbiol. Biotechnol., 75:149-164.
- Silva, P., Cardoso, H., Gerós, H. 2004. Studies on the wine spoilage capacity of the *Brettanomyces/Dekkera spp.* Am. J. Enol. Vitic., 55(1):65-72.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. 2010, The challenge of *Brettanomyces* in wine. LWT- Food Sci. Technol., 43:1474-1479.

Caracterización de cepas bacterianas resistentes a biocidas aisladas a partir de la industria láctea

M^a Luisa Fernández Márquez¹, M^a José Grande Burgos¹, M^a Carmen López Aguayo¹, Julia Toledo del Árbol¹, Rosario Lucas¹ y Antonio Gálvez¹

¹Área de Microbiología, Universidad de Jaén, España, agalvez@ujaen.es

Los biocidas son ampliamente utilizados en diferentes ámbitos, incluyendo la industria alimentaria. La resistencia a biocidas empieza a ser un fenómeno que preocupa a diferentes sectores, por su posible papel en la co-selección de resistencias a otros agentes antimicrobianos, incluidos los de uso clínico. En el presente estudio se ha partido de muestras tomadas de superficies de industrias lácteas, de las cuales se ha aislado una colección de cepas bacterianas. Para determinar la sensibilidad a biocidas, las cepas aisladas fueron sembradas en medio líquido adicionado de concentraciones crecientes de diferentes biocidas, a fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada biocida. Los niveles más altos de resistencia se han obtenido para los biocidas triclosan, polihexametilén guanidio, cloruro de benzalconio y cetrimida. Se ha seleccionado una colección de las cepas que mostraban mayores niveles de resistencia y/o mostraban resistencias múltiples a biocidas. Las cepas resistentes han sido identificadas a nivel de especie mediante técnicas moleculares, tratándose en su mayoría de lactococos y *Escherichia coli*. Para las cepas resistentes a biocidas se ha estudiado también la resistencia a antibióticos, encontrándose bajos porcentajes de cepas resistentes a estreptomycin o cloranfenicol, pero sí más elevados para beta-lactámicos y tetraciclinas así como a trimetoprim/sulfametoxazol. Se han estudiado los determinantes genéticos de la resistencia a biocidas y antibióticos, encontrándose la presencia de genes *qac* (y bombas inespecíficas de exporte en el caso de las cepas Gram-negativas) así como de genes para beta-lactamasas y genes de resistencia a tetraciclinas. Los resultados obtenidos indican que las cepas procedentes de ambientes lácteos pueden mostrar co-resistencias a antibióticos y a biocidas.

INTRODUCCIÓN

Las operaciones de limpieza y desinfección son fundamentales en las industrias alimentarias para mantener bajos niveles de contaminación tanto de microorganismos saprofitos como patógenos. Detergentes, biocidas, o combinaciones de ambos son utilizados con frecuencia en las operaciones de limpieza y desinfección. El cloruro de benzalconio es ampliamente utilizado en la desinfección de utensilios, instrumentos y superficies de diverso tipo. El triclosan también es ampliamente utilizado, incorporado en embalajes para alimentos, tablas de corte, plásticos, contenedores de basura, así como en productos para la higiene y el cuidado personal. El cloruro de hexadecilpiridinio fue aprobado por la FDA para la descontaminación de canales de ave.

Aunque la mayoría de los biocidas ejercen efectos caotrópicos sobre las estructuras celulares como la membrana citoplásmica, las bacterias han desarrollado mecanismos de tolerancia (basados algunos de ellos en bombas de exporte) que pueden conferir co-resistencia a algunos antibióticos de uso clínico. También cabe la posibilidad de que las cepas adaptadas a biocidas sean portadoras de genes de resistencia a antibióticos, por lo que la exposición a biocida puede dar lugar a una co-selección de ambos caracteres. En el presente estudio se ha caracterizado

una colección de bacterias procedentes de la industria láctea en cuanto a su sensibilidad a biocidas y antibióticos, y presencia de determinantes de resistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha partido de una colección de 44 aislados procedentes de vaquerías y queserías de la región. La sensibilidad a biocidas se ha determinado mediante microtitulación en placas de 96 pocillos adicionadas de concentraciones crecientes de biocida. Aquellas cepas que mostraron una tolerancia a biocidas superior al valor de corte de la población (ECOFF) fueron seleccionadas para posterior estudio. La resistencia a antibióticos se determinó empleando discos impregnados con diferentes concentraciones de antibiótico (CLSI, 2012). La presencia de genes de resistencia para derivados de amonio cuaternario y para antibióticos se estudió mediante PCR empleando cebadores y condiciones de amplificación descritos en la literatura científica (Chiu y col., 2006; Sáez y col., 2004; Swick y col., 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de aislados con mayor tolerancia para los diferentes biocidas fueron: cloruro de benzalconio (18,18%), cetrimida (22,22%), cloruro de hexadecilpiridinio (2,27%), polihexametilénbiguanida (29,54), triclosan (43,18%) y hexaclorofeno (9,09%).

Un 18,18% de los aislados fueron tolerantes a dos biocidas, y un 4,54% eran tolerantes a 3, 4 o 5 biocidas. También se encontró un aislado (2,27%) que era tolerante a 6 biocidas.

Del conjunto de aislados se seleccionaron 19 por su mayor tolerancia a alguno de los biocidas ensayados o por ser tolerantes a dos o más biocidas, y se determinó su resistencia a antibióticos (Tabla 1). En cuanto a beta-lactámicos, la resistencia a ampicilina fue la más frecuente (12 de los 19 aislados), aunque muchos aislados también mostraron resistencia a cefotaxima y ceftazidina. Otras resistencias destacadas fueron para tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol, encontrándose ambas con frecuencia en cepas que mostraban múltiples resistencias a beta-lactámicos.

El gen de resistencia a biocidas *qacEAI* estaba presente en 13 de los aislados estudiados. Este gen se encuentra con frecuencia en cepas de *Salmonella* asociado a integrones de la clase I, junto con otros genes de resistencia a antibióticos como sulfonamidas. No obstante, solo se encontraron tres aislados positivos para sulfonamidas, y solo en uno de ellos se encontró el gen *int* correspondiente a la integrasa. Estos resultados deberán ser investigados en mayor profundidad, ya que ninguna de las cepas identificadas pertenece al género *Salmonella*. Los genes de resistencia a beta-lactámicos detectados fueron *bla_{CTX-M}*, *bla_{PSE}* y *bla_{TEM}*, pero solo uno de los aislados portaba también *qacEAI*. En cambio, en seis de los aislados se encontró que *qacEAI* estaba asociado con las bombas de exporte (o sus componentes) *acrB* y *mdfA*. El aislado que mostraba tolerancia a los seis biocidas ensayados (identificado como *Enterobacter cloacae* mediante análisis comparativo de su secuencia 16S rDNA) mostraba un genotipo *qacEAI*, *sulFR*, *acrB*, *mdfA*, *tetA* (Tabla 1). Este aislado recuerda al fenotipo de *Salmonella* multiresistente ASSuT (ampicilina, estreptomycin, sulfamidas, tetraciclina), que está ampliamente diseminado, y sugiere que los determinantes genéticos correspondientes podrían también estar presentes en otras bacterias.

En su conjunto, los resultados del presente estudio indican claramente que las cepas más tolerantes a biocidas presentan también resistencias a antibióticos de uso clínico. Cabría esperar, por tanto, que la exposición a concentraciones subletales de biocidas en la industria alimentaria ayudase a mantener fenotipos resistentes a antibióticos, facilitando de ese modo su diseminación a lo largo de la cadena alimentaria.

Tabla1: Resistencia fenotípica y genotípica a antibióticos y biocidas en aislados procedentes de la industria láctea.

Aislado	Biocidas	Antibióticos	Genes
1	TC	AMP, CTX, IMP	<i>bla_{CTX-M}</i>
2	TC		<i>qacEAI</i>
3	BC, CT, TC, PHMG	AMP	<i>qacEAI</i>
4	TC	AMP, STR,	
5	BC, CT, TC	AMP, TET	<i>qacEAI</i>
6	BC, CT, TC	AMP, CM	<i>qacEAI</i>
7	TC	NET	<i>qacEAI</i>
8	PHMG	TET, CM, SM, NAL, TM/STX	<i>tetC</i>
9	PHMG	TET, NAL, TM/STX	<i>qacEAI</i> , <i>tetD</i>
10	BC, CF, PHMG	AMP, TET, TM/STX	<i>qacEAI</i> , <i>sulFR</i> , <i>int</i> , <i>acrB</i> , <i>mdfA</i>
11	BC, TC, CF, PHMG		<i>qacEAI</i> , <i>acrB</i> , <i>mdfA</i>
12	BC, CT, HDP, TC, CF, PHMG	AMP, SM, TET, TM/STX	<i>qacEAI</i> , <i>sulFR</i> , <i>acrB</i> , <i>mdfA</i> , <i>tetA</i>
13	BC, CF, PHMG		<i>qacEAI</i> , <i>acrB</i> , <i>mdfA</i>
14	BC, CF, PHMG		<i>qacEAI</i> , <i>acrB</i> , <i>mdfA</i>
15	PHMG	AMP, CTX, CFZ, TM/STX	<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{PSE}</i> , <i>bla_{TEM}</i>
16	BC	AMP, CTX, CFZ, TM/STX	<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{PSE}</i> , <i>bla_{TEM}</i>
17	BC, CT, PHMG	AMP, CTX, CFZ, TET, TM/STX	<i>qacEAI</i> , <i>sulFR</i> , <i>acrB</i> , <i>mdfA</i> , <i>tetA</i>
18	PHMG	AMP, CTX, CFZ, TM/STX	<i>bla_{TEM}</i>
19	PHMG	AMP, CTX, TM/STX	<i>qacEAI</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{PSE}</i> , <i>bla_{TEM}</i>

BC, cloruro de benzalconio; CT, cetrimidida; HDP, cloruro de hexadecilpiridinio; PHMG, polihexametileno biguanida; TC, triclosan; CF, hexaclorofeno; AMP, ampicilina; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; IMP, imipenem; TET, tetraciclina; CM, cloranfenicol; STR, estreptomycin; NET, netilmicina; NAL, nalidixico; TM/STX, trimetoprim/sulfametoxazol.

BIBLIOGRAFÍA

- Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013, Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53:11–48.
- Chiu, CH., Su, LH., Chu, CH., Wang, MH., Yeh, CM., Weill, FX., Chu, C., 2006, Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 44:2354-8.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Document M100–S22. Vol. 32 no. 3. Wayne, PA.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C., 2004, Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:3996–4001.
- Swick, M.C., Morgan-Linnell, S.K., Carlson, K.M., Zechiedrich, L., 2011, Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55:921–924.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía).

Tolerancia a biocidas en aislados de *Salmonella* procedentes de productos cárnicos en Andalucía

Antonio Marín Garrido¹, M^a José Grande Burgos², M^a Luisa Fernández Márquez², M^a Carmen López Aguayo², Rubén Pérez Pulido², Julia Toledo del Árbol², Rosario Lucas² y Antonio Gálvez²

¹Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Jaén, España

²Área de Microbiología, Universidad de Jaén, España, agalvez@ujaen.es

La salmonelosis sigue ocupando el segundo lugar entre las zoonosis más frecuentes en humanos, con un total de 91.034 casos confirmados en Europa en el año 2012, de los cuales 4.181 se registraron en España. En este estudio, se analizó una colección de aislados de *Salmonella enterica* procedentes de muestras cárnicas de Andalucía en el periodo 2002-2007. Los serotipos más frecuentes fueron (por orden) Typhimurium, Enteritidis, Derby, Anatum y Rissen. Se tomaron 43 aislados para ensayar su sensibilidad a biocidas incluyendo los derivados de amonio cuaternario cloruro de benzalconio, cetrimida y hexadecilpiridinio, y los bisfenoles triclosan y hexaclorofeno. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) para los derivados de amonio cuaternario oscilaron entre 25 y 50 mg/l para la mayoría de los aislados, si bien unos pocos aislados mostraron CMIs mucho más elevadas, de hasta 250 mg/l. Los bisfenoles presentaron una mayor actividad, con CMIs de 2.5 a 25 mg/l. Solo se detectaron unos pocos aislados con CMIs superiores a la media de la población para el triclosan, de hasta 250 mg/l. Estos resultados indican que una pequeña fracción de la población de *Salmonella enterica* en productos cárnicos podrían ser tolerantes a biocidas derivados del amonio cuaternario y al triclosan.

INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica es un patógeno importante por su capacidad para provocar gastroenteritis y fiebre tifoidea (Coburn y col., 2007). Algunos estudios sugieren que *Salmonella* puede permanecer en las superficies y equipos empleados en la manipulación de carne cruda, y que las operaciones de limpieza e higiene convencionales pueden no ser totalmente efectivas en la eliminación de la bacteria de dichos ambientes (Arguello y col., 2012; Hernández y col., 2013). Esto nos lleva a plantear la cuestión de su posible tolerancia a biocidas. Los biocidas son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, como por ejemplo en la desinfección de contenedores, cintas transportadoras, o suelos y demás superficies de las plantas de producción (McDonnell y col., 1999; SCENIHR, 2009). La tolerancia de las bacterias a los biocidas empieza a ser una cuestión preocupante, dado que algunos mecanismos de resistencia son inespecíficos o pueden dar lugar a una co-selección de genes de resistencia a antibióticos (Ortega Morente y col., 2013). El objetivo de este trabajo ha sido analizar la tolerancia a biocidas en aislados de *Salmonella* procedentes de diferentes tipos de carne y alimentos cárnicos, incluyendo alimentos tradicionales fermentados como el chorizo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron los datos correspondientes a los serotipos encontrados en 112 muestras cárnicas positivas para *Salmonella* en inspecciones oficiales realizadas en

Andalucía durante 2002-2007. De ellas, se tomaron 43 aislados procedentes de la provincia de Jaén para estudiar su tolerancia a biocidas: cloruro de benzalconio (BC), cetrimida (CT), hexadecilpiridinio (HDP), triclosan (TC) y hexaclorofeno (CF). Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) mediante microtitulación en placas de 96 pocillos tras 24 h de incubación a 37°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los serotipos de *Salmonella* más frecuentes encontrados en muestras cárnicas en Andalucía en el periodo 2002-2007 fueron (por orden) Typhimurium, Enteritidis, Derby, Anatum y Rissen. La mayor frecuencia de contaminación se detectó para los derivados de cerdo, especialmente el chorizo. Se ha descrito que los niveles de Enterobacterias (incluyendo *Salmonella*) se mantienen estables o incluso pueden aumentar ligeramente en las etapas iniciales de maduración del chorizo, para luego descender gradualmente (Castaño y col., 2002). En chorizo de México se ha detectado la presencia de *Salmonella* (Escartín y col., 1999). En los Estados Unidos se detectó en 2013 un brote de salmonelosis que afectó a 294 personas asociado al consumo de chorizo en una cadena de restaurantes de Nevada (Nguyen, 2013). Después de los productos de volatería, los derivados de cerdo también son importantes en cuanto a contaminación con *Salmonella*. De acuerdo con un informe de la EFSA-ECDC 2012 (EFSA-ECDC, 2014), los niveles más

altos de contaminación en mataderos se detectan en Bélgica (10.8 %) y España (7.8 %).

Las medidas de higiene y desinfección adecuadas son fundamentales para controlar la presencia de *Salmonella* en los ambientes de producción y procesado de alimentos. Cuando se ensayó la sensibilidad a biocidas en aislados de *Salmonella* se encontró que el cloruro de benzalconio inhibía a la mayoría de los aislados a 50 mg/l, excepto a uno que requirió 250 mg/l (Tabla 1). La cetrimida mostró una actividad similar, aunque se detectaron más aislados con CMI's por encima de 50 mg/l. El hexadecilpiridinio también fue muy activo, inhibiendo a la mayoría de los aislados a 25-50 mg/l.

El bisfenol triclosan fue el más activo de todos los biocidas ensayados, ya que inhibió al 79.07% de los aislados a 2.5 mg/l. No obstante, un total de 9 aislados requirieron concentraciones mayores para su inhibición, de hasta 250 mg/l en un caso. El hexaclorofeno fue menos efectivo a 2.5 mg/l comparado con el triclosan, pero a diferencia de éste no se detectaron aislados con CMI's superiores a 25 mg/l para este biocida. Por tanto, los aislados tolerantes a triclosan son sensibles al hexaclorofeno.

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias para diferentes biocidas frente a aislados de *Salmonella* de productos cárnicos. Se muestran los porcentajes de aislados inhibidos para cada concentración de biocida. (BC: cloruro de benzalconio, CT: cetrimida, HDP: hexadecilpiridinio, TC: triclosan y CF: hexaclorofeno).

Biocida	Concentración mínima inhibitoria (mg/l)				
	2.5	25	50	100	250
BC	2.33	9.30	86.04		2.33
CT		4.65	88.37	4.65	2.33
HDP		37.20	55.82	6.98	
TC	79.06	9.30	6.98	2.33	2.33
CF	51.16	48.84			

En conjunto, los resultados de este estudio indican que la mayoría de los aislados de *Salmonella* analizados son sensibles a concentraciones relativamente bajas de biocidas. Para la mayoría de los biocidas ensayados se encontraron unos cuantos aislados con CMI's superiores a la mayoría de la población. Dichos aislados deberían ser considerados como tolerantes a biocidas. Uno de los aislados destacó por presentar CMI's elevadas para tres biocidas distintos (incluyendo derivados de amonio cuaternario triclosan), y otros dos presentaban CMI's de 100 mg/l para la cetrimida y el hexadecilpiridinio. Los aislados con mayores niveles de tolerancia así como los que presentan tolerancias múltiples están siendo estudiados para conocer los posibles genes de resistencia implicados.

El cloruro de benzalconio es ampliamente utilizado para la limpieza de utensilios e instrumentos en la industria alimentaria. El hexadecilpiridinio (cetilpiridinio) fue aprobado en 2004 por la FDA para la descontaminación de carne de ave. Otro biocida de uso común, el triclosan, se utiliza en una gran variedad de productos de uso diverso (SCENIHR, 2009). Por tanto, y de acuerdo con los datos aquí presentados, es bastante probable que la exposición a estos biocidas en la industria provoque la aparición de cepas de *Salmonella* tolerantes. La posibilidad de que la exposición a biocidas tenga como consecuencia indirecta una co-selección de genes de resistencia a antibióticos debe ser investigada.

BIBLIOGRAFÍA

- Arguello, H., Carvajal, A., Collazos, J.A., García-Feliz, C., et al., 2012. Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Res. Int.*, 45:905–912.
- Castaño, A., García Fontán, M.C., Fresno, J.M., Tornadizo, M.E., et al., 2002. Survival of *Enterobacteriaceae* during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. *Food Control*, 13:107-115.
- Coburn, B., Grassl, G.A., Finlay, B.B. 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.*, 85:112–118.
- EFSA-ECDC, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.*, 12:3547.
- Escartín, E.F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A., Saldaña-Lozano, J., 1999. Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. *Food Microbiol.*, 16:479–486.
- Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Luque, I., Herrera-León, S., et al., 2013. *Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: Tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. *Int. J. Food Microbiol.*, 162:48–54.
- McDonnel, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:147–179.
- Nguyen, L., 2013. *Salmonella* Gastroenteritis Outbreak Among Patrons of Firefly on Paradise Restaurant – Las Vegas, Nevada. Southern Nevada Health District. Interim Report 3. (<http://www.southernnevadahealthdistrict.org/download/stats-reports/firefly-interim-report-052213.pdf>)
- Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande-Burgos, M.J., Abriouel, H., et al., 2013. Biocide tolerance in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 162:13-25.
- SCENIHR, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2009. –Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, January 2009, pp. 24–25.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P08-AGR-4295 (CICE, FEDER) y el Plan Propio de Ayudas a la Investigación (UJA).

Efecto protector de *Lactobacillus reuteri* INIA P572 frente a *Listeria monocytogenes* en queso

Izaskun Martín-Cabrejas, Susana Langa, Raquel Montiel, Ángela Peirotén, Juan L. Arqués y Margarita Medina

Dpto. Tecnología de Alimentos, INIA, Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid. martin.izaskun@inia.es

Se ha estudiado el efecto de la adición de *Lactobacillus reuteri* INIA P572 productor de reuterina, como adjunto al fermento comercial junto con glicerol (100 mM), sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* durante la fabricación y maduración de queso. En el queso control, así como en los elaborados únicamente con *L. reuteri* o con glicerol, los niveles del patógeno fueron del orden de 4 log ufc/g al finalizar los 30 d de maduración. Se observó un efecto antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* en los quesos elaborados con *L. reuteri* y glicerol, con recuentos del patógeno 2.2 log ufc/g inferiores a los del queso control en el día 1, y ausencia en 25 g de queso desde los 7 d a los 30 d. La presencia de reuterina se detectó en los quesos con *L. reuteri* y glicerol durante los primeros 7 d de maduración. *L. reuteri* INIA P572 productor de reuterina podría ser empleado como cultivo adjunto bioprotector para el control de microorganismos patógenos en queso ante una eventual contaminación en el producto.

INTRODUCCIÓN

Actualmente los consumidores demandan alimentos más sanos y naturales, siendo los productos lácteos fermentados que contienen microorganismos probióticos los de mayor difusión dentro de los alimentos funcionales. *Lactobacillus reuteri* es una bacteria ácido láctica con demostrado potencial probiótico. Algunas cepas son capaces de sintetizar reuterina durante el metabolismo anaeróbico del glicerol. La reuterina es un aldehído soluble en agua, activo a un amplio rango de pH y temperaturas, resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas y cuyo efecto antimicrobiano está demostrado frente a *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni* (Arqués y col., 2008; Montiel y col., 2014). La producción de este metabolito por *L. reuteri* INIA P572 se ha demostrado *in situ* en productos lácteos (Langa y col., 2013). En la mayoría de los países con sistemas de notificación de enfermedades alimentarias se han registrado incrementos significativos en la incidencia de toxiinfecciones causadas por *L. monocytogenes*, siendo la listeriosis una de las mayores causas de muerte por infección de origen alimentario en Europa (Alleberger y col., 2010). En la UE en 2012 se confirmaron un total de 1642 casos y 198 muertes (EFSA, 2014). Al ser una bacteria ubicua es capaz de adaptarse a muchas condiciones y supone un riesgo para los productos listos para el consumo, como es el queso, que se ha visto implicados en varias de estas toxiinfecciones (EFSA, 2014). Entre un 4 y un 5% de los quesos vendidos al por menor en el Reino Unido mostraron niveles superiores a los recomendados por la UE (2004/24 y 2005/175) para *L. monocytogenes*. El objetivo de este trabajo es estudiar la producción *in*

situ de reuterina por *L. reuteri* INIA P572 en queso así como su efecto protector frente a *L. monocytogenes*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fabricación de los quesos. Se realizaron dos fabricaciones a partir de leche inoculada con *L. monocytogenes* OHIO a aprox. 5 log cfu/ml y un 1% de fermento comercial (MA O16, que contiene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*). En cada fabricación la leche se repartió en 4 cubas (Figura 1): queso control (Cuba 1), queso con 100 mM de glicerol (Cuba 2), queso con *L. reuteri* al 1% (Cuba 3) y queso con la combinación de *L. reuteri* y glicerol (Cuba 4).

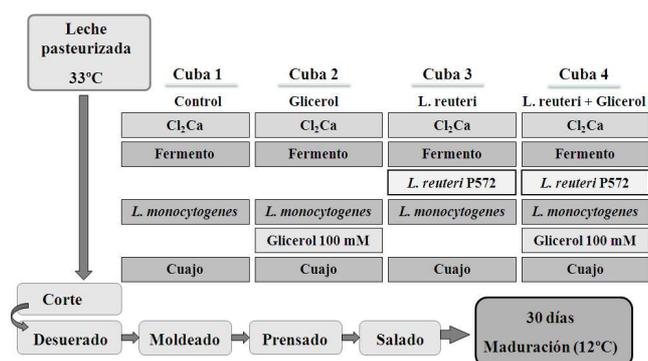


Figura 1: Esquema de fabricación de los quesos

Análisis microbiológico. Los quesos se maduraron durante 30 días a 12°C, y se analizaron los días 1, 7, 15 y 30. Se realizaron recuentos de totales, *L. reuteri* y *L. monocytogenes*.

Análisis químico y cuantificación de reuterina. Durante los tiempos indicados se analizó el pH de los quesos mediante un electrodo de penetración y se investigó la concentración de reuterina mediante el método colorimétrico de Circle y col. (1945).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución de microorganismos totales y *L. reuteri* INIA P572. Los recuentos de totales se mantuvieron en niveles de aprox. 9 log ufc/g a lo largo de los 30 d, a excepción de los quesos con *L. reuteri* + glicerol en que fueron descendiendo hasta 4.2 log ufc/g al final de maduración. *L. reuteri* disminuyó 1.5 log ufc/g en los quesos con dicha bacteria a los 30 d, mientras que en los quesos con *L. reuteri* + glicerol el descenso fue mayor, reduciéndose a niveles de 2.5 log ufc/g.

Actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. En los quesos de un día fabricados con *L. reuteri* + glicerol los recuentos de *L. monocytogenes* fueron aprox. 2 log ufc/g más bajos que en los otros quesos (control, queso con glicerol y queso con *L. reuteri*). En el queso control, los niveles del patógeno descendieron 2.1 log ufc/g al final de la maduración. Los recuentos de los quesos con glicerol o con *L. reuteri* no mostraron valores significativamente distintos ($P < 0.01$) a los del queso control para este mismo tiempo. En el queso con *L. reuteri* + glicerol no se detectó presencia de *L. monocytogenes* en 25 g de queso desde los 7 d hasta el final de la maduración.

Tabla 1. Recuentos de *L. monocytogenes* (log cfu/g) en quesos con glicerol, *L. reuteri* y su combinación.

	Tiempo (d)			
	1	7	15	30
Control	6.26	5.90	4.92	4.15
Glicerol	5.85	5.46	4.75	3.70
<i>L. reuteri</i>	5.88	5.44	4.64	4.23
<i>L. reuteri</i> + Glicerol	4.04	ND	ND	ND

Los recuentos de *L. monocytogenes* a las 0 h fueron 4.49 log cfu/g. ND significa ausencia en 25 gr.

pH y producción de reuterina. Se registró un descenso de pH durante la maduración en todos los quesos. En el caso de los quesos elaborados con *L. reuteri* + glicerol, este descenso fue menos pronunciado con valores aprox. 0.25 unidades superiores al queso control al final del periodo de maduración. Se confirmó la producción de reuterina con valores de 5.25 mol/g en el día 1 y 2.02 para el día 7 de maduración. No se detectó el compuesto antimicrobiano durante el resto de la maduración.

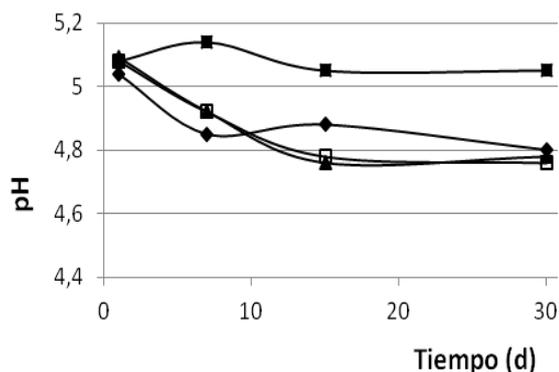


Figura 2: Evolución del pH durante los 30 d de maduración. Queso control (◆), queso con glicerol (□), queso con *L. reuteri* (▲) y queso con *L. reuteri* + glicerol (■).

La reuterina presenta un efecto antimicrobiano frente a diferentes patógenos en alimentos como la leche (Arqués y col., 2008) o el salmón ahumado (Montiel y col., 2014). En el presente trabajo, *L. reuteri* INIA P572 fue capaz de sobrevivir en el queso y de producir *in situ* cantidades de reuterina suficientes como para ejercer un claro efecto bactericida frente a *L. monocytogenes*.

L. reuteri INIA P572 podría ser añadido como adjunto al fermento comercial y junto con glicerol (E-422) en la elaboración de quesos para el control de *L. monocytogenes*.

BIBLIOGRAFÍA

- Allerberger F., Wagner M. 2010, Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin Microbiol Infect, 16: 16-23.
- Arqués J.L., Rodríguez E., Nuñez M., Medina M. 2008, Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. Eur Food Res Technol, 227: 77-82.
- Circle, S. J., Stone, L., Boruff, C. S. 1945, Acrolein determination by means of tryptophane. Ind Eng Chem, 17: 259-262.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2014, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. EFSA Journal, 12, 3547.
- Langa S., Landete J. M., Martín-Cabrejas I., Rodríguez E., Arqués J.L., Medina M. 2013, *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. Food Control, 33: 200-206.
- Little C. L., Sagoo S. K., Gulespie I. A., Grant K., McLauchlin. 2009, Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other species in selected retail Ready-to-eat foods in the United Kingdom. J Food Prot, 72: 1869-1877.
- Montiel R., Martín-Cabrejas I., Gaya P., Medina M. 2014, Reuterin and high hydrostatic pressure treatments on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and effect on the characteristics of cold-smoked salmon. Food Bioprocess Technol. DOI:10.1007/s11947-014-1287-9.

Incidencia de hongos con potencial toxigénico en muestras de piensos y materias primas

Rodrigo Vera, Gisela Girmé, Leonardo Arosemena y M. Ángeles Calvo Torras

Grupo de Investigación en Microbiología Aplicada y Medioambiental. Departamento de Sanidad y Anatomía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, España rodrigo5280@gmail.com

Durante el año 2013 la presencia de micotoxinas en granos o semillas fue una de las principales alertas del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos del espacio europeo (RASFF). La presencia y/o acumulación de micotoxinas en alimentos o sustratos destinados a la nutrición humana y animal es una preocupación constante por los efectos nocivos para la salud derivados de su ingesta. A partir de 422 muestras de piensos y/o materias primas para su fabricación, provenientes de distintas empresas de la Península Ibérica, se determinó la presencia e incidencia de cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium* spp., descritos por su marcada capacidad tóxica. Los resultados indicaron que existe un 63% de incidencia por los hongos en el total muestras analizadas, donde *A. flavus* fue el grupo de *Aspergillus* que presentó el mayor porcentaje de incidencia en el total de muestras (29,8%), seguido por *Fusarium* spp. (20,58%) y *A. niger* (9,7%) respectivamente. La incidencia en piensos y materias primas separadamente, indicó que *A. flavus* presenta el mayor valor en ambos tipos de sustrato 28,4% y 24,14%, y que *A. niger* presentó el menor porcentaje. Dentro del análisis de materias primas, *A. flavus* fue detectada en todas las materias primas analizadas (n=10), siendo el salvado y la harina de soja los sustratos con los valores más elevados de incidencia, y el maíz el sustrato con el mayor porcentaje de incidencia acumulada (90%). Estos resultados evidenciarían que la presencia de micobiota con potencial toxigénico dentro de los alimentos destinados a nutrición animal es una realidad preocupante, y que el consumo al menos de las muestras positivas puede generar algún riesgo para la salud del animal y humana por probabilidad de presencia y/o acumulación de micotoxinas del tipo Aflatoxinas, Ocratoxinas, Fumonisinias y Zearalelona.

INTRODUCCIÓN

Debido a que muchos alimentos destinados a la nutrición animal constituyen un importante canal de introducción de peligros en la cadena alimentaria humana, debe evaluarse y confirmarse su inocuidad antes de ser suministrados a los animales. Estos procesos de evaluación revisan variados aspectos, que implica contemplar tanto la seguridad de los animales, como la de los seres humanos que consumen los residuos que pudieran permanecer en los alimentos de origen animal (FAO/OMS, 2007).

Dentro de las toxinas que aparecen en los alimentos, las micotoxinas se consideran una cuestión de seguridad alimentaria por sus efectos acumulativos y nocivos en animales y en el hombre (Zain, 2001; Campbell y col., 2004).

Todas las especies de hongos filamentosos son capaces de producir micotoxinas, sin embargo los pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* tienen mayor importancia por estar involucrados de forma notoria en la contaminación de alimentos para consumo humano y animal, y sus consecuentes efectos nocivos para la salud si son ingerido (Bryden, 2007), estimando que al menos 300 de estos metabolitos son potencialmente tóxicos para animales y humanos (Huwig y col., 2001).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. 422 muestras suministradas por empresas fabricantes de piensos del rubro animal, diferenciadas en 236 muestras de piensos y 186 muestras de materias primas diferenciadas en diez sustratos (cebada, colza, algarrobo, girasol, soja, harina soja, maíz, salvado, trigo, otro ingrediente).

Aislamiento e identificación de hongos filamentosos. Las muestras fueron resuspendidas en solución de Ringer eucariotas en proporción 1:9 para desprender propágulos fúngicos. 0.1 mL de cada muestra fueron sembradas en agar dextrosa Saboraud, e incubadas a 28°C por 4-7 días. Los hongos fueron identificados macroscópicamente por sus características fenotípicas y microscópicamente por sus estructuras reproductivas: forma de conidióforo y conidios.

Análisis de datos. Se determinó el porcentaje de incidencia siguiendo la siguiente fórmula: (n° muestras positivas/N) x 100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de presencia de hongos filamentosos con potencial toxigénico (Tabla 1), indicarían que el 63% de las muestras presentó contaminación, similar a los hallazgos en obtenidos por Richard y col. (2007), detectando la presencia de *A. flavus*, *A. niger* y *Fusarium* spp. en sus análisis.

Tabla 1: Porcentaje (%) de incidencia de hongos filamentosos (HF) con potencial toxigénico

	n	n +	% HF
TOTAL	422	266	63,03
PIENSOS	236	145	61,44
MATERIAS PRIMAS	186	121	65,05

n+ = número de muestras colonizadas con algún hongo filamentosos analizado en este estudio

%HF = porcentaje de incidencia de hongos filamentosos.

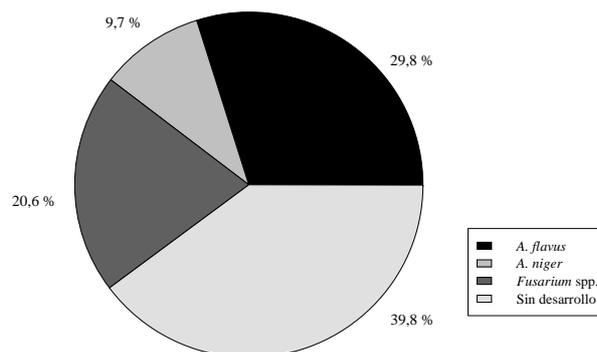
Tabla 2. Porcentaje (%) de incidencia de especies/géneros de hongos filamentosos en el total de muestras.

Hongo filamentosos	Piensos (n= 236)	Materias primas (n=186)
<i>Aspergillus flavus</i>	28,38%	24,15%
<i>Aspergillus niger</i>	8,89%	11,82%
<i>Fusarium spp.</i>	24,15%	18,27%

En piensos destinados a la industria animal, otros estudios han abordado esta problemática. Nuestros resultados (Tabla 2) concuerdan con la presencia de los géneros/especies de hongos filamentosos, sin embargo los porcentajes de incidencia difieren de los reportados por González-Pereyra y col. (2008), quienes encontraron que en piensos existe un índice de 13,88% para *A. flavus*, un 8,33% para *A. niger*, y para *Fusarium spp.*, hallaron que predomina en 100%. Asimismo, los reportado por Rosa y col. (2009) indican que *Fusarium spp.* se encuentra en todas las muestras, *A. flavus* en el 50% y el grupo *A. niger* en un 20%. Esto indicaría que los distintos valores pueden estar relacionados con la procedencia de las muestras, época de recolección, características ambientales y de almacenamiento, variables que favorecen el desarrollo de hongos filamentosos.

Dentro de las diez materias primas de uso en piensos, los resultados indican que el 100% es contaminado por uno o más hongo filamentosos, donde el maíz y el salvado presentaron los valores más altos de incidencia (>80%) (datos no indicados). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mngadi y col. (2008) en el maíz cuando es utilizado como materia prima. Asimismo los resultados del estudio de Lanier (2009) concuerdan con las especies/géneros micotoxigénicos asociados a la colza.

Es interesante destacar que del total de muestras evaluadas existió un porcentaje que no presentó contaminación por algún hongo filamentosos evaluado (Figura 1), a diferencia del estudio de González-Pereyra y col. (2008) donde el total de muestras de piensos que analizó presentó micobiota asociada con alguna especie/género determinada en nuestro estudio. Esto indicaría que posiblemente existen medidas de control de contaminación por hongos potencialmente toxigénicos por parte de las empresas de alimentación.

**Figura 1.** Distribución de hongos filamentosos potencialmente toxigénicos en el total de muestras analizadas.

Se debe destacar que aunque la presencia de estos hongos filamentosos no necesariamente indica la presencia de micotoxina, si existe la posibilidad de que alguna de las muestras la presentase, por lo que el consumo al menos de las muestras positivas al desarrollo de hongos filamentosos puede generar algún riesgo para la salud del animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Bryden, W. L. 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16(Suppl 1), 95-101.
- Campbell, A. W., Thrasher, J. D., Gray, M. R., Vojdani, A. 2004. Mold and mycotoxins: effects on the neurological and immune systems in humans. *Advances in Applied Microbiology*, 55: 375-406.
- FAO/OMS. 2007. El impacto de los piensos en la inocuidad de alimentos. Informe de la reunión conjunta FAO/OMS de expertos. Roma.
- González-Pereyra, M. L., Pereyra, C. M., Ramírez, M. L., Rosa, C. D. R., Dalcerro, A. M., Cavaglieri, L. R. 2008. Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 46(5):555-561.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology letters*, 122(2):179-188.
- Lanier, C., Heutte, N., Richard, E., Bouchart, V., Lebaillly, P., & Garon, D. 2009. Mycoflora and mycotoxin production in oilseed cakes during farm storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4):1640-1645.
- Mngadi, P. T., Govinden, R., Odhav, B. 2008. Co-occurring mycotoxins in animal feeds. *African Journal of Biotechnology*, 7(13):2239-2243.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebaillly, P., Garon, D. 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12):2420-2425.
- Rosa, C. A. R., Keller, K. M., Keller, L. A. M., González Pereyra, M. L., Pereyra, C. M., Dalcerro, A. M., Lopes, C. W. G. 2009. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon*, 53(2):283-288.
- Zain, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2):129-14.

Evaluación de la microbiota de leche de yegua: aislamiento de cepas potencialmente probióticas

Gisela Girmé, Lucía Pérez, E. Leonardo Arosemena, Eduardo Grau y M. Ángeles Calvo

Grupo de Investigación en Microbiología Aplicada y Medioambiental. Departamento de Sanidad y Anatomía Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, España. gisela.girme@gmail.com

Desde la antigüedad se ha reconocido a la leche de yegua como un alimento natural, siendo considerada como fuente de rejuvenecimiento. La comunidad científica reconoce la leche de yegua como la leche más parecida a la leche materna humana. En ellas, prácticamente coinciden las proporciones de proteínas, de lactosa, de minerales y de microelementos. El objetivo principal de esta investigación es la evaluación de la microbiota presente en la leche de yeguas. Para el desarrollo de este objetivo se realizaron siembras en diferentes medios de cultivo y las cepas desarrolladas fueron aisladas e identificadas a nivel de género y especie. De las muestras analizadas se han obtenido: diecinueve cepas de morfología bacilar, tres cepas de morfología de cocobacilos, cuarenta y una cepas de cocos y nueve cepas de levaduras. A partir de los resultados obtenidos en este estudio podemos aportar que la microbiota habitual de la leche de yegua está constituida por bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* identificadas como: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* y cepas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Asimismo se han aislado cepas de levaduras identificadas como: *Candida krusei*, *Candida sphaerica*, *Candida lusitanae*, *Candida famata* y *Candida guilliermondii*. A partir de las cepas de bacterias lácticas aisladas se han llevado a cabo estudios para evaluar su posible capacidad como probióticas, seleccionando dos cepas que cumplen los requisitos para poder ser consideradas y utilizadas con tal fin.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las bacterias ácido lácticas presentan un gran potencial biotecnológico, dada su presencia en una serie de productos fermentados destinados al consumo humano (productos lácteos, vegetales, cárnicos, bebidas alcohólicas, etc.) y animal (ensilados), que contribuye al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, y genera ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagónica. Asimismo, se ha podido comprobar que estos microorganismos ejercen efectos beneficiosos mejorando la salud y previniendo enfermedades, tanto en el hombre como en los animales (Reid, 2008).

Este grupo bacteriano se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, asociado tanto a células vegetales, como al tracto intestinal, a la leche, a fosas nasofaríngeas o a la vagina, de diversas especies animales, incluyendo al hombre.

Desde la antigüedad se reconoce la leche de yegua como alimento y medicina natural, siendo considerada una fuente de rejuvenecimiento. Actualmente se trabaja con métodos científicos, aprovechando sus cualidades curativas y regeneradoras.

En la literatura científica se cita su favorable influencia en el tratamiento de enfermedades de la musculatura lisa, del miocardio, de la mucosa gastrointestinal, de las glándulas hormonales, así

como las que afectan al sistema nervioso central. Su aplicación en el terreno profiláctico y terapéutico tiene un espectro muy amplio: en trastornos hepáticos y gastrointestinales, sobre todo en inflamaciones crónicas de la mucosa estomacal, del duodeno o intestino grueso, en diarreas y estreñimientos, debilidades pancreáticas, etc.

Este trabajo se inició con objeto de aislar cepas potencialmente probióticas de leche de yegua.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Las muestras obtenidas para el desarrollo de esta investigación proceden de explotaciones de Catalunya. Las muestras se obtuvieron de heces y leche de yeguas y de heces de potrillos que presentaban un buen estado de salud. Estas muestras se conservaron en botes estériles que, manteniendo la cadena de frío, se trasladaron al laboratorio para ser procesadas. Se han analizado un total de 33 muestras.

Aislamiento e identificación de hongos filamentosos. Las muestras fueron resuspendidas en solución de Ringer en proporción 1:9. Para estos análisis se aplicaron protocolos establecidos por el grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Medio-ambiental del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, que incluye la evaluación de la actividad hemolítica de las cepas lácticas que se aíslan así como el estudio de su sensibilidad a antibióticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del desarrollo de microorganismos en los diferentes medios de cultivos se obtuvo crecimiento positivo expresado en porcentajes en los siguientes medios de cultivos: MRS incubado en condiciones de aerobiosis 87,87% (29/33), MRS incubado en condiciones de microaerofilia 90,90% (21/33), MRS anaerobiosis 63,63% (30/33), Triptona Soja Agar 96,96% (32/33), Mac Conkey incubado a 37°C 45,45% (15/33), Mac Conkey incubado a 42°C 33,33% (11/33), Agar Sangre 100% (33/33), Agar Baird Parker 45,45% (15/33), Agar Sabouraud 30,30% (10/33), Medio para bacterias anaeróbicas 30,30% (10/33). Identificándose principalmente morfologías tales como: bacilos, cocobacilos, cocos y levaduras.

Los microorganismos desarrollados en estos medios de cultivo no presentaban características de microorganismos patógenos o problemáticos que afecten el estado sanitario de los caballos.

Se aislaron diecinueve cepas con morfología bacilar, Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas; de ellas, un 10,52% (2/19) dieron como resultado γ - Hemolisis, un 63,15% (12/19) α -Hemolisis y un 26,31% (5/19) β - Hemólisis. De acuerdo a estos resultados podemos identificar a estas cepas dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas; de ellas, se identificaron 18 cepas a nivel de especie: cinco especies fueron identificadas como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, dos cepas fueron identificadas como *Lactobacillus brevis*, nueve cepas como *Lactobacillus plantarum*, una cepa como *Lactobacillus salivarius*, y una cepa identificada como *Leuconostoc mesenteroides*.

Asimismo podemos ratificar, por los resultados obtenidos, la transferencia bacteriana de la madre al hijo, corroborada con la presencia de las mismas cepas tanto en la leche materna de yegua como en la las heces de sus respectivos potrillos.

A partir de las muestras analizadas se aislaron nueve cepas identificadas como levaduras y compatibles con: *Candida krusei*, *Candida sphaerica*, *Candida lusitaniae*, *Candida famata* y *Candida guilliermondii*.

De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de esta investigación, y siguiendo las directrices postuladas por Adelantado (2007), Rodríguez (2009) y Pérez (2011), se han seleccionado dos cepas: una aislada de leche de yegua, cepa Ly-1, y otra de heces de potrillo, cepa Ly-2.

Las dos cepas fueron aisladas de Agar MRS, desarrollándose en condiciones de aerobiosis y microaerofilia (con un 5% de CO₂) a 37°C durante 24 horas de incubación. Las pruebas morfológicas nos

describen a estas cepas como bacilos Gram positivos, y de acuerdo a las características de las BAL podemos señalar que las dos cepas son catalasa negativa, no formadores de esporas, cumpliendo con las primeras premisas pre-establecidas para su selección. Presentaron γ - Hemolisis y capacidad antimicrobiana frente a cepas patógenas.

Los resultados obtenidos confirmaron que las dos cepas pertenecían al género *Lactobacillus*, concretamente: *Lactobacillus brevis*.

Con el fin de mantener las cepas seleccionadas se procedió a su liofilización y posteriormente al estudio de su viabilidad a lo largo de cinco meses. Los resultados obtenidos resultaron satisfactorios, ya que la bacterias ácido lácticas se mantuvieron viables durante los cinco meses de estudio, identificándose en cada muestreo la especie *Lactobacillus brevis*, desarrollada en medio MRS en condiciones de microaerofilia, manteniéndose con una concentración bacteriana del orden 10³ UFC/mL.

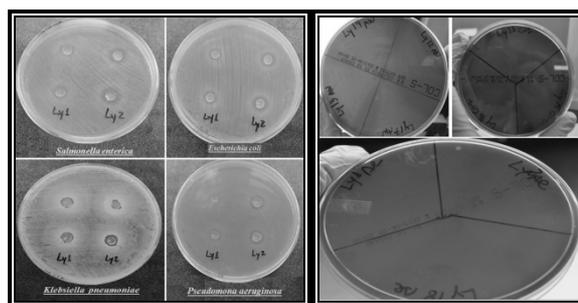


Figura 1. Actividad inhibidora y estudio de la capacidad hemolítica de las cepas evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adelantado, C. 2007. Proposta de metodologia per l'avaluació del potencial probiòtic de soques de *Lactobacillus* aïllades de substrats naturals. Tesis doctoral. UAB. 185 pp.
- Pérez, L. 2011. Evaluación de nuevas cepas probióticas. Efectos sobre micotoxina y en Helicicultura. Tesis doctoral. UAB. 195pp.
- Reid, G. 2008. How Science will help shape future clinical applications of probiotics. *Clinical Infections Diseases*, 46: 625-665
- Rodríguez, M. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladoras. Tesis doctoral. UAB. 199 pp.

Innovación y desafíos para la higiene en las industrias alimentarias

Ramón Bertó¹, Enrique Orihuel¹, Fernando Lorenzo¹, Alma Milvaques¹

¹ *Betelgeux, S.L. Gandia (Valencia), España, betelgeux@betelgeux.es*

El mantenimiento de las condiciones higiénicas de las instalaciones en las que se manipulan alimentos es un proceso fundamental para asegurar la calidad y seguridad de los mismos. Las industrias alimentarias operan en un entorno fuertemente competitivo que supone que deben responder rápidamente a las distintas presiones del mercado: reducción de costes, minimización del impacto medioambiental, legislación cambiante, etc. Estas necesidades cambiantes afectan a la manera de enfocar la gestión de los procesos de higiene en las instalaciones y el control de la contaminación microbiológica. La industria alimentaria demanda procesos más eficientes y respetuosos con el medio ambiente, así como herramientas de control microbiológico más rápidas y precisas, sin comprometer la eficacia de los procedimientos de mantenimiento de la higiene. Esto requiere un esfuerzo constante por parte de las empresas proveedoras de soluciones de higiene para adaptarse a estas necesidades y anticiparse a futuras demandas del sector. La innovación en el control de la higiene pasa por adoptar una visión global e integradora de los múltiples factores que afectan a la seguridad alimentaria, desde el diseño de las instalaciones hasta los productos empleados para controlar la contaminación microbiológica y sus vías de diseminación. La eficiencia de las operaciones y el uso racional de recursos energéticos y materiales garantizan la sostenibilidad de los procedimientos de control de la higiene. Estos factores suponen un elemento fundamental de la innovación aplicada a los procesos de higiene en la industria y requieren la personalización de los mismos a las características particulares y necesidades de cada industria. Betelgeux trabaja de forma continua en la mejora de los procedimientos de higiene en las industrias alimentarias, y participa en diversos proyectos de desarrollo de nuevas tecnologías para el control de biofilms, detección rápida de patógenos, monitorización del grado de limpieza, etc. El desarrollo de nuevos productos y soluciones para la mejora de la higiene en las industrias alimentarias permite avanzar en la consecución del objetivo común de la seguridad de los alimentos

INTRODUCCIÓN

Las operaciones de limpieza y desinfección constituyen un proceso fundamental en la industria en general y en la industria alimentaria en particular. En este tipo de industrias es importante la implantación de un programa adecuado de limpieza y desinfección orientado a dos objetivos fundamentales:

- Mantenimiento del equipo y las instalaciones
- Defensa de la marca frente problemas de seguridad alimentaria y de conservación y calidad de los alimentos

Las operaciones de limpieza y desinfección deben ser efectivas para la consecución de estos objetivos, pero además deben ser eficientes desde dos puntos de vista:

a) Contaminación química y microbiológica

Los protocolos de limpieza y desinfección deben incluir productos y prácticas que resulten eficaces en la eliminación de focos de crecimiento de contaminación, especialmente en el caso de la contaminación microbiológica. En este aspecto, los problemas recurrentes más comunes son la formación de biofilms y de puntos negros que puedan servir de foco de contaminaciones persistentes, así como un diseño inadecuado de los equipos y de las instalaciones que dé lugar a zonas de difícil acceso que no se limpien de forma adecuada.

b) Utilización de recursos

Las operaciones de limpieza y desinfección suelen consumir grandes cantidades de recursos humanos y económicos (productos, agua, calor, etc.). De esta manera, los principales factores que se deben optimizar en estos procedimientos son aquellos encaminados a mejorar la eficiencia de los procesos: reducción de consumos, automatización de tareas, disminución de vertidos, productos con menor impacto medioambiental, etc.

La industria alimentaria es particularmente sensible a la prevención de la contaminación, especialmente de tipo microbiológico, en sus instalaciones, debido al riesgo que puede suponer para la población la comercialización de alimentos contaminados.

Las toxiinfecciones alimentarias son enfermedades producidas por la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos patógenos o sus toxinas y representan un porcentaje significativo de los brotes epidémicos que afectan a la población general. Por esta razón las industrias alimentarias están sometidas a estrictos controles durante la transformación y alimentación de alimentos para proteger a los consumidores frente a este tipo de enfermedades

Así, las operaciones de limpieza y desinfección están integradas en el proceso de producción en este tipo de industrias, realizándose con una alta frecuencia

(generalmente a diario) y constituyendo una parte importante del gasto en industria. Asimismo, la industria alimentaria está expuesta a circunstancias cambiantes que pueden afectar a sus necesidades en materia de higiene: aparición de nuevos patógenos, nuevos requisitos normativos, nuevos procesos productivos, etc.

RETOS E INNOVACIÓN EN HIGIENE

La innovación en los procesos de limpieza y desinfección pasa por desarrollar nuevas soluciones a los retos a los que se enfrenta la industria alimentaria. Asimismo, es necesario desarrollar una visión global de la higiene en la que se consideren los múltiples factores implicados en la seguridad alimentaria y sus posibles interacciones. Sólo mediante una gestión integral de los procesos de higiene es posible desarrollar soluciones eficaces a las necesidades de higiene de la industria alimentaria.

Por esta razón, la innovación en materia de higiene debe abarcar los distintos factores que pueden afectar al grado de higiene presente en las instalaciones. Algunas de las vías de innovación más importantes en este campo son las descritas a continuación.

Control de la contaminación microbiológica

La presencia de contaminación microbiológica en superficies en contacto con los alimentos es la principal causa de deterioro del producto y de riesgo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. El control adecuado de este tipo de contaminación pasa por la utilización de detergentes que limpien de forma adecuada las instalaciones antes de la aplicación de desinfectantes y del uso de productos biocidas eficaces frente a los patógenos que puedan estar presentes.

Dentro del control de la contaminación microbiana juega un papel fundamental el disponer de técnicas para la detección de patógenos. Las necesidades de la industria alimentaria demandan técnicas rápidas, fiables y baratas para la detección de patógenos, de manera que este aspecto es una vía de innovación muy importante para los proveedores de soluciones de higiene industrial.

Prevención de patógenos persistentes

Uno de los retos importantes a los que se enfrenta la industria alimentaria es la prevención de la formación de contaminaciones microbiológicas persistentes, formadas por microorganismos patógenos que han desarrollado resistencia a los desinfectantes habitualmente empleados.

Este tipo de contaminación ocurre principalmente cuando los procesos de higiene y desarrollo son deficientes, bien porque no se utilizan los productos adecuados o bien porque las operaciones de limpieza y desinfección no se realizan de la forma adecuada.

Estas deficiencias pueden dar lugar a la formación de puntos negros y de biofilms que actúen de reservorios de microorganismos causantes de contaminaciones persistentes.

Para evitar este tipo de contaminación, es necesario adaptar los protocolos de higiene a las necesidades específicas de cada industria y de sus instalaciones, haciendo especial hincapié en el diseño de las instalaciones y el control de las operaciones de limpieza y desinfección.

Reducción del impacto medioambiental

Las operaciones de mantenimiento de la higiene suponen un elevado consumo de agua y recursos energéticos, así como un considerable volumen de vertidos. Todo ello implica un gran coste económico para la industria así como un impacto sobre el medio ambiente de estas operaciones. Por estas razones, es necesario desarrollar nuevas tecnologías y aplicaciones, así como orientar las operaciones de limpieza y desinfección, hacia una utilización más eficiente de los recursos naturales y una minimización del impacto medioambiental.

De esta manera, se pretende que las operaciones de limpieza y desinfección de las instalaciones contribuyan a la mejora de la sostenibilidad de la industria alimentaria, con medidas destinadas al ahorro de agua y de recursos energéticos manteniendo los niveles necesarios de seguridad alimentaria.

Mejora de productos

Otra vía importante vía de innovación en soluciones para la higiene en la industria es el desarrollo de productos que respondan a las cambiantes necesidades de este tipo de industria. Así, estas industrias se ven presionadas a utilizar productos más inocuos y respetuosos con el medio ambiente, y con un coste inferior debido a la reducción de los márgenes de beneficios.

Los productos empleados se pueden optimizar mediante el uso de técnicas de modelización y simulación de procesos de limpieza, así como métodos para la evaluación de la capacidad detergente de los productos, que permitan desarrollar fórmulas óptimas en términos de coste y eficacia.

CONCLUSIONES

Las operaciones de limpieza y desinfección constituyen un proceso fundamental en las industrias alimentarias. Las necesidades en materia de higiene cambian y es necesario desarrollar soluciones que se adapten a estas necesidades. La innovación en limpieza y desinfección en la industria debe considerar todos los aspectos implicados en la higiene de forma global y avanzar en distintas líneas de innovación que proporcionen las soluciones necesarias.

Estudio de la descontaminación superficial de la flora natural del salmón.

Selene Pedrós¹, J. Meade¹, J. Lyng², D. Bolton³, J. Fagan, N. Brunton² y Paul Whyte^{1*}.

¹ School of Veterinary Medicine, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland, pedgarsel@gmail.com

² School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland,

³ Teagasc Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland.

El pescado es un producto que posee una corta vida útil debido, principalmente, a que se producen alteraciones de origen enzimático y microbiano. Por tanto, tratar de ralentizar su descomposición se ha convertido en una prioridad para la industria de procesado y distribución de pescado. El uso de nuevas tecnologías para la descontaminación superficial podría suponer un avance en la extensión de la vida útil del pescado fresco, sin que se llegase a alterar su calidad. En el presente estudio se evaluó el efecto de la luz UV-C sobre la carga microbiana natural del salmón (*Salmo salar*). Los niveles de inactivación para los distintos grupos bacterianos fueron similares; no obstante, el grupo de *Pseudomonas* fue el que mostró niveles de inactivación menores (0,8 Log UFC/g). La eficacia bactericida de los tratamientos resultó dependiente de la fluencia de luz UV-C y del tiempo de tratamiento. Un aumento de la fluencia de 25 a 100 mJ/cm² permitió aumentar tres veces aproximadamente los ciclos de inactivación conseguidos, aunque fluencias mayores no mejoraron significativamente la letalidad del proceso.

INTRODUCCIÓN

El pescado es un producto altamente perecedero ya que desde el momento de la captura comienzan a producirse rápidamente cambios que afectan a su calidad y seguridad. Los responsables de dicho deterioro son principalmente los enzimas y microorganismos presentes de forma natural en la piel y el sistema digestivo de los peces que una vez que han muerto comienzan a actuar sobre los tejidos, iniciando una serie de reacciones que conllevan la degradación del músculo y la disminución de la calidad.

Dentro de los diversos grupos bacterianos que presenta el pescado de forma natural, destacan los organismos específicos del deterioro o SSO (*specific spoilage organisms*), cuyo crecimiento dependerá de diversos factores entre los que destacan: las condiciones de almacenamiento, la temperatura y el origen del pescado. Los SSO incluyen varias especies microbianas y son principalmente: *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Photobacterium phosphoreum* y bacterias ácido lácticas (LAB).

La búsqueda de nuevas estrategias tecnológicas para la reducción de la carga microbiana del pescado permitiría extender la vida útil del producto, lo que resultaría interesante para proveer al consumidor de pescado fresco organolépticamente aceptable y microbiológicamente seguro (Cheigh y col., 2013).

En el presente estudio se investigó el efecto de la irradiación con luz ultravioleta sobre los distintos grupos microbianos presentes en el salmón fresco, así como el efecto de la fluencia total (mJ/cm²) y el tiempo de tratamiento en la eficacia bactericida del proceso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación y tratamiento de las muestras. El salmón (*Salmo salar*) fresco fileteado y refrigerado se adquirió en un supermercado local. Tras su adquisición fue cortado asépticamente en fragmentos de 8cm x 2cm x 1cm (largo x ancho x grosor), que se introdujeron individualmente en placas Petri estériles para su posterior tratamiento. La irradiación se aplicó por ambas caras, por duplicado. Las muestras permanecieron en refrigeración en todo momento, hasta la aplicación de los tratamientos, tras los cuales se cubrían con papel de aluminio para evitar la fotorreactivación (Lasagabaster y col, 2014).

Equipo UV-C. El equipo de ultravioleta era una unidad hecha a medida, con unas dimensiones internas de 790 x 390 x 345 mm (largo x ancho x alto), que consta de 4 tubos de 95 W (Baro Applied Technology Limited, Manchester UK) de 500 mm de longitud. Se realizó una caracterización inicial de la irradiancia en el centro de la cámara, lugar donde se aplicaron los tratamientos (Tabla 1). La dosis de UV se calculó multiplicando la fluencia a 254 nanómetros por el tiempo de tratamiento, con la ecuación: $D = I_{254} \times t$. La intensidad de los tratamientos se reguló modificando los tiempos de irradiación y la distancia al foco emisor.

Aislamiento y cultivos microbianos. Tras el tratamiento, 9 g del pescado se pasaron asépticamente a una bolsa de Stomacher y se le añadieron 90 ml de MRD (MRD, Oxoid). La mezcla se homogeneizó durante 1 minuto. A continuación se realizaron las diluciones oportunas en MRD y se sembraron, por duplicado, en diferentes medios de cultivo para cada grupo microbiano, a diferentes temperaturas. A 30°C - 48 h: Aerobios mesófilos totales (PCA + 1% NaCl, Oxoid), Enterobacteriaceae (VRBGA, Oxoid) y bacterias ácido lácticas (MRS, Oxoid), estas últimas incubadas en anaerobiosis. A 25°C - 48 h: *Pseudomonas* spp. (CFC, Oxoid). A 6,5°C - 7 días: *Photobacterium Phosphoreum* y Psicrótrofos aerobios totales (LH medium, Broekaert y col., 2011).

Análisis instrumental del color. Se determinaron los parámetros CIE L* a* b*, con un espectrofotómetro de reflectancia (Konica Minolta Co. Ltd., Ramsey, NJ).

Control de la temperatura de superficie. Se utilizó un termómetro infrarrojo (RS, 1327 K, Taiwan), diseñado para medidas a distancia.

Análisis estadístico de los datos. Se realizó con el programa SPSS Statistics 21.0.

Tabla 1: Dosis de UV-C (mJ/cm²) recibida por las muestras a diferentes tiempos de tratamiento y distancias de la fuente.

Dosis UV-C por tiempo de tratamiento (mJ/cm ²)								
Distancia (cm)	5	10	15	20	30	45	60	90
26	-	-	47,8	-	95,6	143,4	191,2	286,8
16	19,0	38,1	57,2	76,3	114,5	-	-	-
6	21,2	42,4	63,6	84,8	127,2	190,8	-	-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los tratamientos la temperatura de las muestras no superó los 30°C. En ensayos previos al estudio de inactivación, los parámetros de color estudiados no presentaron diferencias a lo largo de los tiempos de tratamiento probados (máximo 300 segundos).

Estudio de la inactivación de la flora superficial natural del salmón.

El estudio de la inactivación de las diferentes especies microbianas se llevó a cabo a una distancia de 26 cm de las lámparas. Tal como se muestra en la Figura 1, el máximo efecto antimicrobiano del UV-C se consiguió entorno a los 30 segundos de tratamiento en la mayoría de los microorganismos estudiados. Sin embargo, las resistencias fueron diferentes: el grupo de *Pseudomonas* spp. resultó el más resistente, consiguiéndose una inactivación máxima de 0,8 ciclos logarítmicos, y *Photobacterium phosphoreum* el más sensible, logrando una reducción de 1,6 Log UFC/g.

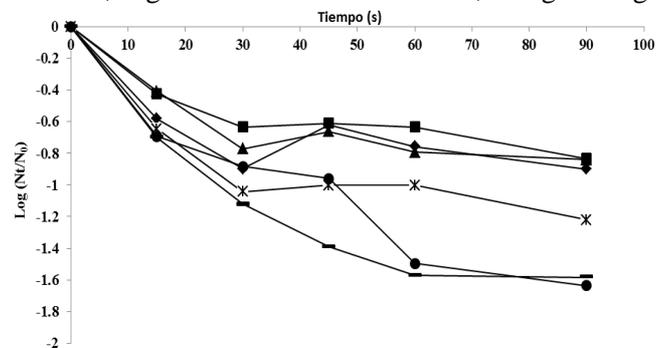


Figura 1: Fracción de supervivientes tras el tratamiento con UV-C de: (■) *Pseudomonas* spp., (▲) Enterobacteriaceae, (◆) Mesófilos totales, (x) Ácido lácticas, (●) Psicrótrofos, (-) *Photobacterium p.*

Efecto del tiempo y la distancia en la descontaminación superficial del salmón.

En el experimento anterior se observó que el grupo de *Pseudomonas* era el más resistente y por ello se tomó como referencia para el estudio del efecto de la distancia al foco de irradiación. Las dosis aplicadas se muestran en la tabla 1.

Como se observa en la Figura 2, las muestras irradiadas a 6 cm y 16 cm mostraron la misma reducción de *Pseudomonas*, que resultó sensiblemente superior a la observada en la irradiada a 26 cm.

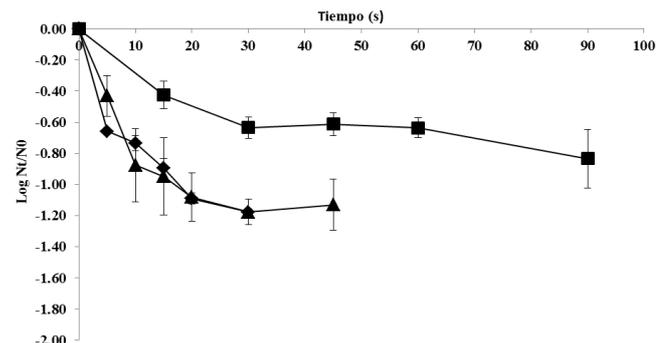


Figura 2: Inactivación de *Pseudomonas* a lo largo del tiempo a (■) 26 cm, (◆) 16 cm y (▲) 6 cm. Las barras de error representan ± SD.

Este efecto se debe principalmente a la fluencia total (mJ/cm²) recibida por las muestras. La Figura 3 muestra la relación entre la fluencia y el efecto bactericida del tratamiento. Tal como se aprecia, la inactivación aumenta linealmente hasta un máximo, a partir del cual esta no incrementa más.

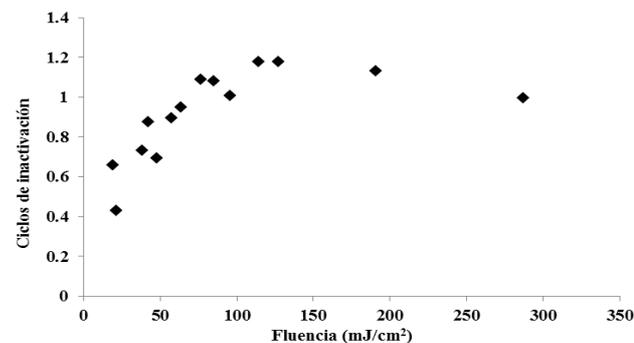


Figura 3 Efecto de la fluencia en la inactivación de *Pseudomonas*.

BIBLIOGRAFÍA

Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F., Vlaemynck, G. (2011). Seafood quality analysis: molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food mic*, 28: 1162-1169.

Cheigh, C., Hwang, H., Chung, M. (2013). Intense pulsed light (IPL) and UV-C treatments for inactivating *Listeria monocytogenes* on solid medium and seafoods. *Food research international*, 54: 745-752.

Lasagabaster, A., Martínez de Marañón, I. Survival and growth of *Listeria innocua* treated by pulsed light technology: impact of post-treatment temperature and illumination. *Food microbiology*, 41: 76-81.

Predicción de la vida útil de buey de mar (*Cancer pagurus*) pasteurizado a 75°C según las normas recomendadas por la FDA

Santiago Condon-Abanto, Federico Lian, C. Arroyo, N. Brunton, P. Whyte y J.G. Lyng

School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Ireland. Santiago.condon-abanto@ucdconnect.ie

El buey de mar (*Cancer pagurus*) es un marisco muy apreciado en los países europeos y los productos procesados, refrigerados y de larga vida útil (REPFED, en el mundo anglosajón) derivados de él, son considerados los de mayor proyección a medio plazo. En esta investigación se determina el tiempo de procesado a 75 °C necesario para aplicar un $F_{70}^{7.5}$ de 2 minutos y se estudia la vida útil del producto almacenado a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos demuestran que el tiempo de vida útil del producto almacenado a 4 °C son 13 días y que este tiempo se reduce 1,71 veces al aumentar 6 °C la temperatura de almacenamiento.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el buey de mar se ha comercializado siempre vivo aunque actualmente se considera que no es el método más adecuado para la exportación. Por ello, desde hace algunos años, las industrias especializadas han optado por desarrollar nuevos productos y diseñar nuevos procesos que garanticen una prolongada vida útil del producto alterando mínimamente la calidad. En la actualidad Irlanda, con unas capturas de en torno a 11.000 toneladas anuales de buey de mar, es el segundo mayor productor europeo de este tipo de productos cuyas exportaciones pretende aumentar en competencia directa con Francia. Esta investigación se encuadra en un proyecto patrocinado por una empresa irlandesa que pretende mejorar la posición de sus productos en el mercado.

Uno de los tratamientos recomendados para el procesado de los alimentos REPFED (productos procesados, refrigerados y de larga vida útil) es una pasteurización con una eficacia letal equivalente a 70 °C durante 2 min en el centro del producto, asumiendo un valor Z de 7,5 °C. Con esta pasteurización la FDA establece una vida útil del producto de no más de 10 días cuando se almacena por debajo de 5 °C, 5 días cuando se almacena entre 5 y 7 °C y menos de 5 días cuando se almacena por encima de 7 °C.

El objetivo de esta investigación ha sido aplicar la pasteurización recomendada por la FDA a los bueyes de mar y comprobar la vida útil del producto a distintas temperaturas de almacenamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aplicación del tratamiento térmico. Puesto que la penetración de calor en el buey de mar, dada su forma y tamaño, es poco eficiente, fue preciso establecer el tiempo de procesado necesario para garantizar la aplicación de un $F_{70}^{7.5}$ de 2 min en el centro térmico del producto. Para ello se colocaron 4 sondas termopar (picolog) en distintas zonas

del buey de mar y se determinó el centro térmico. Posteriormente, se registro la evolución de la temperatura en el centro térmico al sumergir los cangrejos en un baño de tratamiento (Guyson KS MK3 525) de 55 litros de capacidad estabilizado a distintas temperaturas: 70, 80 y 90 °C. Representando el logaritmo de la variable térmica frente al tiempo de calentamiento se obtuvieron los parámetros de la ecuación de Ball y Olson (Ball y Olson 1957) que nos permite predecir la gráfica de penetración de calor cualquiera que sea la temperatura de régimen. Con la ecuación se calculó el tiempo de tratamiento que sería necesario aplicar en el baño de tratamiento, previamente atemperado a 75 °C para conseguir la eficacia letal deseada.

Preparación y almacenamiento de las muestras. Los cangrejos tratados a 75 °C, durante 45 minutos se extrajeron del baño, se abrió el caparazón, se retiró el contenido en condiciones asépticas y se colocaron muestras de 5 g en bolsas que posteriormente se envasaron a vacío (Webo C10H modelo 0210DC681; Irlanda). Las bolsas se incubaron a 4, 7 y 10 °C hasta su uso.

Análisis microbiológico de las muestras. Periódicamente se extrajeron muestras de las estufas y, tras la apertura aséptica de las bolsas, se procedió a la evaluación de la carga microbiana. Los 5 g de muestra se diluyeron en 45 mL de "Maxium Recovery Diluent" (MRD, Oxoid UK) y se homogeneizaron en un stomacher (Mod. 400, Seward laboratory system, UK) durante 2 min a 300 rpm. Tras diluir las muestras en MRD se sembraron por homogenización en masa en los medios adecuados y se incubaron los tiempos y temperaturas prescritos (PCA, 10 °C, 5-7 días; agar Lyngby, 30 °C, 24-48 horas; agar pseudomonas, 30 °C 24-48 horas). Los resultados se expresaron como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (logUFC/g).

Modelización de las curvas de crecimiento. Para la modelización matemática de las curvas de crecimientos, se utilizó la ecuación de Gompertz modificada por Zwietering (1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelización de la penetración de calor y cálculo del tratamiento.

Las figura 1 muestra la relación entre la variable térmica y el tiempo de tratamiento de los bueyes de

mar sumergidos en baños a distintas temperaturas. A partir de la recta de regresión y asumiendo las peores condiciones se obtuvieron los valores fh (47) y j (1,46) utilizados como parámetros de referencia en la ecuación de Ball y Olson para predicciones posteriores.

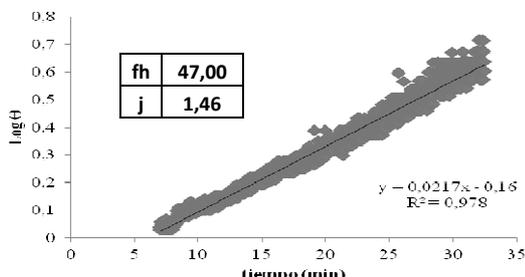


Figura 1: Relación entre la variable térmica y el tiempo de tratamiento de bueyes de mar sumergidos en un baño termostático a diferentes temperaturas.

A partir de la ecuación de Ball y Olson ($\text{Log } \Theta = 1/fh * t - \text{log } j$) se dedujo la curva de penetración de calor esperable en las condiciones finalmente elegidas (75 °C), que se incluye en la figura 2.

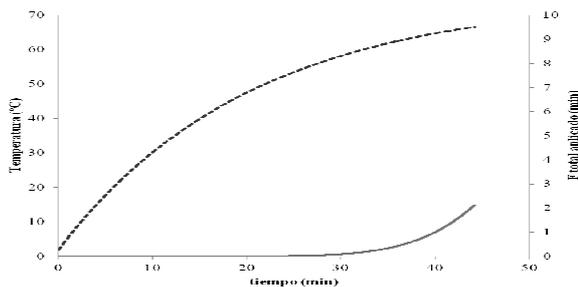


Figura 2: Curva de penetración de calor construida con la ecuación de Ball y Olson (línea punteada) y curva de eficacia letal estimada (línea continua).

La figura 2 muestra también la curva de eficacia letal acumulada (continua), a partir de la cual se dedujo que el tiempo de procesado a aplicar eran 45 minutos.

Predicción de la vida útil del buey de mar pasteurizado.

La figura 3 muestra las curvas de crecimiento de la flora superviviente de los bueyes de mar pasteurizados almacenados a 4, 7 y 10 °C, evaluada en distintos medios de cultivo. Como se observa en las figuras, mientras que a 4 °C los recuentos específicos de psicrotrofos aumentan más rápidamente que los otros dos, en el producto almacenado a 7 y 10 °C no se observan diferencias.

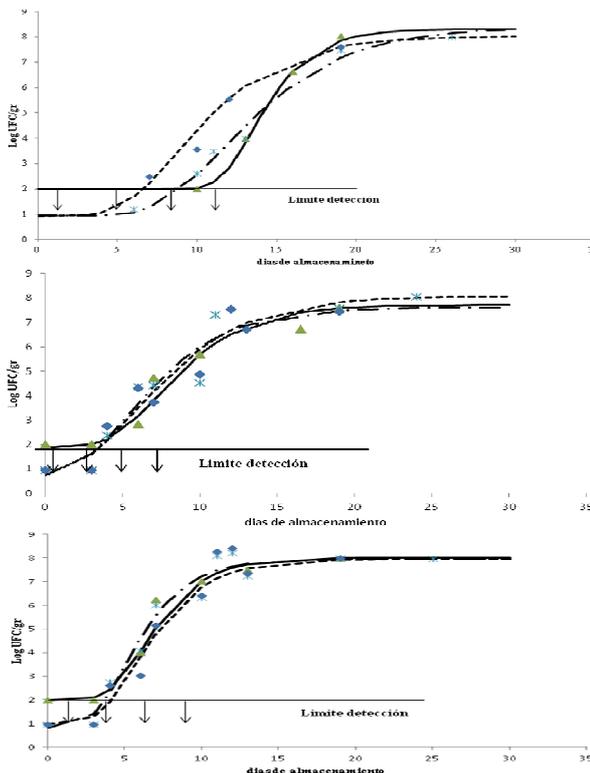


Figura 3: Curvas de crecimiento de psicrotrofos (línea discontinua), pseudomonas (línea continua) y aerobios mesófilos totales (línea punteada) en buey de mar pasteurizado y almacenado a 4, 7 y 10 °C.

Asumiendo que el producto se encuentra alterado al alcanzar un recuento de 10⁶ UFC/g, como sostiene la ICMSF (1986), y estimando el tiempo de vida útil a partir del ajuste de las curvas con la ecuación de Gompertz, llegamos a la ecuación:

Log₁₀ vida útil = 0.2702-0.0389*T

Esta ecuación permite calcular un tiempo de vida útil a 4 °C de 13 días y demuestra que la vida útil se reduce 1,74 veces al aumentar la temperatura de almacenamiento 6 °C.

BIBLIOGRAFÍA

M.H Zwietering, I Jongenberger, F.M Roumbouts, Kvan't Riet. 1990, Modelling of bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol., 56, pp. 1875–1881.
 FDA (2011). "Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, fourth ed. Technical Report. U.S .Department of Health and Human Services."
 ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).1986. Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto Press (2nd ed.). Blackwell Scientific Publications. Toronto.
 Ball, C.O. y F.C.W. Olson (1957) "Sterilization in food technology". McGraw-Hill. New York.

Selección de un antimicrobiano natural para la conservación del Potón del Pacífico (*Dosidicus gigas*)

Virginia Ruiz, Rocío Lahoz y Santiago Condón

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, España, virginia.ruizartiga@gmail.com

El potón del Pacífico (*Dosidicus gigas*) se degrada muy rápidamente, incluso en condiciones de refrigeración, debido a que la actividad microbiana genera productos que se incluyen en la fracción nitrogenada no proteica (NBVT). El NBVT aumenta rápidamente cuando el recuento microbiano sobrepasa los 10^6 UFC/mL. De los antimicrobianos naturales ensayados (carvacrol, citral, timol, alil-isotiocianato, y aceite esencial de limón), el alil-isotiocianato resultó el más eficaz a 30 °C, dado que presentaba una concentración mínima inhibitoria de entre 10 y 50 ppm y una concentración mínima letal de entre 100 y 500 ppm. Al disminuir la temperatura de incubación hasta los 10 °C la eficacia antimicrobiana del compuesto aumento, reduciéndose la CMI a menos de 10 ppm, aunque la CML se mantuvo en el rango de 100 a 500 ppm.

INTRODUCCIÓN

Dosidicus gigas es un cefalópodo cuyo consumo ha aumentado significativamente en los últimos años ya que puede utilizarse como sucedáneo del pulpo. La flora que predomina en este producto son bacterias Gram negativas psicrótrofas, capaces de crecer a gran velocidad incluso a temperaturas de refrigeración.

Uno de los cambios originados en el potón por el crecimiento microbiano es el aumento de nitrógeno básico volátil total (NBVT) (Gram y col., 2002; Karungi y col., 2004), considerado el principal responsable del olor desagradable de este producto (Debevere y col., 1995). El NBVT incluye, entre otros compuestos, amoníaco, monoetilamina, dimetilamina (DMA) y trimetilamina (TMA).

Para evitar la rápida alteración microbiológica del potón del Pacífico suelen utilizarse desinfectantes tradicionales diversos. Sin embargo, cada vez es más patente el rechazo de los consumidores a este tipo de compuestos químicos y existe una tendencia creciente a intentar sustituirlos por antimicrobianos “naturales”. Lo antimicrobianos naturales deben su efecto a la presencia de algunos compuestos activos como fenoles, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres e hidrocarburos (Tajkarimi y col., 2010).

El objetivo de esta investigación fue determinar la eficacia bacteriostática/bactericida, sobre la flora natural del potón, de distintos antimicrobianos “naturales”: carvacrol, citral, timol, alil-isotiocianato y aceite esencial de limón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron rejos (tentáculos) de potón elaborados en la empresa Zarafish. El NBVT se cuantificó añadiendo a la muestra ácido perclórico al 6% (Panreac, Barcelona, España) en proporción 1:9, homogeneizando en stomacher (mod. 400 CIRCULATOR, SEWARD, Worthing, Reino Unido)

durante 4 minutos a 260 rpm y destilando 2 ml del homogeneizado, en un equipo diseñado al efecto (mod. UDK 130 D, VELP SCIENTIFICA, Usmate, Italia), con 10 ml de NaOH (Panreac) al 20% y 20 ml de agua destilada, durante 3 minutos. El destilado se recogió con 20 ml de una solución de ácido bórico (Panreac) al 6%, y se valoró con HCl (Panreac) 0.01N. El NBVT se calculó con la ecuación:

$$NBVT \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{v \cdot N \cdot 14 \cdot 5}{P} * 100$$

Donde: “v” es el volumen de HCl, “N” es la normalidad del HCl y “p” es el peso de la muestra.

Los compuestos antimicrobianos naturales utilizados en el estudio fueron: carvacrol 98% (Sigma–Aldrich Chemie, Alemania), citral 95% (Sigma–Aldrich Chemie), timol 99.5% (Sigma–Aldrich Chemie), que fue diluido con etanol 96% (VWR, International S.A.S., Francia) a concentración de 100 mg/ml, alil-isotiocianato 95% (Sigma–Aldrich Chemie) y aceite esencial de limón (suministrado por Indulleida S.A., España). Todos los antimicrobianos se diluyeron a diferentes concentraciones en caldo triptona soja (Oxoid, Inglaterra) enriquecido con un 0.6% (p/v) de extracto de levadura (Oxoid)(TSBYE). Las concentraciones utilizadas para la exploración fueron: 50.000 ppm, 10.000 ppm, 5.000 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm y 0 ppm de cada compuesto. Tras añadir la concentración deseada del antimicrobiano, el medio de cultivo se inoculó con una concentración de 10^6 UFC/mL de una mezcla de las tres especies aisladas del potón: *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp y *Serratia* spp. Los medios se incubaron a 30 °C y, cuando se indica, a 10 °C. A periodos de tiempo preestablecidos se realizó una lectura espectrofotométrica y se sembró en masa una alícuota de 0.1 mL en placas con agar triptona soja (Oxoid) enriquecido con un 0.6% de extracto de levadura (Oxoid)(TSAYE).

Se denominó concentración mínima inhibitoria (CMI) a aquella en la que tras 24 horas de incubación no se apreciaban aumentos de recuento; y concentración mínima letal (CML) a aquella en la que tras 24 horas de incubación se producía una reducción del recuento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la evolución del recuento microbiano y del contenido en nitrógeno básico volátil total en el producto fabricado por Zarafish y mantenido en refrigeración, a 4 °C, durante varios días. Como cabía esperar, ambos parámetros aumentan con el tiempo. Esta relación ha sido descrita previamente por algunos investigadores (Gram y col., 2002; Harungi y col., 2004)..

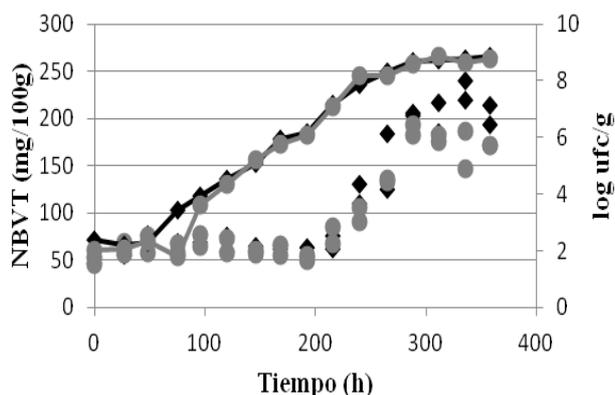


Figura 1: Evolución de NBVT y del recuento microbiológico de rejos de potón. ● NBVT, ▲- recuento microbiano

Como se aprecia en la figura 1, el contenido en NBVT se mantuvo constante durante aproximadamente 200 horas para luego aumentar rápidamente. Cabe destacar que el aumento rápido de NBVT se produjo cuando el recuento microbiano sobrepasó las 10^6 ufc/gr. De estos resultados se deduce que para prolongar la vida útil del potón será necesario mantener los recuentos tan bajos cuanto sea posible y siempre por debajo de ese valor.

Una forma de prolongar la vida útil del producto sería añadir antimicrobianos naturales, si bien es cierto que la mayoría de estos compuestos aportan sabores y olores anormales, en ocasiones desagradables. Es por ello importante que el compuesto seleccionado sea activo a muy baja concentración. Con objeto de seleccionar el antimicrobiano más eficaz para inhibir/destruir la flora natural del potón, determinamos las dosis mínimas inhibitorias y letales de cinco antimicrobianos ampliamente utilizados en estudios laboratoriales. En una primera fase los experimentos se realizaron a 30 °C para acelerar la obtención de los resultados.

Los datos de CMI y CML de cada compuesto se muestran en la tabla 1. Como se observa en la tabla, el citral y el aceite esencial de limón fueron muy poco eficaces para controlar el crecimiento de la flora del potón. El carvacrol y el timol resultaron, como era de esperar, mucho más eficaces que los anteriores, pero

el alil-isotiocianato resultó, todavía, diez veces más eficaz.

Tabla 1. CMI y CML, a 30 °C, de varios compuestos antimicrobianos sobre la flora natural del potón.

	CMI (ppm)	CML (ppm)
Carvacrol	100-500	100-500
Citral	500-10.000	10.000-50.000
Timol	100 - 500	100 - 500
Aceite limón	>50.000	>50.000
Alil-isotiocianato	10-50	100-500

Puesto que en la industria habitualmente se utilizan temperaturas de refrigeración en torno a los 4°C, aunque esporádicamente pueden alcanzarse hasta 10 °C, decidimos comprobar la eficacia del compuesto a esta última temperatura.

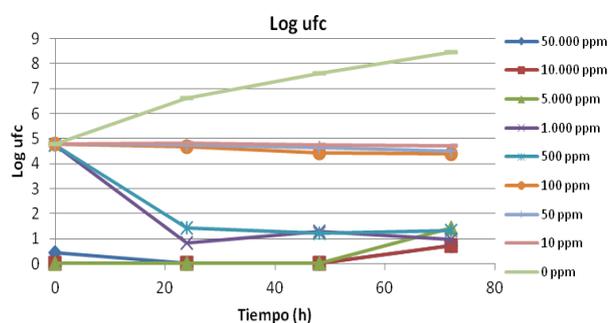


Figura 2. Evolución del logaritmo del recuento microbiano de distintas concentraciones de alil-isotiocianato inoculadas e incubadas a 10°C durante 72 horas.

Tal y como se observa en la figura 2, la concentración mínima inhibitoria (CMI) en este caso fue inferior a 10 ppm, aunque la mínima concentración letal se mantuvo entre 100 y 500 ppm del compuesto.

En conclusión, aunque todavía es necesario realizar experimentos para establecer la extensión de la vida útil que permitiría la adición de este compuesto y un análisis hedónico adecuado, nuestros resultados indican que la adición de alil-isotiocianato podría ser una alternativa factible para prolongar la vida útil del potón del Pacífico.

BIBLIOGRAFÍA

- Debevere J., Boshou G. 1996. Efect of modified atmosphere packaging on the TVA/TMA- producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology* 31. 221-229.
- Gram L., Dalgaard P. 2002. Fish spoilage bacteria –problems and solutions. *Environmental Biotechnology*. 262-266.
- Harungi C., Bayunhanga Y.B., Muyonga J.M. 2004. Effect of pre-icing duration on quality deterioration of iced Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* 85. 13-17.
- Tajkarimi M.M., Ibrahimi S.A., Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21. 1199-1218.
- Investigación financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20) y el Fondo Social Europeo.

Condiciones mínimas de cocción del potón del pacífico (*Dosidicus gigas*)

Virginia Ruiz, Rocio Lahoz y Santiago Condón

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, virginia.ruizartiga@gmail.com

Entre las especies utilizadas como sucedáneos del pulpo se encuentra *Dosidicus gigas*. Este cefalópodo presenta una estructura muscular compleja en la que se encuentran proteínas como la paramiosina que le confieren gran dureza natural. La cocción excesiva puede incluso aumentar esta dureza y producir considerables pérdidas de calidad por lo que es importante reducir su intensidad. Sin embargo, el tratamiento finalmente elegido siempre debe garantizar la salubridad y una vida útil adecuada del producto. El objeto de esta investigación fue determinar la termorresistencia de las especies mayoritarias del potón (*Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp* y *Serratia spp*) y establecer los parámetros mínimos de cocción desde un punto de vista microbiológico. La especie más termorresistente resultó ser *Pseudomonas spp*, y las condiciones mínimas de cocción: $\text{Log tiempo cocción} = 3,92 - 0,0482 T^{\circ}$.

INTRODUCCIÓN

Dosidicus gigas, coloquialmente denominado potón del pacífico o calamar gigante, es un cefalópodo procedente de Perú, México y Chile. Su consumo ha crecido mucho en esta década al usarse como sustituto de otras especies, como el pulpo, cuyo precio ha aumentado espectacularmente en los últimos años.

El proceso productivo de este calamar gigante presenta varias complicaciones, una de las cuales es su extremada dureza. Esta dureza natural se debe a la composición de su sistema muscular, que contiene paramiosina, una proteína que produce contracciones musculares sostenidas durante largos periodos de tiempo y que es propia de organismos poco evolucionados. Pero además, la dureza natural puede incluso aumentar si se aplica al producto una cocción inadecuada.

En el tratamiento térmico del potón se producen alteraciones de la funcionalidad de las proteínas, lo que trae como consecuencia una modificación de la textura y, lo que es peor, una pérdida de la capacidad de retención de agua, motivo por el que una cocción mal diseñada da lugar a productos duros y secos, de baja calidad. En estudios previos, realizados por Lahoz (2013), se demostró que la calidad mejoraba al reducir la temperatura de tratamiento actual (alrededor de 92 °C) y se estableció que las condiciones óptimas se encontraban entre 55 y 70°C durante 10 minutos.

Puesto que el tratamiento térmico tiene como finalidad, además de cocer el producto, garantizar su salubridad y prolongar la vida útil, surge la duda de cuáles serán los parámetros mínimos de cocción que es preciso aplicar. El objetivo de esta investigación fue cubrir esta laguna del conocimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron para el estudio los géneros microbianos mayoritarios aislados de potón del pacífico: *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Serratia*. Los cultivos se realizaron en caldo triptona soja (Oxoid, Inglaterra) enriquecido con un 0,6%

(p/v) de extracto de levadura (Oxoid) (TSBYE). La termorresistencia se determinó con un termorresistómetro TR-SC (Condón y col., 1993) utilizando agua destilada como medio de tratamiento. La recuperación de supervivientes se realizó sembrando en masa placas de agar triptona soja (Oxoid) con 0,6% de extracto de levadura (Oxoid) (TSAYE) e incubando durante 48 horas a 35°C. Las placas se contaron con un contador automático de colonias por análisis de imagen (Protos, Inglaterra). Las curvas de supervivencia se modelizaron con la ecuación de Geraerd mediante la herramienta GinaFit de Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra las gráficas de supervivencia a diferentes temperaturas de las tres especies estudiadas, contaminantes mayoritarios del potón.

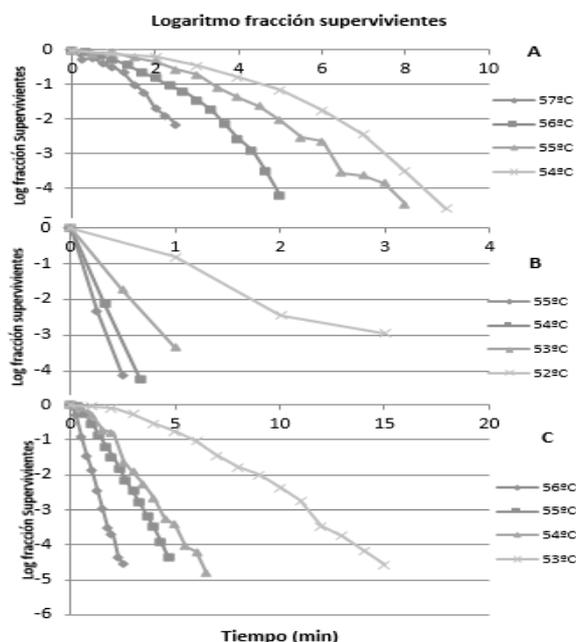


Figura 1: Gráficas de supervivencia de *Pseudomonas spp* (A), *Aeromonas spp* (B) y *Serratia spp* (C) a diferentes temperaturas.

Como se observa en la figura 1, mientras que la inactivación de *Aeromonas spp* sigue un curso prácticamente exponencial de inactivación, las curvas

de supervivencia de *Serratia spp* y, sobre todo, las de *Pseudomonas spp* presentan hombros. La mayor duración de los hombros de las curvas de *Pseudomonas spp* indican una mayor resistencia a la aparición de daños térmicos en las estructuras celulares o una mayor capacidad de reparación. En cualquier caso, la aparición de estas desviaciones nos obligo a modelar las curvas con la ecuación de Geeraerd con objeto de obtener parámetros comparables de termorresistencia.

Representando el logaritmo del tiempo de tratamiento necesario para conseguir cuatro ciclos de inactivación frente a la temperatura de tratamiento obtuvimos las correspondientes gráficas de termodestrucción (Figura 2) y, a partir de su pendiente, los valores z para cada especie.

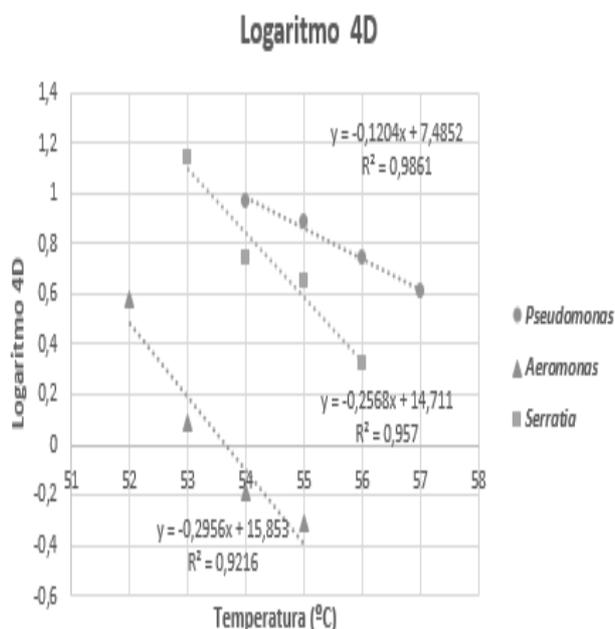


Figura 2: Líneas de termodestrucción para cuatro ciclos de inactivación de *Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp* y *Serratia spp*.

La figura 2 demuestra que *Pseudomonas spp* era la especie de mayor termorresistencia cuando los tratamientos se aplicaban a temperaturas superiores a 53 °C, y que *Aeromonas spp* era la especie más termosensible. A partir de las líneas de termodestrucción se calcularon unos valores z de 8,3 para *Pseudomonas spp*, de 3,9 para *Serratia spp* y de 3,5 para *Aeromonas spp*. En cualquier caso, y a efectos prácticos, nuestros resultados indicaban que la especie que limitaría la intensidad del tratamiento térmico en este producto sería *Pseudomonas spp*.

Para establecer los parámetros mínimos de cocción es preciso decidir los ciclos logarítmicos de inactivación que se pretenden garantizar. Dado que la máxima concentración admisible en la materia prima

es 10^6 ufc/gr. (Lahoz, 2014) y que el producto suele cocerse en lotes de 1000 kilos, el tratamiento debería garantizar al menos 12 reducciones decimales de la especie limitante. Aplicando las ecuaciones matemáticas obtenidas con el programa GInaFit y fijando como objetivo 12 ciclos de inactivación obtuvimos los tiempos mínimos de cocción para cada temperatura. La figura 3 muestra la relación de los tiempos de cocción calculados con la temperatura de tratamiento.

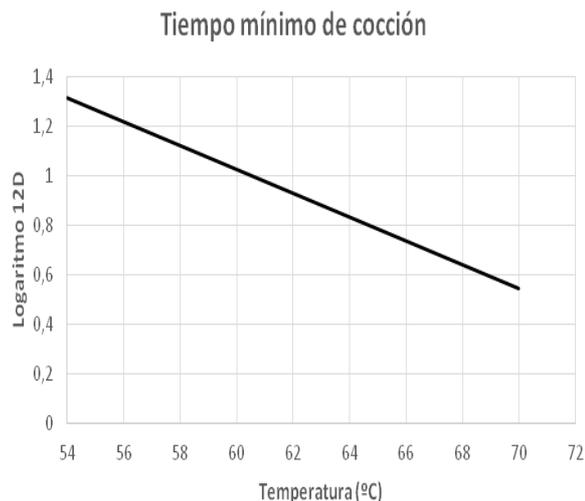


Figura 3: Condiciones mínimas de cocción del potón del Pacífico necesarias para garantizar 12 ciclos logarítmicos de inactivación de *Pseudomonas spp*.

De esta investigación se puede concluir que el tiempo mínimo de cocción del potón necesario para garantizar su salubridad y estabilidad es:

$$\text{Log tiempo cocción} = 3,92 - 0,0482 T^a$$

BIBLIOGRAFÍA

Condón, S.; Arrizubieta, M.J.; Sala F.J. (1993). Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC Improvement of this methodology. J. Microbiol. Methods. 18. 357–366

Lahoz, R. (2013). Optimización de la elaboración de salpicón de potón en conserva. Trabajo de fin de grado. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

Lahoz, R. (2014). Mejora del proceso de elaboración de potón del pacífico (*Dosidicus gigas*). Trabajo de fin de master. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

Agradecimientos. Investigación financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20) y el Fondo Social Europeo.

Modelización del tiempo máximo admisible de marinado del potón del Pacífico (*Dosidicus gigas*) a distintas temperaturas

Rocío Lahoz, Virginia Ruiz y Santiago Condón

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, scondon@unizar.es

La flora natural de *Dosidicus gigas* crece rápidamente incluso a temperaturas tan bajas como 1 °C. La velocidad de crecimiento disminuye exponencialmente con la temperatura de de marinado. El ritmo de crecimiento exponencial a 8 °C es de 0,022 ciclos/hora y cambia 10 veces al variar la temperatura 17,8 °C. El tiempo de marinado máximo admisible a cada temperatura puede calcularse con la ecuación:

$$T^{\circ} \text{ max marinado} = 10^{(2,42 - 0,0566 T^{\circ})}$$

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante es una de las alternativas más prometedoras como sustituto de los cefalópodos de consumo tradicional. Sin embargo, su procesado plantea serias dificultades cuando se desea obtener un producto de calidad debido a las características del producto. Las principales deficiencias del potón son la dureza de su tejido muscular, su olor amoniacal y su intenso sabor amargo. Además, dada su procedencia, tiene una calidad microbiológica mediocre, con una flora microbiana constituida mayoritariamente por especies psicrotrofas.

Para paliar las limitaciones del producto, las industrias especializadas incluyen en su procesado una fase de marinado con aditivos químicos. Las condiciones de marinado son muy variables en función de la industria procesadora. En la actualidad los aditivos comúnmente utilizados son los polifosfatos y/o los citratos sódicos, y los tiempos de marinado puede oscilar entre 1 y 4 días.

La etapa de marinado es crítica en la calidad del producto, puesto que se realiza a temperaturas de refrigeración, donde los microorganismos, dada su naturaleza, pueden multiplicarse. Si se produce una proliferación bacteriana, la calidad del potón puede empeorar drásticamente. Por una parte, la actividad microbiana puede dar lugar a la formación de trimetilamina y otros compuestos resultantes de la degradación proteica, lo que confiere al producto un “flavor” desagradable; y por otra, un alto contenido en patógenos puede dar lugar a problemas sanitarios.

Por todo ello, el objetivo final de este estudio fue determinar el efecto de las temperaturas de marinado en la calidad microbiológica del Calamar gigante.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevo a cabo con materia prima gentilmente suministrada, congelada, por la empresa Zarafish. Una vez descongelados, los rejos se trocearon y se introdujeron en frascos de vidrio, estériles, de 100 mL, que contenían, como medio de marinado, una solución acuosa de citrato sódico (Panreac; España) 0,1 M, previamente

atemperada a la temperatura deseada: 16°C, 12°C, 8°C, 4°C y 1°C. En todos los casos se mantuvo constante una relación sólido/líquido 1:3 (p/v). Posteriormente, los frascos se incubaron en estufas bacteriológicas a las temperaturas antes descritas. A tiempos determinados se realizaron los recuentos microbiológicos del agua de marinado. Las muestras se diluyeron con agua de peptona tamponada 0,1% (p/v) (Biolife, Italia) y se sembraban en masa en agar triptona soja (Biolife) suplementado con extracto de levadura al 0,6% (p/v) (Biolife) (TSAYE). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas, tras comprobar que incubaciones más prolongadas no aumentaban significativamente los recuentos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas se contaron con un contador automático de colonias por análisis de imagen (Protos, Inglaterra). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los datos se modelizaron con la ecuación de Gompertz modificada, en una hoja Excel. Para verificar la bondad del modelo se utilizó el coeficiente de correlación, el error cuadrático medio y los factores de sesgo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según hemos indicado previamente, el marinado es un proceso peligroso desde el punto de vista microbiológico debido a su prolongada duración y al difícil control de la temperatura a escala industrial. Es por ello que resulta especialmente importante para los técnicos del sector conocer el impacto de la temperatura en la evolución de la carga microbiana y poder calcular con fiabilidad el tiempo máximo permisible de marinado en función de la temperatura de procesado.

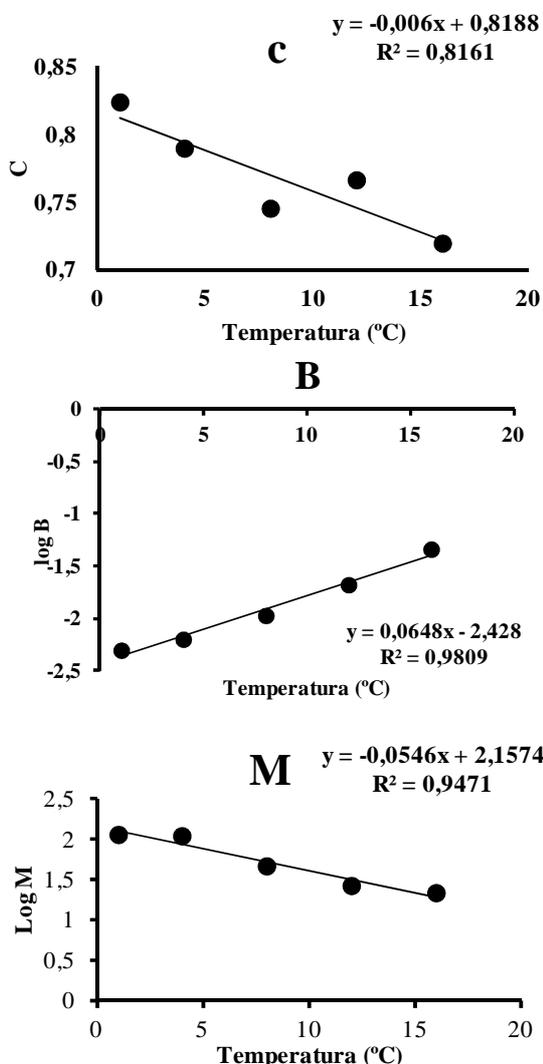
La modelización de las correspondientes curvas de crecimiento nos permitió obtener los parámetros de la ecuación de Gompertz a distintas temperaturas y, a partir de ellos, los parámetros de crecimiento con significación biológica: el ritmo de crecimiento exponencial (RCE), el tiempo de generación (TG), la fase de latencia (FL) y la densidad máxima de población (DMP). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1.

Como se observa en la tabla, tanto la fase de latencia como el tiempo de generación aumentaban al disminuir la temperatura de incubación.

Tabla 1: Parámetros de crecimiento

T ^a	RCE	TG	FL	DMP
16°C	0,088	3,39	5,05	8,32
12°C	0,045	6,65	25,73	8,69
8°C	0,021	13,73	48,42	8,69
4°C	0,014	20,87	98,99	9,42
1°C	0,012	24,55	110,78	9,70

Los modelos secundarios desarrollados, que relacionaban la evolución de los parámetros de la ecuación de Gompertz (C, B, M y A) con la temperatura, se muestran en la figura 1.



A = 3,072

Figura 1: Modelos secundarios que describen el crecimiento de la flora microbiana del potón marinado a distintas temperaturas.

Como se observa en la figura, el parámetro C resultó estar relacionado linealmente con la temperatura, mientras que los parámetros B y M lo estaban exponencialmente. El parámetro A resultó ser independiente de la temperatura, por lo que se consideró constante y se le atribuyó el valor medio de los obtenidos a las 5 temperaturas.

Integrando los modelos secundarios en la ecuación de Gompertz obtuvimos otra ecuación que relacionaba la concentración microbiana con la temperatura y el tiempo. Para establecer el tiempo de marinado máximo, establecimos como recuento máximo admisible 10⁶ UFC/mL, dado que a esta concentración comenzaban a producirse rápidamente aumentos de nitrógeno básico volátil total (La Hoz, 2014). A partir de la ecuación desarrollada calculamos el tiempo para cada temperatura en el que la solución de marinado alcanzaría este recuento.

Relacionando matemáticamente los tiempos máximos permisibles a las cinco temperaturas (fig 2) pudimos generalizar la relación y obtener finalmente una ecuación matemática que la describe.

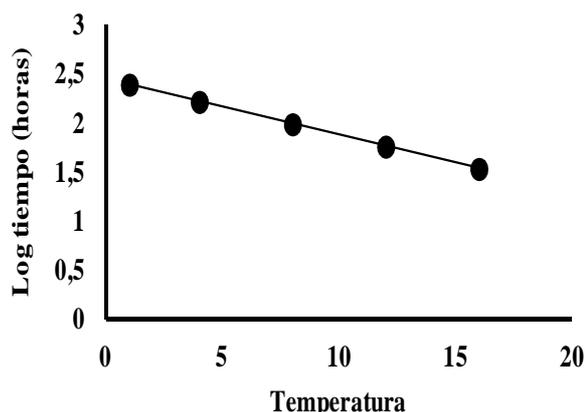


Figura 2: Modelo predictivo: tiempo máximo de marinado a distintas temperaturas.

El tiempo máximo de marinado permisible puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$T^{\circ} \text{ max marinado} = 10^{(2,42 - 0,0566 T^{\circ})}$$

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la flora natural de potón puede multiplicarse incluso a temperaturas tan bajas como 1 °C. El ritmo de crecimiento exponencial a 8 °C de la flora nativa es de 0,022 ciclos/hora y cambia 10 veces al variar la temperatura 17,8 °C.

BIBLIOGRAFÍA

La Hoz, R. 2014. Mejora del proceso de elaboración de potón del Pacífico. Trabajo fin de Máster. Universidad de Zaragoza. Investigación financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20) y el Fondo Social Europeo.

Efecto de la concentración de nitrato y nitrito en la supervivencia de *Listeria innocua* y *Escherichia coli* inoculadas en jamón curado

Xavier F. Hospital¹, Eva Hierro¹, Jacint Arnau², Marta Gratacós-Cubarsí², Gonzalo García de Fernando¹, Juan S. Aguirre¹ y Manuela Fernández¹

¹ Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, España, mingui@ucm.es

² IRTA, Finca Camps i Armet S/N, Monells, Girona, España

El objetivo de este trabajo fue determinar si la disminución del contenido de nitratos y nitritos añadidos al jamón curado favorecería la supervivencia de *Listeria* spp. y *Escherichia coli* en este producto. Para ello se inocularon 94 pernils con *L. innocua* y *E. coli* de forma independiente en los músculos *Semimembranosus* (*Sm*) y *Biceps femoris* (*Bf*). A continuación los pernils se dividieron en 6 lotes que se salaron con: 1) 600 ppm NO₃; 2) 150 ppm NO₃; 3) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂; 4) 150 ppm NO₃+150 ppm NO₂; 5) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂+500 ppm de ascorbato, y 6) control, sin nitrificantes. Se tomaron muestras de cada punto de inoculación tanto al final del salado (3 meses) como al final del secado (12 meses) y se efectuaron los correspondientes recuentos. La reducción de la concentración de nitrificantes afectó en mayor medida a *Listeria* que a *E. coli*. En general, *E. coli* mostró una tendencia decreciente durante todo el proceso sin que se observara un efecto claro de la formulación y con independencia de la zona de inoculación. Por el contrario, los recuentos de *L. innocua* mostraron diferencias en función del lote y de la zona de inoculación. Así pues, mientras que en *Bf* los niveles de *Listeria* al final de la fase de secado se incrementaron entre 2 y 3 log ufc/g respecto al inóculo inicial en todos los lotes, los recuentos en *Sm* variaron en función de la formulación, detectándose *Listeria* únicamente en el 14% de los jamones del lote 5 y en el 50% de los jamones del lote 3, frente al 85-100% en el resto de las formulaciones.

INTRODUCCIÓN

Los nitratos y nitritos son aditivos alimentarios ampliamente utilizados en la elaboración de productos cárnicos dada su contribución a la formación del color, aroma y sabor típico de estos productos. Asimismo presentan una importante actividad antioxidante y antimicrobiana sobre diversos microorganismos, como *Clostridium botulinum*. La Unión Europea permite el empleo de estos aditivos para la elaboración de jamón curado y establece 250 ppm de nitrato y 100 ppm de nitrito como dosis residuales máximas (Comisión Europea, 2011). Estos límites podrían verse reducidos en un futuro debido al papel que desempeñan como precursores en la formación de N-nitrosaminas, cuya actividad carcinogénica, mutagénica y teratogénica es bien conocida. Además, existe una demanda creciente por parte de los consumidores de productos con menos aditivos añadidos. Así pues, el sector cárnico deberá tener en cuenta estas consideraciones manteniendo la calidad y seguridad microbiológica de sus productos.

Listeria monocytogenes y *Escherichia coli* son dos microorganismos patógenos muy ubicuos que pueden contaminar la carne tanto en el matadero como en la planta de procesado, ya sea por contaminación fecal o por contacto con superficies inadecuadamente desinfectadas. El objetivo de este trabajo fue determinar si la disminución del contenido de nitratos

y nitritos añadidos al jamón curado favorecería la supervivencia de *Listeria* spp. y *E. coli* en este producto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se inocularon 94 pernils con dos cepas de *Listeria innocua*, como subrogado de *L. monocytogenes* (NCTC 11288 y CECT 4030) y dos cepas de *E. coli* O157:H7 (CECT 4972 y CECT 434) de forma independiente en los músculos *Semimembranosus* (*Sm*) y *Biceps femoris* (*Bf*) utilizando jeringuillas con aguja hipodérmica de 1,2x40 mm. Ambos microorganismos se inocularon en una concentración aproximada de 5 log ufc/ml.

A continuación los pernils se dividieron en 6 lotes que se salaron con 10 g/kg de NaCl y: 1) 600 ppm NO₃; 2) 150 ppm NO₃; 3) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂; 4) 150 ppm NO₃+150 ppm NO₂; 5) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂+500 ppm de ascorbato y 6) sin nitrificantes. Los pernils se mantuvieron en salazón durante 10 días/kg a 2-4 °C y 75-85% de humedad relativa (HR). Seguidamente se lavaron y se colgaron durante 75 días a 4 °C y 75-80% HR. Finalmente se secaron a temperatura creciente y HR decreciente (10 a 24 °C y 80 a 55% HR) hasta reducir aproximadamente un 37% su peso.

El muestreo de los puntos de inoculación se realizó con sacabocados estériles de 5 cm de diámetro justo después de la inoculación (día 0), al final del salado (3 meses) y al final del secado (12 meses). Las distintas muestras se homogenizaron con 50 ml de solución salina (0,85% NaCl) y se efectuaron los correspondientes recuentos en agar Palcam (*L. innocua*) y MacConkey (*E. coli*). El límite de

detección fue de 100 ufc/g. Paralelamente se realizaron mediciones de pH y a_w en ambos músculos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se representan los valores de pH y a_w en los diferentes tiempos de muestreo de los jamones. Mientras que el pH fue similar en ambos músculos, la a_w fue superior en *Bf* que en *Sm*, de forma más marcada en las etapas iniciales. No se observaron diferencias entre los lotes para ninguno de los dos parámetros.

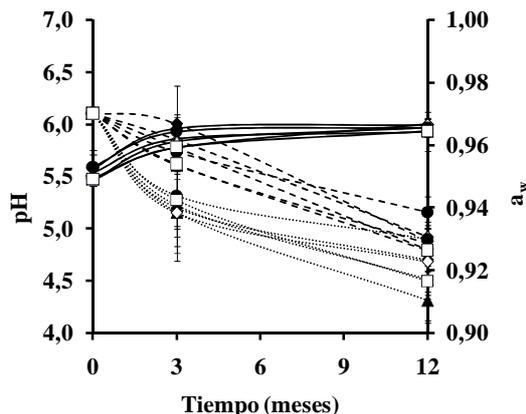


Figura 1: Valores de pH (—) en *Semimembranosus* y a_w en *Semimembranosus* (·····) y *Biceps femoris* (- - -) durante la elaboración de jamón curado. (▲) 600 ppm NO₃; (Δ) 150 ppm NO₃; (◆) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂; (◇) 150 ppm NO₃+150 ppm NO₂; (●) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂+500 ppm de ascorbato; (□) sin nitrificantes.

La reducción de la concentración de nitrificantes en la formulación de los jamones curados tuvo un efecto diferenciado en el comportamiento de *E. coli* y *L. innocua*.

E. coli mostró una tendencia decreciente durante todo el proceso sin que se observara un efecto claro de la formulación (Figura 2a). Durante el salado, la temperatura de la cámara (4 °C) fue inferior a la temperatura mínima de crecimiento de este microorganismo (7-8 °C), limitando su desarrollo. Por otra parte, la menor a_w por la mayor concentración salina en *Sm* (Andrés y col., 2005) hizo que los recuentos en este músculo fueran ligeramente inferiores en comparación con los de *Bf*. No obstante, al final del secado no se detectó *E. coli* ni en *Sm* ni en *Bf*, debido a su baja a_w (0,910-0,935) como consecuencia de la concentración salina alcanzada y la deshidratación (Andrés y col., 2005).

A diferencia de *E. coli*, los recuentos de *L. innocua* en *Bf* al final de la etapa de secado fueron en todos los lotes entre 2 y 3 log ufc/g superiores respecto a la concentración inicial (Figura 2b). Este incremento se podría explicar por el carácter psicrotrofo de *Listeria* que, junto con los valores de a_w superiores a 0,92

registrados en dicho músculo, permitirían su multiplicación.

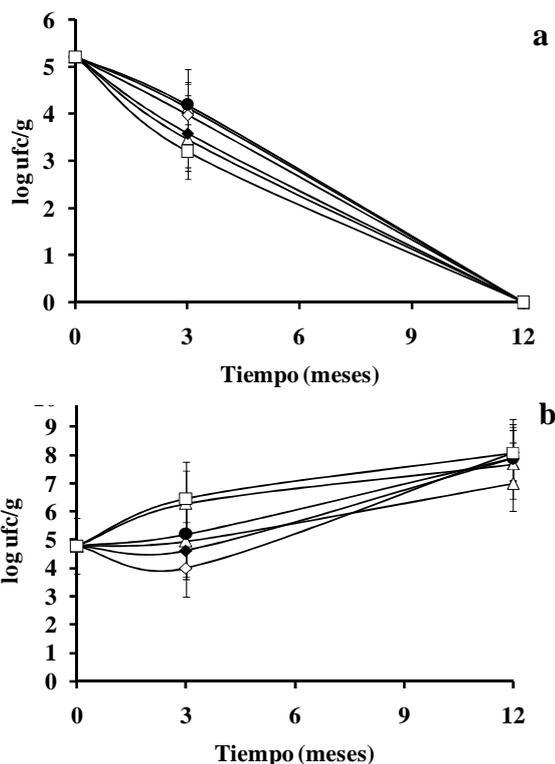


Figura 2: Recuentos (log ufc/g) de *E. coli* en *Semimembranosus* (a) y *L. innocua* en *Biceps femoris* (b) en el post-salado y al final del secado. (▲) 600 ppm NO₃; (Δ) 150 ppm NO₃; (◆) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂; (◇) 150 ppm NO₃+150 ppm NO₂; (●) 600 ppm NO₃+600 ppm NO₂+500 ppm de ascorbato; (□) sin nitrificantes.

Por el contrario, en el músculo *Sm* sí se observaron diferencias en los recuentos de *L. innocua* en relación con la concentración de nitrificantes empleada. Así, al final del secado, se detectó *Listeria* únicamente en el 14% de los jamones del lote 5 y en el 50% de los jamones del lote 3 (los lotes con mayor concentración de nitrato y nitrito), frente al 85-100% en el resto de las formulaciones. La rápida difusión de la sal hacia este músculo, junto con su mayor exposición a la deshidratación, explicaría este comportamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Andrés, A.I., Ventanas, S, Ventanas, J, Cava, R y Ruiz, J. 2005. Physicochemical changes throughout the ripening of dry cured hams with different salt content and processing conditions. *Eur Food Res Technol.*, 221:30-35.

Comisión Europea (2011). Reglamento (UE) 1129/2011 de la comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. *OJEU*, L295, 1-177.

SESIÓN VIII: Avances en fisiología microbiana de interés en microbiología de alimentos.

Una mirada “positiva” a los biofilms bacterianos

Diego Romero

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Málaga, España, diego_romero@uma.es

Los biofilms bacterianos son comunidades formadas por células y una matriz extracelular que las envuelve, proporcionando protección y estabilidad. La composición de la matriz extracelular y la interacción entre los componentes han centrado gran parte de la atención en estudios de los biofilms bacterianos, y aunque su composición es variable, es posible encontrar elementos comunes, como proteínas, exopolisacáridos o ácidos nucleicos. De nuestro grado de conocimiento de la matriz extracelular dependerá el éxito a la hora de potenciar la formación o erradicar un biofilm bacteriano. Con la idea de profundizar en este aspecto de la biología celular bacteriana, en este trabajo nos centramos en dos especies bacterianas gram-positivas y esporulantes, y que interactúan de forma diferente con el entorno: *Bacillus subtilis*, una especie beneficiosa para la planta y con potencial en el control de enfermedades, y *Bacillus cereus*, un patógeno de humanos responsable de intoxicaciones alimentarias.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos unicelulares, pero que también tienden a agruparse en comunidades multicelulares conocidas como biofilms. Para que este agrupamiento ocurra, la población bacteriana tiene que sincronizarse, y de ello se encarga un sofisticado sistema de comunicación química, donde ciertas moléculas producidas en la población son detectadas por receptores localizados en la superficie celular bacteriana. Como resultado tiene lugar un recambio en la expresión de genes, siendo especialmente relevantes aquellos implicados en la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Esta matriz está constituida por proteínas, polisacáridos o ácidos nucleicos entre otros, y se ensambla fuera de las células, de forma que protege, estructura y da robustez a toda la comunidad (Fig. 1).

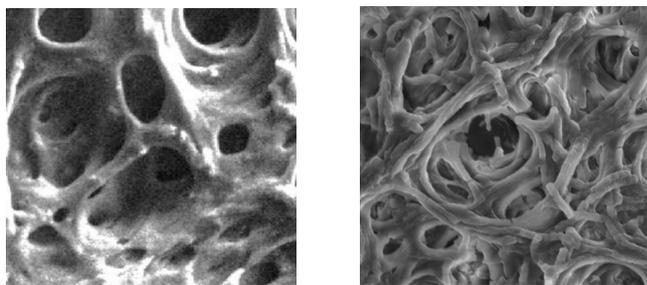


Figura 1. Biofilm de *B. subtilis* (izquierda) y *B. cereus* (derecha) ha visto a microscopía electrónica de barrido.

Los biofilms se pueden formar potencialmente en cualquier superficie, y son especialmente recalcitrantes a la eliminación con desinfectantes y otros agentes antimicrobianos. Por este motivo, los biofilms bacterianos son especialmente temidos en medicina, o la industria alimentaria, dado que

representan una continua fuente de infección o contaminación. Esta visión patológica sin embargo enmascara otra realidad más benévola, los biofilms de otras especies bacterianas pueden contribuir a protegernos de infecciones, o favorecer la nutrición y el crecimiento de las plantas. Especies bacterianas representantes de estas dos visiones son *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, las dos Gram-positivas y esporulantes. Cepas de *B. subtilis* y otras especies relacionadas han demostrado un gran potencial como agentes de control de enfermedades de plantas, situándose como una sólida estrategia fitosanitaria que ayude a reducir el empleo de pesticidas. Esta acción protectora suele resultar de la combinación de diferentes mecanismos de acción: antibiosis, inmunización y protección del crecimiento de la planta. Por el contrario *B. cereus* es responsable de intoxicaciones alimentarias y un serio problema de contaminación en la industria agroalimentaria.

En nuestro laboratorio estamos interesados en conocer si la formación de los biofilms es una parte del ciclo de vida de estas especies bacterianas cuando interactúan con las plantas. Para iniciar este estudio nos hemos centrado en el estudio del papel que ciertas proteínas extracelulares desempeñan en el ensamblaje de la matriz extracelular de los biofilms, y su impacto en la protección de cultivos o colonización y persistencia.

Uno de los últimos descubrimientos más fascinantes de la matriz extracelular de los biofilms bacterianos son las proteínas de tipo amiloide. Estas proteínas fueron inicialmente descubiertas en enfermedades neurodegenerativas de humanos, y fue precisamente su apariencia similar al almidón por la que le vino el nombre de amiloide. A pesar de haber sido determinada su naturaleza proteica, ha

prevalecido el término patológico hasta nuestros días. Estudios con estas proteínas apuntan a un errático procesamiento de la proteína como responsable de la transición del estado soluble al estado amiloide. Todas las proteínas amiloides se caracterizan por formar fibras insolubles, resistentes y con capacidad de unir colorantes específicos. Pues bien, hoy sabemos que el estado amiloide es más común de lo imaginado en la naturaleza, y multitud de proteínas y péptidos tienen esa tendencia de formar fibras bioquímica y morfológicamente similares a los amiloides patológicos. Sin embargo, lejos de esta condición patológica, muchas de estas proteínas parecen desarrollar funciones importantes para el mantenimiento en la homeostasis celular. Es por ello que a estas “variantes” se les ha dado el nombre de proteínas amiloides funcionales, con la idea de diferenciarlas de sus hermanas patológicas.

Son muchas las especies bacterianas en las que ya se han identificado este tipo de proteínas, aunque la más estudiada y conocida es el Curli en *Escherichia coli*. La función de esta proteína va desde mediar la interacción con superficies, evasión del sistema inmune o la formación de biofilms. Nosotros hemos encontrado que *B. subtilis* tiene otra proteína tipo amiloide, TasA, y hemos demostrado su localización en la matriz extracelular y funcionalidad en la formación de biofilms (Fig. 2)

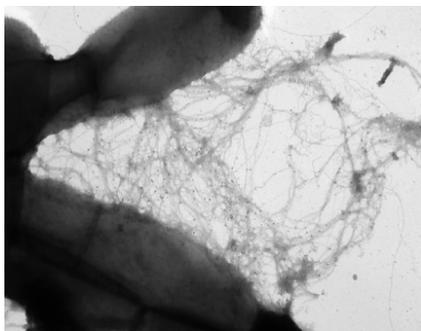


Figura 2. Microfotografía electrónica de transmisión de fibras de TasA entre células de *Bacillus subtilis*.

Una diferencia fundamental entre estos amiloides bacterianos y los patológicos, es que las fibras se forman en respuesta a un sofisticado programa de ensamblaje, que aglutina la participación de diversas proteínas. De esta forma, se controla dónde y cuándo se debe armar la fibra amiloide. En *B. subtilis* otra proteína, TapA, parece ser clave en la formación de la fibra de TasA en la superficie celular. Cuando no hay TapA no se forman fibras, y como consecuencia no tiene lugar la formación de biofilms. La funcionalidad de la matriz extracelular en el ensamblaje de biofilms la hemos observado en plantas, y hemos comprobado, cómo la actividad beneficiosa de una cepa de *B.*

subtilis se ve severamente afectada cuando los niveles de TasA y en consecuencia de matriz extracelular son comparativamente más bajos que la cepa silvestre.

B. cereus, la otra bacteria objeto de estudio, está relacionada filogenéticamente a *B. subtilis*, tiene un ortólogo a *tasA*, pero carece de *tapA*, lo que nos ha llevado a plantear si TasA ha evolucionado para ser capaz de polimerizar sin la ayuda de la proteína auxiliar TapA. Para responder a esta pregunta hemos realizado un doble abordaje: i) mutagénesis en *B. cereus* y ii) expresión heteróloga en *B. subtilis*. Todos los resultados apuntan a una implicación clara de esta proteína en la formación de biofilms. Ahora queda por determinar si en efecto TasA de *B. cereus* es una proteína tipo amiloide, y cuál es su papel en la interacción de esta bacteria con las superficies de plantas, y por tanto su capacidad para permanecer hasta llegar al huésped definitivo, el consumidor.

La posibilidad de definir diferencias entre ambas especies nos permitiría en un caso idílico modular estos biofilms, y poder así favorecer a bacterias beneficiosas, pero no aquellas que puedan resultar perjudiciales o no deseables.



Diego Romero es licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga y se doctoró por la misma Universidad trabajando en la aplicación de la biotecnología al control de enfermedades de plantas. Realizó una estancia postdoctoral de cuatro años en el laboratorio del profesor Roberto Kolter en el Molecular

Genetics and Microbiology Department en la Harvard Medical School (Boston, EE.UU.), donde se centró en el estudio de la funcionalidad de las proteínas amiloides en el ensamblaje de la matriz extracelular de biofilms de *Bacillus subtilis*. En 2012 se reincorpora al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga con un contrato Ramón y Cajal. En la actualidad desarrolla su actividad investigadora en el estudio de las bases moleculares implicadas en la interacción bacteria-planta en el contexto de la protección de cultivos vegetales y seguridad alimentaria, en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", un centro mixto Universidad de Málaga-CSIC.

Ha publicado una treintena de artículos, así como varios capítulos de libro, y artículos de divulgación científica. Es investigador principal de varios proyectos de investigación, participante de otros actualmente en marcha, y co-IP de un contrato de investigación con la empresa privada. Ha sido director de una tesis doctoral, y de otras tres en marcha.

Respuestas adaptativas al estrés en microorganismos patógenos y sus implicaciones para la seguridad alimentaria

Avelino Álvarez-Ordóñez¹, Mercedes López², Miguel Prieto² y Colin Hill³

¹Teagasc, Moorepark Food Research Centre, Fermoy, Co. Cork, Ireland, avelino.alvarez-ordonez@teagasc.ie

²Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León, España

³School of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Cork, Ireland

Los microorganismos de interés alimentario se enfrentan habitualmente a situaciones de estrés en sus nichos ecológicos. Poseen una gran capacidad de adaptación a las condiciones prevalentes en los alimentos y en ambientes de relevancia en la industria alimentaria, y han desarrollado sofisticados mecanismos moleculares de respuesta que les permiten crecer o sobrevivir en condiciones ambientales adversas y pueden determinar su presencia en los alimentos y su virulencia en el hospedador. Algunos son capaces de adquirir resistencias extremas a condiciones de estrés normalmente letales, bien de forma permanente, por variabilidad genética, o temporal, mediante inducción de reguladores transcripcionales y modulación de la composición y estructura celular. Otros son capaces de utilizar componentes de los alimentos para mantener la homeostasis celular. Y a veces en condiciones de limitación de nutrientes pueden reprimir su respuesta al estrés con la finalidad de priorizar otras actividades metabólicas necesarias para su crecimiento.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de interés alimentario se enfrentan habitualmente a situaciones de estrés en sus nichos ecológicos, los alimentos y ambientes de relevancia en la industria alimentaria. Para contrarrestarlas han desarrollado sofisticados mecanismos moleculares de respuesta que les permiten crecer o sobrevivir en condiciones ambientales adversas y normalmente letales. Diferentes condiciones de estrés que prevalecen durante el procesado de alimentos (tratamientos térmicos, tratamientos por altas presiones hidrostáticas, acidificación, altas concentraciones de sal, etc) y en el cuerpo humano tras la ingestión de alimentos (jugo gástrico, sales biliares, anaerobiosis, alta osmolaridad, etc) son de especial relevancia y pueden determinar la presencia/ausencia de microorganismos patógenos en los alimentos y su patogenicidad o virulencia.

HIPER-RESISTENCIA ESTABLE A FACTORES DE ESTRÉS

Algunos microorganismos patógenos han demostrado gran capacidad para adquirir resistencias extremas y estables a condiciones letales de estrés o tratamientos de conservación de los alimentos dentro de un contexto genómico definido y en un número limitado de generaciones. Este fenómeno puede ser el responsable de la persistencia de microorganismos mesófilos en ambientes extremos que eran considerados inaccesibles para ellos. Un claro ejemplo es la adquisición de piezo-resistencia (resistencia extrema a altas presiones hidrostáticas) por parte de

Escherichia coli y *Listeria monocytogenes* tras su exposición a varios ciclos de tratamiento o a tratamientos prolongados a presiones moderadas (van Boeijen y col., 2010; Vanlint y col., 2011). Mientras la presión hidrostática máxima soportada por células vegetativas se encuentra normalmente en el rango de 120-800 MPa, dichos autores han aislado variantes con resistencia estable a presiones en el rango de los Giga-Pascales (hasta 2 GPa para *E. coli*). En algunos casos, esta adquisición de hiper-resistencia a altas presiones se ha asociado a la existencia de mutaciones puntuales que dan lugar a proteínas de respuesta a estrés truncadas. En otros casos, los mecanismos moleculares no han podido ser esclarecidos aún.

RESPUESTAS DE TOLERANCIA A ESTRÉS

Los microorganismos también pueden responder frente a condiciones adversas de forma transitoria. Es decir, una vez el agente estresante desaparece la población bacteriana recupera sus niveles habituales de resistencia. Un ejemplo de respuesta transitoria son las respuestas de tolerancia a estrés, que pueden ser definidas como el desarrollo de resistencias a condiciones normalmente letales tras el crecimiento o exposición durante cortos periodos de tiempo a condiciones subletales o moderadas de estrés (Álvarez-Ordóñez y col., 2012a). Las respuestas de tolerancia a estrés están mediadas por reguladores que controlan la expresión de grupos específicos de genes, orquestando una cascada de reacciones que incluyen la inducción de complejos enzimáticos, la síntesis de proteínas de estrés que protegen o reparan a proteínas y ácidos nucleicos y la modulación de la composición y propiedades físicas de la membrana citoplasmática.

La membrana citoplasmática es una de las principales defensas celulares frente a ambientes extremos. Por ello, como respuesta adaptativa a ambientes fluctuantes, los microorganismos pueden modificar su composición con el objetivo de mantener una fluidez de membrana compatible con la vida (Álvarez-Ordóñez y col., 2008). Numerosos autores han observado que variaciones en temperatura, pH, concentración de etanol, osmolaridad externa, etc, provocan cambios significativos en la composición en ácidos grasos de membrana, que se traducen en modificaciones en la fluidez y permeabilidad de la misma. Varios estudios han demostrado la existencia de una correlación entre el contenido en determinados ácidos grasos y/o la fluidez de membrana, y la resistencia bacteriana a condiciones de estrés o ciertos tratamientos tecnológicos (tratamientos térmicos, altas presiones hidrostáticas, etc.).

Algunos microorganismos patógenos sobreviven mejor a condiciones ambientales extremas o tratamientos letales cuando se encuentran en una matriz alimentaria que cuando se utilizan medios de laboratorio para el tratamiento. Este hecho sugiere que determinadas propiedades físico-químicas de los alimentos o componentes de los mismos pueden ejercer un efecto protector frente a situaciones de estrés. Por ejemplo, varios autores han descrito el papel que algunos aminoácidos desempeñan en el mantenimiento del pH intracelular en condiciones ácidas extremas en enterobacterias (Álvarez-Ordóñez y col., 2010). Es el caso de los aminoácidos arginina, lisina y glutamato que son decarboxilados por sistemas enzimáticos bacterianos consumiéndose un protón intracelular en el proceso. De forma similar, varios estudios han demostrado que los microorganismos pueden internalizar o sintetizar determinados azúcares o aminoácidos (trehalosa, prolina, carnitina, etc), conocidos como solutos compatibles, en situaciones de estrés osmótico (alta salinidad, deshidratación, altas presiones hidrostáticas), lo que facilita su supervivencia (Sleator y Hill, 2002).

LA BALANZA ENTRE SUPERVIVENCIA Y COMPETENCIA NUTRICIONAL

Las respuestas de tolerancia a estrés son procesos costosos energéticamente en las que están involucrados un amplio rango de mecanismos protectores y componentes celulares. Por ello, como contrapartida, en situaciones de estrés otras rutas metabólicas deben ser reprimidas. Recientes publicaciones han descrito que una resistencia elevada a situaciones de estrés se ve acompañada habitualmente de una reducción en la capacidad

bacteriana para competir por la utilización de nutrientes a bajas concentraciones o fuentes de carbono no preferidas. Es lo que se conoce como la balanza entre supervivencia y competencia nutricional, y el ejemplo más notorio lo representa la variabilidad fenotípica ocasionada por alteraciones en la funcionalidad o nivel de expresión del factor alternativo RpoS en enterobacterias (Álvarez-Ordóñez y col., 2012b). El factor alternativo RpoS es el principal regulador de la respuesta general al estrés en bacterias Gram-negativas. Sin embargo, a pesar de su importancia vital, no es infrecuente el aislamiento de cepas de campo con mutaciones deletéreas en el gen que lo codifica (*rpoS*). Son cepas con una mayor sensibilidad a diferentes condiciones de estrés y con mayor capacidad de crecimiento en presencia de fuentes de carbono no preferidas como acetato, succinato, etc. De hecho, varios autores han obtenido variantes con mutaciones deletéreas en el gen *rpoS* por selección natural en cultivos bacterianos mantenidos bajo limitación de carbono o expuestos a ciclos de cultivo en medios mínimos suplementados con fuentes de carbono no preferidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R. y Bernardo, A. 2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella* Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, 123: 212-219.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A. y López, M., 2010. Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.*, 136: 278-282.
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C. y López, M. 2012a. The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: an adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Res. Int.*, 45: 482-492.
- Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M. y Hill, C. 2012b. Polymorphisms in *rpoS* and stress tolerance heterogeneity in natural isolates of *Cronobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 3975-3984.
- Sleator, R.D. y Hill, C. 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 49-71.
- Van Boeijen, I.K.H., Chavarroche, A.A.E., Valderrama, W.B., Moezelaar, R., Zwietering, M.H. y Abee, T. 2010. Population diversity of *Listeria monocytogenes* LO28: phenotypic and genotypic characterization of variants resistant to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 2225-2233.
- Vanlint, D., Mitchell, R., Bailey, E., Meersman, F., McMillan, P.F., Michiels, C.W. y Aertsen, A. 2011. Rapid acquisition of Gigapascal-high pressure resistance by *Escherichia coli*. *MBio*, 2: e00130-10.



Avelino Álvarez Ordóñez es Licenciado en Veterinaria y Doctor por la Universidad de León. Desde enero de 2010 ha llevado a cabo su actividad profesional como investigador postdoctoral en la Universidad de Cork y en el instituto de investigación agroalimentaria "Teagasc" (Irlanda). Durante

estos años ha publicado 33 artículos de investigación, 2 capítulos de libro y 1 libro, ha sido ponente en dos congresos y ha participado en otras conferencias y simposios con 27 comunicaciones científicas. Además ha participado en 10 proyectos de financiación nacional (Junta de Castilla y León, MINECO, INIA) e internacional (séptimo programa marco de la Unión Europea, Ministerio de Agricultura de Irlanda, Science Foundation Ireland, Enterprise Ireland) y ha colaborado como revisor ad-hoc de proyectos de investigación (Fundación para la ciencia de la República Checa) y revistas de investigación (Appl Environ Microbiol, PLoS one, Int J Food Microbiol, J Appl Microbiol, J Microbiol Meth, entre otras). Desde 2010 colabora como experto externo en varios grupos de trabajo del panel sobre riesgos biológicos "BIOHAZ" de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), donde ha participado en la elaboración de 7 opiniones científicas.

Efecto sobre la síntesis de proteínas y mecanismo de acción de la proteína antifúngica PgAFP en *Aspergillus flavus*

Josué Delgado¹, M. Ángel Asensio¹, Sean Doyle², Rebecca A. Owens² y Félix Núñez¹

Higiene y Seguridad Alimentaria, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avenida de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, España. jdperon@unex.es¹
Department of Biology, National University of Ireland Maynooth, Co. Kildare, Ireland²

La proteína antifúngica PgAFP, producida por *Penicillium chrysogenum* RP42C aislado de jamón curado, inhibe el crecimiento de mohos toxigénicos presentes en alimentos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la proteína PgAFP sobre el moho sensible *Aspergillus flavus* CECT 2687, productor de aflatoxinas. Para ello, se realizaron dos estudios de proteómica: 2D-PAGE comparativa y un análisis mediante Orbitrap (Q-Exactive). Tras analizar las diferencias en la abundancia relativa de las proteínas identificadas, se encontraron varias relacionadas con el metabolismo energético, respuesta al estrés, integridad de la pared celular y biosíntesis de aflatoxinas. Se realizaron ensayos específicos para confirmar el efecto provocado por estas alteraciones, dando como resultado que las hifas tratadas mostraron menor cantidad de quitina a pesar de no observarse ningún cambio morfológico. También se observó una menor actividad metabólica y un aumento de ROS y PgAFP indujo la apoptosis en las hifas tratadas. Estos resultados permiten concluir que el mecanismo de acción de PgAFP es multifactorial, traducándose en un desarrollo más lento. Además, PgAFP provoca estrés oxidativo, induciendo un aumento de ROS, lo que podría desencadenar el proceso de apoptosis observado. Estos resultados sugieren un efecto directo de reducción de la producción de aflatoxinas, pudiendo ser de gran utilidad en el control de la seguridad alimentaria en productos cárnicos madurados.

INTRODUCCIÓN

Durante la maduración de los productos cárnicos curados se desarrolla en su superficie una población fúngica que tiene efectos positivos sobre la calidad del producto final, pero que podría producir micotoxinas. Por ello, es necesario establecer medidas para controlar este peligro. La proteína antifúngica PgAFP, producida por *Penicillium chrysogenum* RP42C aislado de jamón curado, tiene un efecto fungistático sobre un amplio espectro de mohos toxigénicos habituales en alimentos madurados. *Aspergillus flavus*, considerado uno de los principales mohos productores de aflatoxinas, es inhibido por la proteína PgAFP aunque se desconoce su mecanismo de acción de ésta.

La proteómica comparativa permite establecer qué proteínas que se ven afectadas por los compuestos antifúngicos. Esta metodología aporta información relevante para determinar las rutas metabólicas implicadas y permite diseñar ensayos específicos para confirmar el efecto provocado por PgAFP.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el mecanismo de acción de la proteína PgAFP y su efecto sobre la estructura celular y el metabolismo en *A. flavus* productor de aflatoxinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de proteínas del micelio. *A. flavus* CECT 2687 se cultivó durante 24 h a 25°C en agitación en presencia y ausencia de 10 µg/ml de PgAFP. El micelio fue

recogido, filtrado, lavado y lisado para precipitarlo con tricloroacético/acetona.

2D-PAGE e identificación mediante LC-MS. El precipitado se procesó mediante electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE) con un rango de pH 4-7. Los geles fueron escaneados y analizados mediante el software ProgenesisTM SameSpot. Las manchas que mostraron diferencias ($p < 0,05$) fueron digeridas con tripsina y analizadas por 6340 Model Ion Trap LC-Mass Spectrometer (Agilent Technologies, Ireland), para ser identificadas a través de MASCOT MS/MS Ion search.

Proteómica libre de marcaje. El precipitado fue resuspendido en urea (8M), digerido con tripsina y ProteaseMax, desalado con C18 ZipTips®. Esta mezcla de proteínas fue analizada mediante Thermo Scientific Q-Exactive mass acoplada a Dionex RSLCnano. Los datos fueron analizados mediante el software MaxQuant.

Actividad metabólica y ROS. Se empleó FUN-1 (Molecular Probes) y 2', 7' dichlorofluorescein diacetate (Sigma) respectivamente, para la tinción de *A. flavus* cultivado previamente durante 24 h con 0 y 20 µg/ml de PgAFP, posteriormente se analizó mediante microscopía de fluorescencia.

Morfología y visualización de quitina. Hifas de *A. flavus* con 0 y 75 µg/ml de PgAFP se observaron mediante microscopía con luz visible, y tras la tinción con *fluorescent brightener 28* (Sigma) con microscopía de fluorescencia.

Detección de apoptosis. El desarrollo de la muerte celular programada fue investigado en cultivos de *A. flavus* con 0 y 75 µg/ml de PgAFP utilizando el kit comercial *Annexin V-fluorescein isothiocyanate/ propidium iodide* (AnV-FITC/PI), y se visualizó a través de microscopía de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los ensayos de cuantificación del perfil proteico, se observaron diferentes proteínas cuya abundancia relativa se vio alterada en las muestras tratadas con PgAFP respecto a las muestras control. El tratamiento provoca un aumento de diferentes proteínas relacionadas con la biogénesis de los ribosomas y con el transporte y degradación del ARN, así como cambios importantes en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético, la respuesta al estrés, la integridad de la pared celular y la biosíntesis de aflatoxinas (Tabla 1).

METABOLISMO ENERGÉTICO	INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR
Piruvato decarboxilasa* Fosfoglucomutasa* L-xilulosa reductasa Piruvato carboxilasa Acetato-CoA ligasa Aldosa 1-epimerasa Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa Aldehído dehidrogenasa Fosfofructoquinasa Acetil-CoA carboxilasa Malato sintetasa	Gamma-actina* ACT_BOTCI Actina Septina AspA Probable β -glucosidasa btgE* Glucanasa de la pared celular* Manosa-1-fosfato guaniltransferasa Glucosamina-fructosa-6-P aminotransferasa Actina Act1 α -trehalosa-fosfato sintasa Septina GDP-manosa pirofosforilasa A Septina AspB
RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO	BIOSÍNTESIS DE AFLATOXINAS
Hsp 90* Hsp70 chaperona* Chaperonin* Cys-Gly metalodipeptidasa dug1* Glutation sintetasa* Factor de elongación 1 gamma Gamma-glutamyltranspeptidasa Glutation S-transferasa	Acetil-CoA carboxilasa AflK/ vbs/ VERB sintasa Glutation S-transferasa AflM/ ver-1/ dehidrogenasa/ ketoreductasa O-metiltransferasa

*Proteínas encontradas en mayor cantidad en muestras tratadas

Varias proteínas relacionadas con la biosíntesis y estructura de la pared celular, en concreto con la síntesis de quitina, actina y varias septinas, se detectaron en menor cantidad en las muestras tratadas. Sin embargo, mediante microscopía, se constató que PgAFP no indujo cambios morfológicos en *A. flavus*, observándose solo una disminución de la cantidad de quitina presente en la pared celular en estadios muy tempranos de incubación (12h). Estos cambios permiten deducir que a pesar de no producirse cambios morfológicos en las hifas tratadas, el tratamiento puede tener un efecto fundamental sobre el desarrollo de éstas, de modo que el crecimiento se ve retardado con respecto a las no tratadas.

Con respecto al metabolismo energético, PgAFP provoca una disminución en la cantidad relativa de diferentes proteínas implicadas en las rutas de glucolisis, gluconeogénesis (por ejemplo piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, o,

fosfofructoquinasa) y catabolismo de lípidos (como malato sintetasa, acetato-CoA ligasa). Sin embargo, aparece aumentada la cantidad de piruvato decarboxilasa importante para el metabolismo energético anaeróbico en mohos, que produce energía con una menor eficiencia. Esto le permite sobrevivir a *A. flavus*, aunque con una tasa de crecimiento reducida con respecto a cultivos no tratados. Estos resultados se corroboran mediante tinción con FUN-1, que mostró una disminución de la actividad metabólica en el cultivo tratado con PgAFP.

Otro conjunto de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés, como la Hsp 90, la Hsp70 chaperona o la glutatión sintetasa, se encuentran en mayor cantidad en *A. flavus* tratado con PgAFP. Estas proteínas son indicadores del estrés a que puede estar sometido el moho como consecuencia del tratamiento, hecho constatado por el incremento de ROS observado en sus hifas. Aparentemente, *A. flavus* aumenta la síntesis de proteínas como la glutatión sintetasa para tratar de neutralizar la formación de ROS inducido por la presencia de PgAFP. Sin embargo este mecanismo no parece ser suficiente para evitar la apoptosis provocada por el daño ocasionado por estas sustancias, como se observó mediante la tinción con AnV-FITC/PI.

La abundancia de algunas proteínas relacionadas con la biosíntesis de aflatoxinas fue menor en las muestras tratadas. En concreto la VERB sintasa y la ver-1 dehidrogenasa no se detectaron en *A. flavus* tratado. Estos resultados sugieren que el tratamiento con PgAFP puede tener un efecto directo de reducción de la producción de aflatoxinas, lo que puede ser de gran utilidad para mejorar el control de la seguridad alimentaria en productos cárnicos madurados. Por lo tanto, es necesario comprobar experimentalmente el efecto de PgAFP en la producción de aflatoxinas en alimentos.

En conclusión, el mecanismo de acción de PgAFP parece ser multifactorial, jugando un papel fundamental la disminución de la actividad metabólica, cambios en la integridad de la pared celular y un aumento en la producción de ROS, que desencadena la apoptosis en *A. flavus* y puede provocar reducción en la formación de micotoxinas.

Agradecimientos. Financiado con el proyecto AGL2010-21623 del Ministerio de Ciencia e Innovación, con la ayuda GR10162 del Gobierno de Extremadura y FEDER. Josué Delgado es beneficiario de una beca predoctoral financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2011-043422). Rebecca A. Owens was funded by a 3U Partnership Award (<http://www.3upartnership.ie/>). Mass spectrometry facilities were funded by Science Foundation Ireland (Q-Exactive; 12/RI/2346(3)) and the Irish Higher Education Authority (Agilent Ion Trap 6340).

Desarrollo de una metodología versátil para la cuantificación de biofilms formados en superficies sólidas expuestas a interfase aire-líquido

Sònia Paytubi, Pedro Guirado, Carlos Balsalobre, [Cristina Madrid](mailto:cmadrid@ub.edu)

Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, cmadrid@ub.edu

Se ha desarrollado una nueva metodología para estudiar y cuantificar la formación de biofilm sobre superficies sólidas expuestas a una interfase aire-líquido, basada en el uso de cubetas de tinción de tipo Hellendahl como recipientes para el cultivo bacteriano. Es un sistema versátil ya que se pueden ensayar diferentes tipos de material adherente. El método desarrollado es robusto y reproducible para el estudio y cuantificación de este tipo de biofilms.

INTRODUCCIÓN

En muchos hábitats naturales, las bacterias crecen en forma de biofilms, estructuras complejas donde las bacterias están inmersas en una matriz extracelular. Estas comunidades microbianas son altamente resistentes a estreses ambientales y sustancias antimicrobianas, tales como desinfectantes y antibióticos (Donlan y col., 2002; Steenackers y col., 2012). Durante las últimas décadas, se han desarrollado nuevas estrategias anti-biofilm, centradas en el desarrollo de nuevas superficies resistentes a la adherencia de bacterias y la búsqueda de compuestos que puedan impedir la formación de biofilms o disolver biofilms ya existentes (Simões y col., 2010). Evaluar la eficiencia de los nuevos productos requiere metodologías fiables para cuantificar la producción de biofilm. En general, las diferentes bacterias pueden formar dos tipos de biofilm, biofilms en interfase aire-líquido (película) y biofilms sólido-líquido. Actualmente, los estudios de formación de película se basan mayoritariamente en la inspección visual de la película formada en la superficie de los cultivos y la comparación cualitativa entre las muestras. El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una metodología versátil para la cuantificación de biofilms formados en superficies sólidas expuestas a interfase aire-líquido.

MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología se ha desarrollado usando la cepa 3934 de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis como organismo modelo (Solano y col., 1998), así como las cepas ATCC 15692 de *Pseudomonas aeruginosa* y ATCC 6051a de *Bacillus subtilis*. Los cepas a estudiar se cultivaron en LB a 37 ° C durante 16 horas, y se utilizaron para inocular medio fresco CFA (Suzuki y col., 2002), TSB o MSgg (Connelly y col., 2004), según la cepa. La cuantificación del biofilm formado después del crecimiento estático a 25°C o 37°C durante 24, 48 y 72 h se realizó en tubos de borosilicato (16 x 100 mm, de fondo redondo) (2 ml) o en cubetas tipo Hellendahl (80 ml) que contienen tres portaobjetos (76 x 26 mm), de vidrio, acero inoxidable o silicona, sumergidos.

Tras la eliminación de la película y el medio por aspiración, los portaobjetos se lavaron en PBS y el biofilm adherido se fijó a 80°C durante 30 min. Para la medición cuantitativa de la biomasa, los portaobjetos se sumergieron 15 minutos en una solución de cristal violeta (CV, 1% w/v), se aclaró con agua y se secó al aire. A continuación, cada portaobjetos se colocó en un tubo de 50 ml que contiene 5 ml de solución de ácido acético al 30% (v/v) y se agitó vigorosamente para asegurar la solubilización completa del CV. Para solubilizar el CV de los tubos de vidrio, se añadieron 3 ml de la solución 30% de ácido acético y se agitó. Se determinó la OD_{545nm} de las soluciones resultantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hemos desarrollado un procedimiento simple y fiable para cuantificar la formación de películas sobre superficies sólidas expuestas a la interfase aire-líquido basado en el uso de una cubeta de tipo Hellendahl como recipiente de cultivo. Las superficies utilizadas para evaluar la formación de películas se proporcionan como portaobjetos que están parcialmente sumergidos en el cultivo bacteriano durante la incubación. Varios portaobjetos se pueden utilizar dentro de una cubeta de tinción, lo que permite múltiples réplicas técnicas de cada cultivo, haciendo de éste un sistema versátil para evaluar el desarrollo de películas (Fig. 1A).

Para establecer esta metodología, *Salmonella* Enteritidis 3934, fue seleccionada como organismo modelo, y se evaluó su capacidad para formar películas sobre una superficie de vidrio en contacto con la interfase aire-líquido. Los cultivos se crecieron de forma estática a 25 ° C (Hamilton y col., 2009). El biofilm se controló después de 24, 48 y 72 h de incubación. Después de 24 h de incubación se detectó una banda blanca en la superficie del vidrio (Fig. 1B) que indica la existencia de la película. El espesor de banda aumenta con el tiempo de incubación, lo que sugiere un aumento progresivo de la masa de las películas formadas. La observación visual del espesor de la banda blanca proporciona una metodología cualitativa para estudiar la formación de películas. Para la medición cuantitativa de la biomasa de

película, se realizó una tinción con cristal violeta. (Fig. 1C). Como era de esperar, los resultados obtenidos (Fig. 2A) permiten una cuantificación más precisa de la película que la observación visual. Los valores de biomasa a 24 y 48 h muestran una diferencia muy llamativa que no podía ser cuantificada fácilmente por inspección visual. Estos resultados ponen de manifiesto la conveniencia de utilizar métodos cuantitativos para estudiar la formación de películas.

Para comparar el método desarrollado con una metodología habitual, se realizó la cuantificación de biofilm formado usando tubos de borosilicato. El resultado de la cuantificación de la formación de películas se muestra en la figura 2B. En este caso se detectó una variabilidad sorprendente entre réplicas técnicas, como se muestra por los valores de la desviación estándar relativos obtenidos.

Cuando ambas metodologías se comparan (Fig. 2C), es evidente que la metodología de portaobjetos es estadísticamente más fiable que la metodología basada en tubo ya que la desviación estándar relativa con el método de portaobjetos es mucho menor que con el método basado en tubo. Se realizaron experimentos similares con bacterias formadoras de película, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. Cuando esta cepa se cultivó en TSB a 37 °C durante 24, 48 y 72 horas, se observó un biofilm claro, tanto en cubetas de tinción tipo Hellendahl (Fig. 2D) como en tubos de vidrio de borosilicato (Fig. 2E). La cuantificación de la formación de películas corrobora la alta reproducibilidad del método descrito (Fig. 2F).

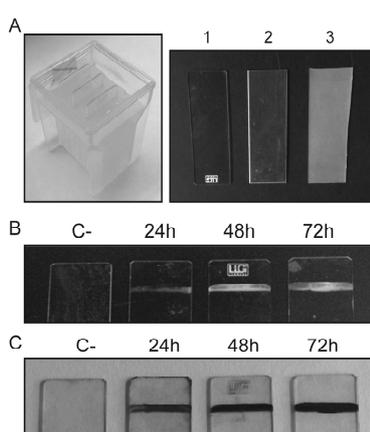


Figura 1: Método desarrollado para detectar y cuantificar la película en la interfase aire-líquido. A. Cubeta tipo Hellendahl con tres portaobjetos de vidrio que contienen el cultivo de *S. Enteritidis* 3934. Se muestran los portaobjetos de vidrio (1), acero inoxidable (2) y silicona (3). B. Biomasa adherida a la superficie de vidrio. C. Igual que en B después de la tinción con cristal violeta.

Esta metodología también se ha utilizado con éxito para detectar y cuantificar la formación de películas en portaobjetos de vidrio por un Gram positivo formador de película como *Bacillus subtilis* ATCC 6051a (datos no mostrados).

La preocupación actual sobre la evaluación del impacto clínico e industrial de los biofilms insta al desarrollo de una metodología cuantitativa y fiable para medir la formación de película en la interfase

aire-líquido. En este trabajo se describe un nuevo método para cuantificar los biofilms formados en superficies sólidas expuestas a la interfase aire-líquido usando una cubeta de tinción tipo Hellendahl. Este método i) es altamente reproducible, ii) permite poner a prueba varias réplicas técnicas para el mismo cultivo, y iii) ofrece una alta versatilidad debido a la amplia gama de materiales que potencialmente se pueden usar como superficies de unión

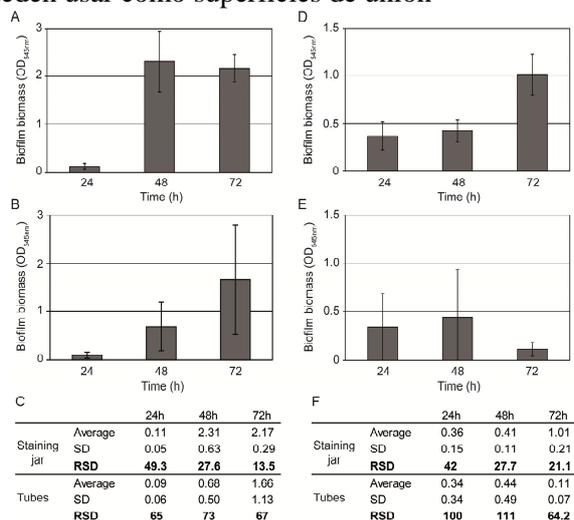


Figura 2: Cuantificación de la película formada sobre una superficie de vidrio después del crecimiento estático de *S. enterica* sv. Enteritidis 3934 (A, B, C) y *P. aeruginosa* (D, E, F), ya sea en cubetas tipo Hellendahl que contienen tres portaobjetos de vidrio sumergidos (A, D) o en tubos de vidrio (B, E). La biomasa de las películas se cuantificó después de 24, 48 y 72 h de incubación. Los datos mostrados son el promedio y desviación estándar de las muestras. C, F: resumen de los datos obtenidos en A-B y D-E, respectivamente, incluyendo la desviación estándar relativa (porcentaje del valor medio que representa la desviación estándar).

BIBLIOGRAFÍA

- Connelly, M.B., Young, G.M., Sloma, A., 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186, 4159–67.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–93.
- Hamilton, S., Bongaerts, R.J.M., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., Lappin-Scott, H.M., Hinton, J.C.D., 2009. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics* 10, 599.
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 573–583.
- Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Humphrey, T.J., Thorns, C.J., Gamazo, C., 1998. Discrimination of strains of *Salmonella enteritidis* with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. *J. Clin. Microbiol.* 36, 674–8.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45,502–531.

Análisis transcriptómico de *Escherichia coli* MG1655 tras exposición a pulsos eléctricos de alto voltaje

Beatriz Chueca¹, Rafael Pagán y Diego García-Gonzalo

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, bchueca@unizar.es

En este estudio se usaron por primera vez microarrays de DNA para estudiar el mecanismo de inactivación por pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV). Tras tratar por PEAV células de *Escherichia coli* MG1655, 47 genes mostraron una transcripción diferencial. Entre los 20 genes sobreexpresados se encuentran genes de la citocromo *bo* oxidasa (*cyoB*, *cyoC*, *cyoD*) y hemo O sintasa (*cyoE*), el operón succinato deshidrogenasa (*sdhCDAB*) y represores de la transcripción de genes *bet* y del operón *ars* (*betI* y *arsR*, respectivamente). La clasificación funcional de genes mostró la relevancia de la vía del ciclo del ácido tricarbóxico, lo que confirma el requerimiento energético tras los tratamientos de PEAV. Asimismo, experimentos de resistencia confirmaron los resultados observados con el análisis transcriptómico, mostrando la falta del fenómeno de resistencia cruzada por los tratamientos de PEAV.

INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria, los tratamientos más utilizados para inactivar microorganismos y garantizar la seguridad alimentaria son los térmicos. Como alternativa, los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV), permiten inactivar microorganismos con el mínimo impacto en las propiedades organolépticas y nutricionales (Barbosa-Cánovas y col., 1999). La mayoría de los estudios sugieren que los PEAV ejercen su acción bactericida principal en la membrana citoplasmática (García y col., 2007) con la creación de poros irreversibles (que llevan a la muerte de la célula) o reversibles (que dan lugar al daño subletal) (García y col., 2007).

La reparación de los daños subletales en esta estructura requiere producción de energía y síntesis de lípidos en *Escherichia coli* (García y col., 2007). El conocimiento del mecanismo de acción de los PEAV permitió la creación de procesos combinados (Ait-Ouazzou y col., 2012) basados en la teoría de las barreras (Leistner y col., 1995).

La era de las ómicas ha cambiado el estudio de la fisiología microbiana, introduciendo herramientas de análisis global como los microarrays de DNA (Wecke y col., 2011). Mediante el estudio y comparación de la expresión génica por análisis del transcriptoma antes y después de la exposición a los PEAV, se pueden identificar los genes sobre-expresados y reprimidos por los PEAV, y poder predecir la producción de proteínas. Todo ello permitirá mejorar el conocimiento de los mecanismos de inactivación y resistencia que las células usan para hacer frente a los tratamientos de PEAV.

El objetivo de este estudio fue investigar la respuesta transcriptómica de *E. coli* MG1655, tras un tratamiento de PEAV, mediante microarrays.

Asimismo se evaluó la contribución de la respuesta transcriptómica a la resistencia bacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de tratamiento. La cepa usada fue *Escherichia coli* MG1655. Los cultivos se obtuvieron tras la inoculación de frascos de 50 mL de Caldo Triptona Soja con 0,6% de extracto de levadura (TSBEL) (concentración inicial: 10⁴ UFC/mL) a partir de un precultivo (12-18 h/37°C) y posterior incubación bajo agitación a 37°C hasta alcanzar fase estacionaria (24 h).

Tratamientos de PEF y resistencia cruzada. Los tratamientos de PEAV se llevaron a cabo usando un equipo de pulsos de onda exponencial previamente descrito (García, y col., 2005). Tras centrifugar los microorganismos, se resuspendieron en tampón citrato-fosfato de pH 4,0. Las suspensiones se trataron durante 10 min en los que se aplicaron 50 pulsos de 20 kV/con una frecuencia de 0,08 Hz. Tras el tratamiento se extrajo el RNA. Para los experimentos de resistencia cruzada, las células tratadas por PEAV recibieron un tratamiento de calor (52°C, 10 min) y con citral (300 ppm, 30 min) o carvacrol (100 ppm, 30 min). Tras los experimentos se realizó el recuento de los supervivientes tras la siembra por homogeneización en masa en Agar Triptona Soja con 0,6% EL (TSAEL).

Análisis de transcriptómica. Se aisló el RNA mediante el RNeasy Kit (Qiagen). Posteriormente se marcó e hibridó al kit de microarrays de Agilent Microarray 8x15K, ID 020097 y se escanearon para el procesado de los datos. Se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg para mantener la probabilidad de falso positivo por debajo del 5%. Los puntos con un valor *p* ajustado < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se realizó una clasificación funcional de los genes según los datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>), usando el paquete del software Bioconductor GOSTats.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis transcriptómico tras el tratamiento de PEAV

47 genes mostraron diferencias en la transcripción tras un tratamiento de PEAV (Figura 1). Entre los 20 genes sobre expresados se encuentran genes de la citocromo *bo* oxidasa (*cyoB*, *cyoC*, *cyoD*) y hemo O sintasa (*cyoE*), el operón succinato deshidrogenasa (*sdhCDAB*) y represores de la transcripción de genes *bet* y del operón *ars* (*betI* y *arsR*, respectivamente). La clasificación funcional de genes reveló la sobreexpresión de genes correspondientes a la vía del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), que genera energía y poder reductor para la construcción de componentes o generación de ATP. Estos resultados confirmarían el requerimiento de energía para la reparación de daños subletales en la membrana citoplasmática causados por los PEAV, como describieron García y col. (2006).

La interpretación de los 27 genes reprimidos resultó más compleja debido a la naturaleza ácida del medio de tratamiento, ya que este podía causar la transcripción de proteínas del choque ácido en la muestra control. La comparación de la respuesta de las células tratadas por PEAV y las células control mostró que los genes reprimidos tras los PEAV (*amtB*, *asr*, *glnH*, *glnK*, *glnP*, *nac*) se asocian con la respuesta al choque ácido. Nuestra hipótesis es que esta respuesta está activa en las células no sometidas a PEAV y no en las tratadas. Ello podría indicar que las células tratadas por PEAV están dirigiendo su respuesta al estrés hacia la generación de energía y poder reductor, mediante el ciclo TCA.

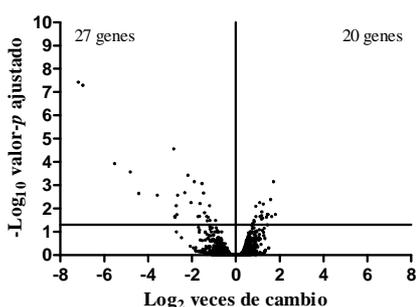


Figura 1: Volcano plot de las diferencias transcripcionales en *E. coli* MG1655 tras el tratamiento de PEAV.

Evaluación de la resistencia cruzada tras el tratamiento de PEAV

Estudios previos habían demostrado que estreses previos a los PEAV no aumentaban la resistencia microbiana frente a esta tecnología. Sin embargo, no hay estudios acerca de la inducción de resistencias

cruzadas frente a otros estreses tras el tratamiento de PEAV. Previamente se verificó que los genes de la categoría “*respuesta a estímulos*” no estaban sobreexpresados. Para estudiar este fenómeno en condiciones prácticas, tras el tratamiento de PEAV se aplicaron tratamientos de calor, citral y carvacrol. La resistencia a estos tratamientos de las células supervivientes a los PEAV no aumentó (Figura 2), tal y como se esperaba al haber observado la respuesta transcriptómica. De hecho, el tratamiento previo con PEAV redujo la resistencia a los tratamientos térmico y con citral, lo que puede atribuirse a la menor resistencia de las células dañadas como consecuencia de los PEAV.

Esta información puede permitir mejorar el diseño de nuevos procesos de conservación con PEAV.

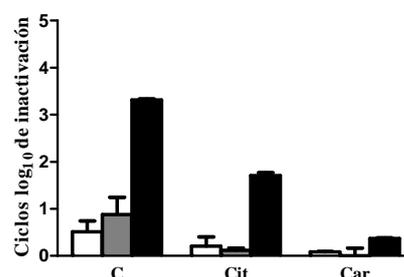


Figura 2: Ciclos \log_{10} de inactivación tras tratamientos con calor (C), citral (Cit) y carvacrol (Car). Las células se mantuvieron previamente 0 (barras blancas), 10 minutos (barras grises) o se trataron con PEAV (barras negras) en tampón de pH 4,0.

BIBLIOGRAFÍA

- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., Cherrat, L., Hassani, M., Laglaoui, A., Conchello, P., Pagán, R. 2012, Synergistic combination of essential oils from Morocco and physical treatments for microbial inactivation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 16: 283-290.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Góngora-Nieto, M.M., Pothakamury, U.R., Swanson, B.G. 1999, Preservation of foods with pulsed electric fields. San Diego, USA: Academic Press Ltd.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Raso, J., Pagán, R. 2007, Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *Int. J. Food Microbiol.*, 113:219-227.
- García, D., Gómez, N., Raso, J., Pagán, R. 2005, Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 6:388-395.
- García, D., Mañas, P., Gómez, N., Raso, J., Pagán, R. 2006, Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *J. Appl. Microbiol.*, 100:428-435.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M. 1995, Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Tech.*, 6:41-46.
- Wecke, T., Mascher, T. 2011, Antibiotic research in the age of omics: from expression profiles to interspecies communication. *J. Antimicrob. Chemother.*, 66:2689-2704.

Efecto de la bomba de exporte EfrAB en la tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos en enterococos aislados de alimentos fermentados.

Nabil Benomar, Leyre Lavilla Lerma, Antonio Sánchez Valenzuela, María del Carmen Casado Muñoz, Antonio Gálvez y Hikmate Abriouel

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén, 23071-Jaén, España, nben@ujaen.es

Las cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* aisladas de alimentos fermentados de origen animal y vegetal, han mostrado resistencia múltiple a antibióticos y tolerancia a biocidas. La susceptibilidad fue intra e inter-especie dependiente, debido a mecanismos específicos e inespecíficos como las bombas de exporte. EfrAB, miembro de la superfamilia de transportadores ABC, se detectó en el 100% de las cepas multirresistentes (MDR) de *E. faecalis* y sólo en el 12% de las cepas MDR de *E. faecium*. La expresión de EfrAB fue inducida por la mitad de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de gentamicina, estreptomycin y cloranfenicol. Sin embargo, la expresión de los genes *efrA* y *efrB* fue dependiente de la cepa ensayada y del antimicrobiano usado. Nuestros resultados indicaron a su vez, que EDTA redujo significativamente la MIC de casi todos los antimicrobianos utilizados, y que esta disminución de la MIC se ha correlacionado con la represión de la expresión de EfrAB (de 10-140 veces) en las tres cepas multirresistentes de enterococos ensayadas. Este trabajo es el primer estudio donde se describe el efecto de EfrAB en el transporte de antibióticos y biocidas lo que refleja a su vez la importancia de EfrAB en la resistencia múltiple de los enterococos. El uso de EDTA a baja concentración como conservante alimentario, podría ser una de las mejores opciones para prevenir la diseminación de enterococos multirresistentes a lo largo de la cadena de producción de alimentos mediante la disminución de la expresión de EfrAB. Por ello, EfrAB podría ser una diana atractiva, no solo en enterococos presentes en matrices alimentarias, sino también en aquellos que causan infecciones gracias al uso de EDTA como agente terapéutico en combinación con bajas dosis de antibióticos.

INTRODUCCIÓN

Los enterococos son habitantes habituales del tracto gastrointestinal de los humanos y animales, así como del tracto genitourinario, estando a su vez presentes en alimentos de origen animal, vegetal, suelos y agua. Los enterococos han emergido como importantes patógenos con un elevado nivel de resistencia a antibióticos (Murray, 2000) siendo los alimentos de origen animal un reservorio importante de múltiples resistencias (Lavilla Lerma y col., 2013) a antibióticos. Además, se han observado resistencias múltiples a biocidas usados en la desinfección de superficies en la industria alimentaria. La multirresistencia de los enterococos a antimicrobianos se ha asociado con la sobre-expresión de bombas de exporte (Putman y col., 2000), es por eso hemos investigado el efecto de la bomba de exporte EfrAB en la tolerancia/resistencia a los biocidas o antibióticos en cepas MDR de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de diferentes alimentos fermentados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Susceptibilidad fenotípica de enterococos a antibióticos y biocidas. La susceptibilidad a antibióticos de 122 cepas de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* se determinó mediante ATB ENTEROC 5 strips (BioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante. En lo referente a los

desinfectantes, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) en los enterococos de acuerdo con Fernández-Fuentes y col. (2012).

Detección de EfrAB en enterococos mediante PCR. La PCR de los genes *efrA* y *efrB* se realizó según Lee y col. (2003).

Efecto de diversos antimicrobianos en la expresión de la bomba de exporte EfrAB. Para evaluar el efecto de diversos antibióticos y biocidas en la expresión del ARNm de EfrAB, la PCR cuantitativa en tiempo real de las cepas de *E. faecalis* (qE14 y Ac8-2) y *E. faecium* (VP501) que poseen la bomba de exporte EfrAB, se llevó a cabo en ausencia o presencia de los antimicrobianos (1/2 MIC). También, hemos investigado el efecto del EDTA sobre la MIC de diversos antibióticos y biocidas en cepas MDR de enterococos. Así mismo, se determinó la expresión de EfrAB en presencia o ausencia de EDTA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Susceptibilidad a antibióticos y biocidas de cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*.

Los resultados obtenidos mostraron que todos los enterococos aislados de alimentos fermentados fueron inhibidos por bajas concentraciones de BC, HDP y CE (MICs inferiores a 0.1 mg/l), sin embargo, se observó tolerancia a CHX y TC (Fig. 1). Así, el 87.5% de las cepas de *E. faecalis* mostraron resistencia fenotípica a rifampicina (RFA), el 50% a

quinupristina/dalfopristina (QDA) y el 37,5% a ciprofloxacino (CIP) y eritromicina (ERY). Para las cepas de *E. faecium*, la resistencia fenotípica se presentó a RFA (57.5%), ERY (55.3%), CIP (29.8%), levofloxacino (LVX) (25.5%) y nitrofurantoina (FUR) (21.2%).

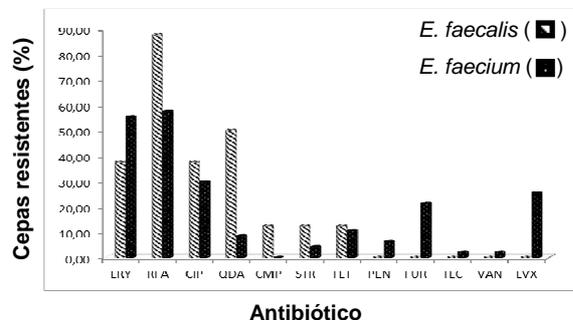


Figura 1: Incidencia de *E. faecalis* y *E. faecium* multirresistentes aislados de alimentos fermentados.

Efecto de diferentes antimicrobianos en la expresión de EfrAB en enterococos.

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la expresión de EfrAB fue altamente dependiente de la cepa bacteriana y del antimicrobiano utilizado. En este contexto, algunos antibióticos a la mitad de la MIC aumentó el nivel de expresión de los genes *efrA* y *efrB* codificadores de la bomba de exporte EfrAB, tales como fue el caso de gentamicina o estreptomycin en *E. faecalis* Ac 8-2 (Fig. 2) lo cual sugiere que la expresión de EfrAB fue inducida por los citados antibióticos.

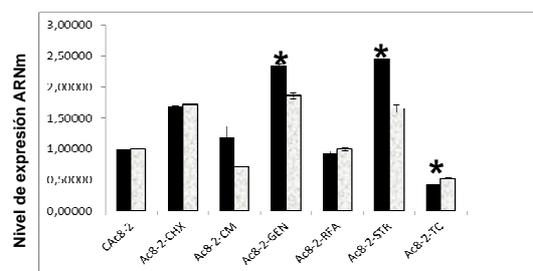


Figura 2: Efecto de la mitad de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de diferentes antimicrobianos en la expresión de los genes codificadores de la bomba de exporte EfrAB (*efrA* "barras negras" y *efrB* "barras grises") en *E. faecalis* Ac8-2

Efecto del EDTA en la actividad de EfrAB

Nuestros datos revelaron que la adición de una concentración sub-inhibitoria de EDTA redujo la MIC de casi todos los antimicrobianos utilizados (antibióticos o biocidas). Mayores reducciones de la MIC fueron observadas con gentamicina, estreptomycin, clorhexidina y triclosan (Tabla 1). Además, el EDTA inhibió significativamente la expresión de EfrAB en todas las cepas *faecalis* y

E. faecium ensayadas, así EfrA y EfrB mostraron una represión de 10-140 veces de de la expresión de los genes en presencia de EDTA (Fig.3)

Tabla 1: Efecto de EDTA en la reducción de la MIC de diferentes antimicrobianos en cepas MDR de enterococos.

Cepas	Veces de reducción de la MIC							
	CMP	ERY	GEN	RFA	STR	TET	CHX	TC
<i>E. faecalis</i> Ac 8-2	4	S	16	1	8	>4	S	S
<i>E. faecalis</i> qE-14	2	1	3500	1	6	4	S	S
<i>E. faecium</i> VP5 01	4	S	32	4	32	2	10	100

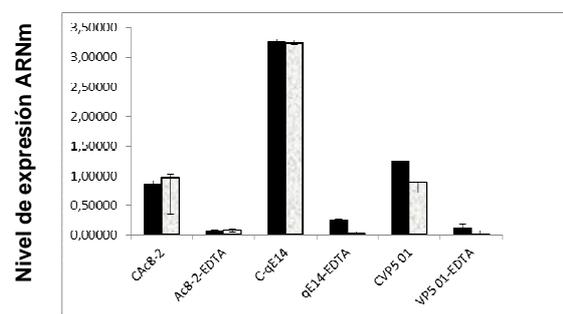


Figura 3: Efecto del EDTA en la expresión de *efrA* (barras negras) y *efrB* (barras grises) en cepas MDR de enterococos.

BIBLIOGRAFÍA

Fernández-Fuentes, M.A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., 2012. Isolation and identification of bacteria from organic foods: sensitivity to biocides and antibiotics. *Food Control* 26, 73–78.

Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Abriouel, H., 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 97–106.

Lee, E.W., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 2003b. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3733–3738.

Murray, B.E., 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* 342, 710-21.

Putman, M., van Veen, H.W., Konings, W.N., 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 672–693.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado con los proyectos AGL2009-08921, UJA2011/12/34, P08-AGR-4295, Plan propio de la Universidad de Jaén, y Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeIA3. Leyre Lavilla Lerma fue beneficiaria de una beca del Ministerio Español de Educación y Ciencia.

Resistencia a antibióticos y tolerancia a biocidas en Bacterias del Ácido Láctico aisladas a partir de aceitunas "Aloreña" fermentadas naturalmente

Nabil Benomar, María del Carmen Casado Muñoz, Leyre Lavilla Lerma, Antonio Cobo Molinos, Marina Hidalgo Pestaña, Magdalena Martínez Cañamero, Antonio Gálvez y Hikmate Abriouel

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Jaén, 23071-Jaén, España, nben@ujaen.es

Este estudio fue enfocado en el estudio de la sensibilidad a diferentes antimicrobianos en bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus pentosus*) aisladas de aceitunas verdes de mesa de la variedad "Aloreña" (provincia de Málaga, España) fermentadas de forma natural. La mayoría de los lactobacilos aislados fueron resistentes al menos a tres antibióticos y muy sensibles a biocidas (excepto el cloruro de benzalconio). Los lactobacilos fueron altamente sensibles a amoxicilina y ampicilina, y también a cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, clindamicina y eritromicina. Sin embargo, los lactobacilos se mostraron fenotípicamente resistentes a estreptomycinina, vancomicina, teicoplanina, trimetoprima/sulfometoxazol, ciprofloxacino y cefuroxima. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que todas las cepas de lactobacilos carecen de genes de resistencia a antibióticos transferibles (*cat*, *bla*, *blaZ*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/B*, *ereA*, *ereB*, *mphA*, *mefA*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(L)*, *tet(K)*, *aad(E)*, *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph(2')-Ib*, *aph(2')-Ic*, *aph(2')-Id*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *dfrA*, *dfrD*, *vanA*, *vanB*, *vanC* y *vanE*), por lo tanto la resistencia a antibióticos y tolerancia a biocidas puede deberse en parte a genes cromosómicos que codifican para bombas de exporte (NorA, MepA y MdeA). Los métodos moleculares (PCR) determinaron la ausencia de genes codificadores de posibles determinantes de resistencia transferibles relacionados con la resistencia fenotípica observada. Por consiguiente, las cepas de lactobacilos aisladas de la fermentación natural de aceitunas verdes de mesa de la variedad "Aloreña" pueden ser consideradas como seguras para una aplicación futura como cultivos iniciadores o como cepas probióticas de acuerdo con los criterios QPS (Qualified Presumption of Safety).

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del ácido láctico (BAL) han sido ampliamente ingeridas a lo largo del tiempo con los alimentos y bebidas fermentados, los cuales son considerados uno de los reservorios más importantes de los genes de resistencia a los antimicrobianos (Bautista-Gallego y col., 2013). El intercambio de genes puede potenciar la supervivencia de las BAL y de los microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal, y por lo tanto representan un riesgo importante debido a la posible diseminación de dichos genes a otras bacterias (van Reenen y Dicks, 2011). El uso indiscriminado de antibióticos en medicina humana y veterinaria durante varias décadas y el incremento en el uso de los biocidas en la industria alimentaria y sanitaria han provocado la emergencia de fenotipos de resistencia cruzada entre los compuestos antimicrobianos de importancia clínica y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia (Fraise, 2002).

El objetivo de nuestro estudio fue seleccionar cepas de BAL que carecen de genes de resistencia a antimicrobianos adquiridos para su posible uso como cultivos iniciadores o como probióticos. Para ello, se determinaron los patrones de susceptibilidad y los posibles mecanismos de resistencia/tolerancia a varios

antibióticos y biocidas en cepas de *Lactobacillus pentosus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Susceptibilidad fenotípica a antimicrobianos de *Lactobacillus pentosus*. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria o MIC de antibióticos y biocidas en 48 cepas de *Lactobacillus pentosus* aisladas de aceituna verde de mesa "Aloreña" fermentada de forma natural, de acuerdo con el estándar ISO 10932/IDF 233 (ISO 2010) y Fernández-Fuentes y col. (2012), respectivamente.

Detección de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR. Se realizaron ensayos de PCR para amplificar genes conocidos asociados con la resistencia a diferentes antibióticos. En cuanto a la resistencia fenotípica a ciprofloxacino, se estudiaron las mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR) (Hummel *et al.*, 2007). La resistencia/tolerancia a antibióticos y biocidas mediada por las bombas de exporte fue también estudiada mediante PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Susceptibilidad de las cepas de *Lactobacillus pentosus* a antibióticos.

Los resultados obtenidos mostraron que las MICs de β -lactámicos (amoxicilina y ampicilina) y clindamicina (rango de la MIC 0.002-2 μ g/ml);

cloranfenicol (rango de la MIC 0.002-4 µg/ml); gentamicina, eritromicina y tetraciclina (rango de la MIC 0.002-16 µg/ml) y kanamicina (rango de la MIC 0.002-64 µg/ml) no superaron el valor ECOFF sugerido por la European Food Safety Authority (EFSA, 2012) en la mayoría de los casos para *Lactobacillus pentosus*.

La incidencia de la resistencia fenotípica en *Lactobacillus pentosus* (Fig. 1) fue mostrada a estreptomicina, vancomicina, trimetoprima, trimetoprima/sulfometoxazol, teioplanina y ciprofloxacino entre el 70% y el 83%, y también cefuroxima (44%).

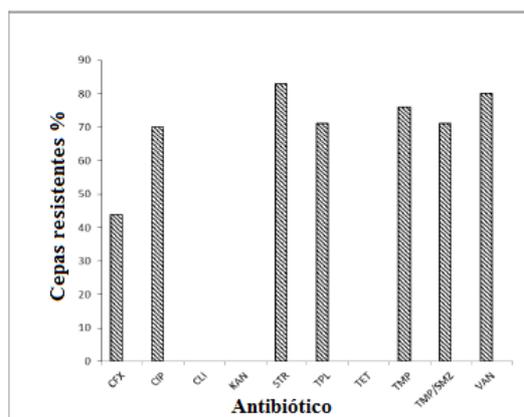


Figura 1: Incidencia de la resistencia a antibióticos de *Lactobacillus pentosus* aisladas de aceituna "Aloreña".

Susceptibilidad de las cepas de *Lactobacillus pentosus* a biocidas.

Las cepas de *Lactobacillus pentosus* son muy sensibles a la mayoría de los biocidas ensayados, siendo el más efectivo la cetrimida. La tolerancia a biocidas fue especialmente demostrada para el cloruro de benzalconio (Tabla 1).

Detección de genes de resistencia.

Los resultados obtenidos demostraron la ausencia de los genes que codifican para la resistencia a aminoglucósidos [*aad(E)*, *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph(2')-Ib*, *aph(2')-Ic*, *aph(2')-Id*, *aph(3')-IIIa* y *ant(4')-Ia*], sulfonamidas (*dfrA* y *dfrD*), y glicopéptidos [*van(A)*, *van(B)*, *van(C)* y *van(E)*] en todas las cepas de *Lb. pentosus* estudiadas. El análisis comparativo de la secuencia de amino ácidos deducida de la región altamente conservada de resistencia a quinolonas (QRDR) para las cepas de *Lb. pentosus* con fenotipos resistentes o sensibles no presentó ninguna sustitución dentro de la región QRDR de la subunidad *GyrA* de la ADN girasa (Ser-83 y Asp-87) o de la subunidad *ParC* de la topoisomerasa IV (Ser-80 y Glu-84). En cuanto a las bombas de exporte implicadas en la resistencia a los

antibióticos y la tolerancia a los biocidas (Fig. 2), *acrA* fue el determinante comúnmente más detectado (54%) seguido por *mdeA* (32%) y *norA* (22%). Sin embargo, *mepA* fue detectada solo en el 5% de las cepas de *Lb. pentosus*. Con respecto a otras bombas de exporte (*mdfA*, *norE*, *acrB*, *tolC*, *norC* y *mefA*), ninguna cepa de *Lb. pentosus* mostró resultados positivos en las reacciones de PCR.

Tabla 1: MICs de biocidas en las cepas de *Lactobacillus pentosus* aisladas de aceituna "Aloreña".

Biocida	≥0.01-≤0.1	>0.1-≤1	>1-≤5	>5-≤10
Cloruro de benzalconio	9	8	27	4
Cetrimida	4	39	5	0
Clorhexidina	12	20	16	0
Triclosan		19	29	0

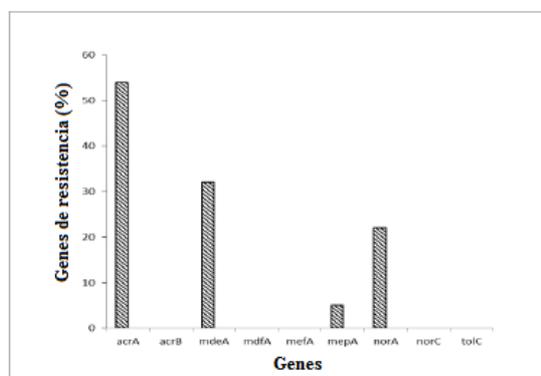


Figura 2: Incidencia de los genes que codifican bombas de exporte en *Lactobacillus pentosus* aisladas de aceituna "Aloreña".

En conclusión, las cepas de *Lb. pentosus* aisladas de aceitunas verdes de mesa "Aloreña" pueden ser consideradas como seguras dada la ausencia de determinantes de resistencia adquirida.

BIBLIOGRAFÍA

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L., 2013. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Res. Int.* 50, 135-142.

Fraise, A.P., 2002. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *J. Appl. Microbiol.* 92, 158S-162S.

Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 730-739.

van Reenen, C.A., Dicks, L.M., 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch. Microbiol.* M193, 157-168.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos UJA 2011/2012/34, AGL 2009-08921, P08-AGR-4295, Plan propio de la Universidad de Jaén y el Campus de Excelencia Agroalimentario CEIA3. Leyre Lavilla Lerma fue beneficiaria de una beca del Ministerio Español de Educación y Ciencia.

Efecto de distintos factores enológicos sobre el crecimiento de cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de mostos y vinos

L.E. Cruz-Pio, Y. Benavent-Gil, S. Ferrer e I. Pardo

ENOLAB Departamento de Microbiología i Ecología, Universitat de València, España
Liz.Cruz@uv.es, Isabel.Pardo@uv.es

La especie que mejor tolera las condiciones estresantes del vino es *O. oeni* y por ello se ha empleado para la fabricación de cultivos malolácticos comerciales. Los objetivos del presente trabajo fueron 1) evaluar el efecto de distintos valores de pH, etanol y SO₂ sobre el crecimiento de 104 cepas de la colección ENOLAB aisladas de diversas etapas de la vinificación, y 2) establecer si existen relaciones entre la capacidad para crecer en condiciones enológicas y la fase de aislamiento de las mismas: del principio o del final de la vinificación. Se determinó la resistencia o sensibilidad de las cepas a estas condiciones mediante cuantificación del crecimiento como el valor de área bajo curva (ABC) y se llevó a cabo un análisis estadístico mediante ANOVA de una vía y un *post hoc* Tukey B. Las cepas 218, 219, 223, 225, 226SM y 504 aisladas de etapas tardías de vinificación, mostraron valores de ABC más altos que la media frente al pH, etanol y SO₂. En general, las cepas aisladas de mosto mostraron menores ABC para los 3 factores ensayados. Se observó que existía una relación estadísticamente significativa entre la fase de aislamiento y la resistencia y/o sensibilidad de las cepas de *O. oeni* al pH, etanol y SO₂.

INTRODUCCIÓN

De todas las especies de bacterias lácticas asociadas a la vinificación, la especie que mejor tolera las condiciones estresantes del vino es *Oenococcus oeni* y por ello se ha empleado para la fabricación de cultivos malolácticos comerciales (Ribéreau-Gayon y col., 2006). Se ha demostrado que existe una sucesión de cepas de *O. oeni* a lo largo de la FA (Renouf y col., 2009) de manera que cepas que se hallan en mosto desaparecen en el vino y viceversa. Los principales factores que influyen en el desarrollo de *O. oeni* en vino son el pH, el etanol y el SO₂, presente en el mismo (Britz y Tracey 1990).

Los objetivos del siguiente trabajo fueron 1) evaluar el efecto de distintos valores de pH, etanol y SO₂ sobre el crecimiento de 104 cepas de la colección ENOLAB aisladas de diversas etapas de la vinificación, y 2) establecer si existen relaciones entre la capacidad para crecer en condiciones enológicas y la fase de aislamiento de las mismas: del principio o del final de la vinificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las 104 cepas de *O. oeni* estudiadas forman parte de la colección del grupo ENOLAB (Universidad de Valencia). Estas cepas proceden de mostos y de vinos. Para evaluar la capacidad de crecimiento a distintos valores de pH (2.9, 3.2, 3.5, 3.7 y 4.0), concentraciones de etanol (10, 12, 14, 15 %) y SO₂ (0, 30, 40, 50, 60 y 70 mg/L) se utilizó un vino sintético descrito por Cruz-Pio (2012). Previamente a la inoculación, las cepas se preadaptaron al vino creciéndolas en el medio descrito por Berbegal (2014). La condición estándar con la que se compararon los crecimientos en las condiciones de ensayo fue un vino con 10 % de etanol, pH

3.7 y 0 mg/L de SO₂. El nivel del inóculo fue del 1 % y se incubaron a 28 °C durante 12 días. El crecimiento se cuantificó espectrofotométricamente a 600 nm cada 3 días. Los valores de D.O. obtenidos se transformaron en valores de Área Bajo la Curva (ABC) utilizando el software GraphPad Prism. Este método se basa en el cálculo del área total que hay debajo de la curva de crecimiento (Gagnon y Peterson 1998). Para el análisis estadístico, se utilizó el software IBM SPSS19. Las diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.05$) entre las medias de cada valor ABC en cada condición de estudio se corroboraron con un ANOVA y el *post hoc* Tukey B. Además, para conocer qué variables explican resultados, se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen diferencias importantes entre las cepas en la capacidad de crecimiento en etanol, pH y SO₂ de las cepas. La mayoría de ellas fueron capaces de crecer en todas las concentraciones de etanol ensayadas, aunque el valor de ABC disminuía conforme aumentaba la concentración del mismo. Un efecto similar encontraron García-Alegría y col. (2004) al estudiar cepas de la misma especie. En cuanto al efecto de SO₂ las cepas fueron capaces de crecer sólo hasta una concentración de 50 mg/L de SO₂. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por Guzzo y col. (1998) quienes reportaron que *O. oeni* era capaz de sobrevivir a concentraciones de entre 30 y 50 mg/L de SO₂. Además, a medida que la concentración de SO₂ se incrementaba se observó una disminución del valor de ABC de *O. oeni*. En cuanto al factor pH, nuestras cepas mostraron menores valores de ABC a los pH más ácidos. Nuestros resultados coinciden con los

obtenidos por Guzzo y col. (2002) y Guzzon y col. (2009) quienes observaron un crecimiento limitado de *O. oeni* a pH menores a 3.5. Las cepas que mostraron mayores valores de ABC frente al etanol, pH y SO₂ fueron la 219, 218, 226SM, 225, 223A y 504, procedentes de vino. Y la que exhibió menores valores de ABC fue la FS24, procedente de mosto.

A los valores de pH más bajos (2.9 y 3.2), concentraciones más altas de etanol (14 y 15 %) y SO₂ (60 y 70 mg/L) ejercen el efecto inhibitor sobre el crecimiento de las cepas aisladas de mostos (Los datos no se muestran). Los resultados del ACP observamos que los componentes 1, 2 y 3 explican conjuntamente el 95.5 % de la varianza total de los datos de ABC de las cepas de mosto, aunque la contribución de cada componente es diferente (Figura 1).

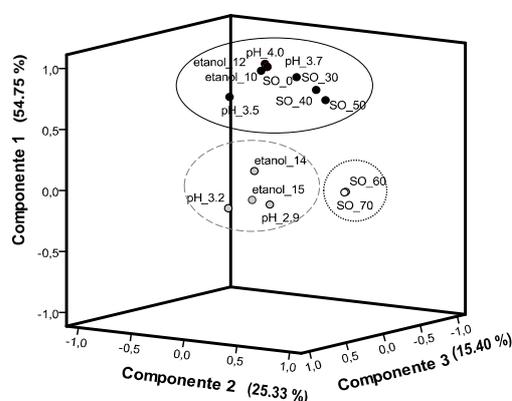


Figura 1: Representación gráfica del efecto de 15 condiciones de ensayo sobre las cepas de *O. oeni* procedentes de mostos en el espacio factorial rotado. Componente 1 (●); Componente 2 (○); Componente 3 (○).

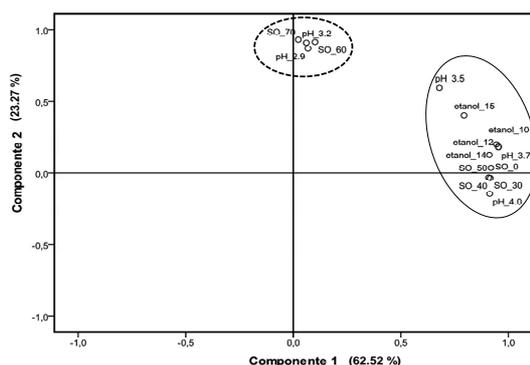


Figura 2: Gráfico de componentes rotados del efecto de 15 condiciones de ensayo sobre las cepas de *O. oeni* procedentes de vinos. Componente 1 (○); Componente 2 (○).

En cuanto a las cepas aisladas de vinos, el crecimiento se ve muy limitado a los valores más bajos de pH (2.9 y 3.2) y en las más altas concentraciones de SO₂ (60 y 70 mg/L). Además parece que el etanol compromete menos el

crecimiento de este grupo de cepas que el de las de mostos (los datos no se muestran). Los resultados del ACP observamos que los componentes 1 y 2 explican conjuntamente el 85.8 % de la varianza total de los datos de ABC (Figura 2).

En general las cepas más resistentes a los parámetros ensayados pertenecen al estadio tardío de la vinificación como se puede apreciar en la Figura 3, donde el ACP crea 2 nuevas variables que explican la variación de los valores de ABC de las cepas de *O. oeni* en las condiciones ensayadas. No existen cepas que resistan igualmente bien al etanol, pH bajos y al SO₂. Ello se confirma porque en la Figura 3 aparece una zona (sombreada en la figura) vacía de cepas en los espacios que corresponden a pH bajos (valores altos del factor 2), altas concentraciones de etanol y SO₂ (valores altos del factor 1).

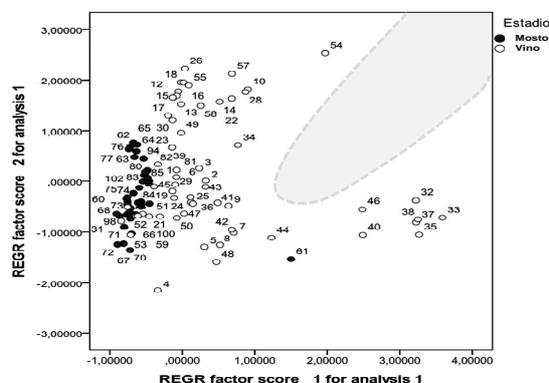


Figura 3: Representación gráfica de 2 nuevas variables creadas por el ACP que explican la variación en el crecimiento de las cepas de *O. oeni* procedentes de estadios tempranos (mostos) y tardíos (vinos).

Agradecimientos. Ministerio de Ciencia e Innovación proyecto RM2010-00001-00-00 y Generalitat Valenciana Programa Santiago Grisolia/2011/001 por la financiación del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Berbegal, C. 2014. Tesis Doctoral Universidad de Valencia.
 Britz y Tracey 1990. J. Appl. Bact. 68: 23-31.
 Cruz-Pio, L. E., 2012. Tesis de Máster en Biología Molecular Celular y Genética. Universidad de Valencia.
 Gagnon, R. and J. Peterson. 1998, J. Pharm. Pharm. 26: 87-102.
 García-Alegria y col., 2004. FEMS Microbiol. Lett. 230: 53-61.
 Guzzo y col., 1998. FEMS Microbiol. Lett. 160: 143-147.
 Guzzo y col., 2002. Sci. Alim. 22:107-111.
 Guzzon y col., 2009. S. Afr. J. Enol. Vitic. 30: 133-141.
 Reguant y col., 2005. FEMS Microbiol. Lett. 246: 111-117.
 Renouf y col., 2009. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83, 85-97.
 Ribéreau-Gayon y col., 2006. En: Handbook of Enology. Vol. 1 (2^{da} ed.) Wiley, England.

Efecto de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento de las bacterias acéticas

Florencia Sainz, Albert Mas y M^a Jesús Torija

Biología Enológica. Dept. Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia. Universitat Rovira i Virgili. C/ Marcel·li Domingo s/n. 43007. Tarragona, España. 977558855. fsainzperes@gmail.com

Las bacterias acéticas (BA) se consideran microorganismos “fastidiosos” debido, entre otras razones, a los problemas para su aislamiento y crecimiento en medios de cultivo. Esto, unido a la escasa información que existe sobre los requerimientos nutricionales de las mismas dificulta enormemente su estudio. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento de las BA e intentar establecer qué fuentes de nitrógeno favorecen el crecimiento de las BA. Para ello, se monitorizó el crecimiento de diferentes cepas de BA en medios con diferentes fuentes de nitrógeno, comparando el crecimiento en medios con un único aminoácido o amonio respecto a un medio completo (amonio + todos los aminoácidos). Los resultados mostraron cómo el crecimiento es muy dependiente de la fuente nitrogenada utilizada, observándose diferencias muy significativas entre los diferentes aminoácidos, pero también altamente relacionado con la cepa utilizada, ya que cepas de la misma especie presentaban comportamientos muy divergentes en la misma fuente de nitrógeno. Por tanto, estos resultados muestran la importancia de la composición nitrogenada de los medios de cultivo para favorecer el crecimiento óptimo de estas bacterias.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias acéticas (BA) pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* y son clasificadas en trece géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Granulibacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Swaminatania*, *Saccharibacter*, *Acidomonas*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea* y *Komagatabacter*.

Son microorganismos Gram-negativos o Gram-variables, de forma cilíndrica o elipsoidal y suelen encontrarse en pares o de forma aislada. Se caracterizan por ser estrictamente aerobias, presentando un metabolismo exclusivamente respiratorio, con el oxígeno como aceptor final de electrones. En la naturaleza pueden ser encontradas en una amplia variedad de ambientes, principalmente en substratos azucarados o con presencia de alcohol, como flores, frutas, bebidas fermentadas o alimentos (Guillamón y Mas, 2011).

Las BA tienen la capacidad de oxidar de forma incompleta y rápida un gran número de carbohidratos y alcoholes, produciendo en el medio una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales, lo que las convierte en bacterias interesantes desde un punto de vista biotecnológico.

Uno de los mayores problemas que existe en el estudio de las BA es la dificultad que hay en su aislamiento y crecimiento en medios de cultivo, sobre todo cuando provienen de medios extremos como pueden ser el vino o el vinagre (Torija y col, 2010). Esto unido a la falta de información que existe sobre los requerimientos nutricionales de las mismas (Guillamón y Mas, 2011) nos ha llevado a la realización de este trabajo, donde el objetivo fue estudiar el efecto de las fuentes nitrogenadas en el

crecimiento de las BA, además de establecer qué fuente nitrogenada favorece su crecimiento en un medio de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas utilizadas. En este estudio se analizaron 3 cepas, dos de la especie *Gluconobacter japonicus* (CECT 8443 y LMG 1373) y una de *Acetobacter malorum* (CECT 7749). El crecimiento de las bacterias se realizó en medio GY líquido, 1% de extracto de levadura (Cultimed, Barcelona, España) y 5% de glucosa (Panreac, Barcelona, España) e incubándose a 28°C con agitación.

Medios. El efecto de la fuente nitrogenada en el crecimiento de las cepas se analizó en mosto sintético (Riou y col, 1997) al que se le modificó la concentración de azúcares (5% (p/v) (2,5% (p/v) glucosa + 2,5% (p/v) fructosa)) y nitrógeno. La concentración de nitrógeno del mosto se fijó a 25 mg/L N, añadiéndose en diferentes formas a) solución completa de amonio y aminoácidos; b) un único aminoácido; c) amonio.

Los aminoácidos fueron preparados a una concentración de 2,5 g/L N para después utilizar la cantidad necesaria en cada medio. Los aminoácidos utilizados fueron: alanina (ALA); arginina (ARG); asparragina (ASN); ácido aspártico (ASP); cisteína (CYS); fenilalanina (PHE); ácido gamma-aminobutírico (GABA); glicina (GLY); ácido glutámico (GLU); glutamina (GLN); histidina (HIS); isoleucina (ILE); leucina (LEU); lisina (LYS); metionina (MET); ornitina (ORN); prolina (PRO); serina (SER); treonina (THR); triptófano (TRP) y valina (VAL).

Ensayos. La densidad óptica (DO; 600nm) inicial de los cultivos se ajustó a 0,1. Los ensayos se realizaron en un lector de microplacas SpectroStart Nano (BMG-LABTECH) a 28°C. La absorbancia se midió durante 200 ciclos, haciendo una agitación de 80 segundos a 500rpm antes de cada lectura. Para la representación de los crecimientos, la DO se normalizó dividiendo los valores de

cada cepa por su DO inicial, de forma que todas las gráficas empezaban en DO=1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estudiar el efecto de las diferentes fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento de las BA, primero se estableció un medio control donde las cepas presentarían un crecimiento correcto, que en nuestro caso fue mosto sintético completo con 25 mg/L N (a).

Las tres cepas mostraron un crecimiento distinto (Figura 1). CECT 7749 presentó un mayor crecimiento pero también una fase de latencia más larga que las otras dos cepas. En cambio, LMG 1373 fue la cepa que creció menos, sólo triplicando su DO inicial.

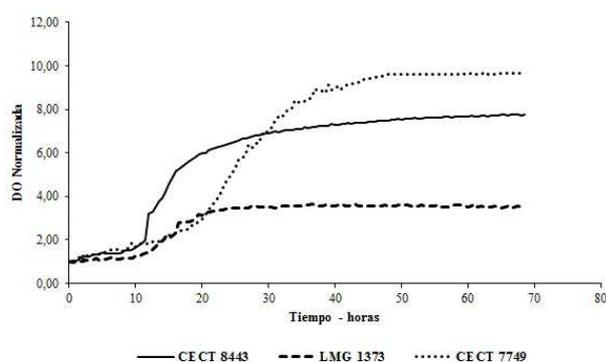


Figura 1: Crecimiento de CECT 8443; LMG 1373 y CECT 7749 en mosto sintético completo.

En el segundo ensayo se probó el efecto de los aminoácidos/amonio de forma individual sobre el crecimiento de las cepas. Cuando se monitorizó el crecimiento de la cepa CECT 8443 con ASN, MET o TRP se observó que el crecimiento era mayor que cuando crece en mosto sintético completo (Figura 2).

En cambio, cuando la única fuente nitrogenada en el medio era GABA, GLY, GLU, HIS o LYS la cepa no creció. Por su parte, la cepa CECT 7749 solamente creció en el mosto sintético cuando la única fuente nitrogenada era NH_4^+ ; ASN; CYS; PHE; GLY; GLN; ILE; MET o SER, aunque su crecimiento siempre era menor que en el mosto sintético completo. Al igual que la cepa CECT 8443, la cepa de CECT 7749 crecía muy bien cuando su única fuente nitrogenada era el TRP, mostrando un crecimiento similar al mosto sintético completo.

En el caso de la cepa LMG 1373, cuando se utilizaba una única fuente nitrogenada la cepa no creció, presentando un crecimiento inferior al que mostraba con mosto sintético completo, lo que nos hace pensar que tal vez esta cepa necesitaba una concentración más elevada de nitrógeno en el medio.

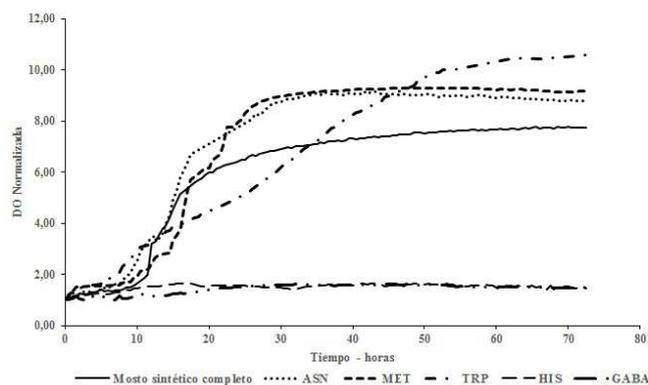


Figura 2. Crecimiento de la cepa CECT 8443 en mosto sintético completo y con un único aminoácido.

Los resultados obtenidos confirman lo previamente descrito, que la presencia de aminoácidos en el medio puede estimular o inhibir el crecimiento, y que todo depende del aminoácido que se utilice (Guillamón y Mas, 2011). Según Belly y Claus (1972), la presencia de GLN, PRO e HIS en el medio estimulaba el crecimiento de las BA, mientras que en otros estudios realizados durante la producción de vinagre (Maestre y col, 2008), se observó que las BA presentaban preferencia por la PRO abundante en vinos, debido a que las levaduras no la utilizan en el proceso fermentativo. Además, se trata de un efecto que parece cepa dependiente, por lo que más cepas y diferentes especies deben ser estudiadas para saber si hay una característica típica de la especie o es totalmente dependiente de cepa.

BIBLIOGRAFÍA

- Guillamón, J.M., Mas, A. 2011, Acetic Acid Bacteria. En: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*, Elsevier, pp. 227-253.
- Belly, R.T., Claus, G.W. 1972, Effect of amino acids on the growth of *Acetobacter suboxydans*. *Arch. Microbiol.* 83: 237-245.
- Maestre, O., Santos, M.I., Dueñas, S., Peinado, R., Jimenez-Ot, C., García-García, I., Mauricio, J.C. 2008, Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a automatic pilot acetator. *Process Biochemistry.* 43: 803-807.
- Riou, C., Nicaud, J.M., Barre, P. and Gaillardin, C. 1997, Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast* 13, 903-915.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. 2010, Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 27,257-265.

Agradecimientos. El presente trabajo forma parte del Proyecto AGL 2010-22152-C03- 02 financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Florencia Sainz disfruta de una beca FI-DGR 2013 financiada por la Generalitat de Catalunya.

Variación en los parámetros estructurales cuantitativos de los *biofilms* producidos por diferentes serotipos de *Salmonella*

Carlos Alonso-Calleja^{1,2}, Félix Riesco-Peláez³, Alicia Alonso-Hernando^{1,2} y Rosa Capita^{1,2}

¹ Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España, carlos.alonso.calleja@unileon.es

² Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, España

³ Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Sistemas y Automática, Universidad de León, España

La capacidad de las bacterias patógenas para formar biopelículas o *biofilms* es un motivo de preocupación en el escenario de la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria. Se estudiaron los *biofilms* producidos por 30 cepas de *Salmonella* de origen cárnico pertenecientes a 15 serotipos diferentes. Para determinar la influencia del serotipo en la capacidad de las cepas para formar *biofilms* se compararon cuatro parámetros estructurales (biovolumen -volumen ocupado por las células de *Salmonella* en la superficie observada: $4.161 \mu\text{m}^2$ -, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad -estimación de la variación en el grosor del *biofilm*-) de las imágenes tridimensionales de los *biofilms* obtenidas por microscopía láser confocal de barrido. Todas las cepas formaron *biofilms*, influyendo el serotipo ($P < 0,001$) en los cuatro parámetros estudiados. El biovolumen osciló entre $1.027,60 \pm 563,69 \mu\text{m}^3$ (*Salmonella enterica* serotipo Typhimurium variante monofásica 1,4,[5],12:i:-) y $54.358,22 \pm 28.149,72 \mu\text{m}^3$ (*S. Agona*). El porcentaje de superficie cubierta, la altura máxima y la rugosidad variaron entre $2,29 \pm 0,84\%$ (*S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-) y $46,25 \pm 19,67\%$ (*S. Newport*), entre $20,83 \pm 4,88 \mu\text{m}$ (*S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-) y $44,50 \pm 7,67 \mu\text{m}$ (*S. Livingstone*), y entre $0,664 \pm 0,134$ (*S. Virchow*) y $0,971 \pm 0,158$ (*S. Livingstone*), respectivamente. La gran variabilidad observada aconseja incrementar los recursos destinados por la Industria Alimentaria para la eliminación de *Salmonella* cuando están presentes serotipos con elevada capacidad para formar *biofilms*.

INTRODUCCIÓN

En al año 2012 se registraron en la Unión Europea (UE) un total de 91.034 casos confirmados de salmonelosis humana, siendo, por detrás de la campilobacteriosis, la enfermedad zoonótica con mayor número de registros (EFSA, 2014).

Si bien hay diferentes rutas de infección, más del 95% de los casos de enfermedad humana se producen por el consumo de alimentos contaminados. Durante 2012, *Salmonella* fue responsable de 1.533 brotes de enfermedad transmitida por alimentos en la UE, siendo el agente etiológico implicado con mayor frecuencia en dichos procesos (28,6% de todos los brotes registrados) (EFSA, 2014).

La presencia de *biofilms* en las superficies de las industrias alimentarias aumenta el riesgo de contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos (p. ej. *Salmonella*) y alterantes, con el consiguiente impacto sanitario y económico (Díez-García y col., 2012).

Los *biofilms* producidos por *Salmonella* han sido objeto de estudio por diferentes autores. Sin embargo, es muy limitado el número de trabajos que comparan la capacidad de diferentes serotipos de *Salmonella* para formar *biofilms*, y en dichos estudios no se ha realizado el análisis cuantitativo de las imágenes tridimensionales de estas estructuras. El objetivo de esta investigación ha sido determinar la influencia del

serotipo en la capacidad de *Salmonella enterica* para formar *biofilms* y realizar un análisis cuantitativo de los principales parámetros estructurales de los *biofilms* producidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 30 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de carne de ave, dos cepas de cada uno de los siguientes serotipos: *Salmonella enterica* serotipo Agona, *S. Brandenburg*, *S. Cerro*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Indiana*, *S. Infantis*, *S. Kentucky*, *S. Livingstone*, *S. London*, *S. Newport*, *S. Ohio*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* variante monofásica 1,4,[5],12:i:- y *S. Virchow*.

Para la formación y visualización de los *biofilms* se siguió el procedimiento descrito con anterioridad (Capita y col., 2014). El análisis de los parámetros estructurales de los *biofilms* se realizó mediante una aplicación informática desarrollada por nuestro grupo de investigación (BioRCA 1.3). Se determinaron el biovolumen (μ^3), el porcentaje de superficie cubierta, la altura máxima (μ) y el coeficiente de rugosidad (indicador de la variación en el grosor del *biofilm*). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), con separación de medias mediante la prueba de rango múltiple de Duncan (Statistica 8.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas de *Salmonella* formaron *biofilms* en las superficies de poliestireno utilizadas. Este es un hallazgo preocupante ya que este material plástico es

ampliamente empleado a lo largo de la cadena alimentaria. Además, la formación de *biofilms in vitro* está directamente relacionada con la capacidad para formar estas estructuras en las distintas superficies de las industrias de alimentos (Díez-García y col., 2012).

Se observaron amplias diferencias entre los *biofilms* formados por los distintos serotipos de *Salmonella* (Figura 1). Estos resultados son coincidentes con los de Patel y Sharma (2010), quienes pusieron de manifiesto que la capacidad de adhesión y posterior formación de *biofilms* de las cepas de *Salmonella* difiere entre serotipos, constituyendo esta capacidad un factor de virulencia.

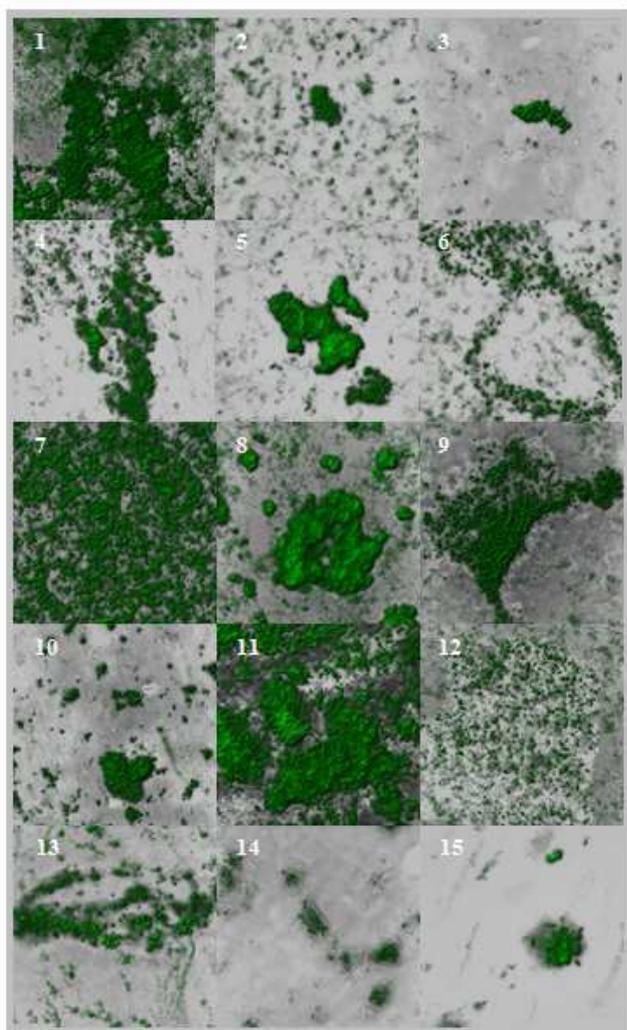


Figura 1: Imágenes tridimensionales de los biofilms producidos por diferentes serotipos de *Salmonella enterica*. 1, *Salmonella enterica* serotipo Agona; 2, *S. Brandenburg*; 3, *S. Cerro*; 4, *S. Enteritidis*; 5, *S. Hadar*; 6, *S. Indiana*; 7, *S. Infantis*; 8, *S. Kentucky*; 9, *S. Livingstone*; 10, *S. London*; 11, *S. Newport*; 12, *S. Ohio*; 13, *S. Typhimurium*; 14, *S. Typhimurium* variante monofásica 1,4,[5],12:i:-; 15, *S. Virchow*.

El análisis estadístico de los datos puso de manifiesto la influencia del serotipo ($P < 0,001$) en los cuatro parámetros examinados. El biovolumen osciló entre $1.027,60 \pm 563,69 \mu\text{m}^3$ (*Salmonella enterica*

serotipo *Typhimurium* variante monofásica 1,4,[5],12:i:-) y $54.358,22 \pm 28.149,72 \mu\text{m}^3$ (*S. Agona*). Por su parte, el porcentaje de superficie cubierta, la altura máxima y la rugosidad variaron entre $2,29 \pm 0,84\%$ (*S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-) y $46,25 \pm 19,67\%$ (*S. Newport*), entre $20,83 \pm 4,88 \mu\text{m}$ (*S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-) y $44,50 \pm 7,67 \mu\text{m}$ (*S. Livingstone*), y entre $0,664 \pm 0,134$ (*S. Virchow*) y $0,971 \pm 0,158$ (*S. Livingstone*), respectivamente.

Los tres serotipos que formaron *biofilms* con mayor biovolumen fueron, en este orden, *S. Agona*, *S. Newport* ($48.070,41 \pm 33.720,74 \mu\text{m}^3$) y *S. Infantis* ($39.661,96 \pm 16.789,32 \mu\text{m}^3$). Este es un hecho preocupante ya que estos serotipos se encuentran entre los implicados con mayor frecuencia en casos de salmonelosis humana en la UE (Díez-García y col., 2012; EFSA, 2014). Por otro lado, es de destacar la escasa capacidad formadora de *biofilms* de la variante monofásica de *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-, serotipo de creciente protagonismo que ha llegado a convertirse en el tercer agente etiológico de salmonelosis humana en la UE, tras *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (EFSA, 2014).

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la necesidad de implementar adecuados Planes de Limpieza y Desinfección como parte de los Sistemas de Autocontrol en las industrias de alimentos con el objetivo de prevenir la formación de *biofilms*. Esta afirmación adquiere especial relevancia cuando se detectan cepas pertenecientes a serotipos con elevada capacidad para formar *biofilms*.

BIBLIOGRAFÍA

- EFSA (European Food Safety Authority). 2014. Scientific Report of EFSA and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12:3547-3858.
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilms, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:1268-1280.
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 31:173-180.
- Patel, J., Sharma, M. 2010. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* 139:41-47.

Agradecimientos. Este estudio ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-29645).

Papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la superficie celular en la adaptación a biocidas de bacterias Gram-negativas

Alicia Alonso-Hernando^{1,2}, Emilia Guerrero-Ramos³, Rosa Capita^{1,2} y Carlos Alonso-Calleja^{1,2}

¹ Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España, carlos.alonso.calleja@unileon.es

² Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, España

³ Servicio Territorial de Sanidad y Bienestar Social de Valladolid, Junta de Castilla y León, España

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la capacidad de *Escherichia coli* para adaptarse a concentraciones crecientes subinhibitorias de tres biocidas de amplio uso en la Industria Alimentaria: fosfato trisódico (FTS), nitrito sódico (NS) e hipoclorito sódico (HIP). La capacidad de adaptación se estimó mediante la determinación de los parámetros de crecimiento microbiano (ecuación de Gompertz modificada): fase de latencia, ritmo máximo de crecimiento y densidad óptica en la fase estacionaria. Se estudió el papel de las bombas de expulsión (en presencia del inhibidor CCCP [carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona]) y de los cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular (ensayo de adhesión microbiana a solventes) en la adaptación bacteriana. Tras exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas, *E. coli* mostró una mayor tolerancia a estos compuestos, especialmente al NS y al HIP. Esta tolerancia fue estable, permaneciendo tras 7 pases en medio de cultivo sin biocidas. Se observó asimismo adaptación cruzada entre los biocidas NS e HIP. Tanto las bombas de expulsión como los cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular estuvieron asociados con la adaptación a ambos compuestos. Estos resultados sugieren que la exposición bacteriana a dosis subinhibitorias de biocidas en la Industria Alimentaria representa un peligro asociado al desarrollo de adaptación y adaptación cruzada a dichos compuestos.

INTRODUCCIÓN

Los biocidas son compuestos de amplio uso en la Industria Alimentaria como aditivos (p. ej. fosfato trisódico o nitrito sódico), descontaminantes de la carne (fosfato trisódico) o desinfectantes (hipoclorito sódico). En los últimos años ha aumentado la preocupación en relación con la potencialidad de los microorganismos para incrementar su tolerancia a los biocidas como mecanismo de adaptación, especialmente en ciertas situaciones en que las bacterias son expuestas a concentraciones subletales de los compuestos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Una reducción de la susceptibilidad microbiana a los biocidas supone un importante desafío para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, pues contribuye a la persistencia de los microorganismos a lo largo de la cadena alimentaria. Además, en este contexto, se ha sugerido que las respuestas de adaptación microbiana a un biocida pueden provocar una susceptibilidad reducida a otros biocidas (adaptación cruzada o protección cruzada).

El objetivo de este trabajo ha sido determinar si la exposición de *Escherichia coli* a concentraciones subinhibitorias de fosfato trisódico (FTS), nitrito sódico (NS) e hipoclorito sódico (HIP) provoca la adaptación de las células, y si esta adaptación se asocia con una protección cruzada a otros biocidas. Se ha pretendido también estudiar la influencia de las

bombas de expulsión y de las modificaciones de la superficie celular en esta adaptación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo con la cepa *Escherichia coli* ATCC 12806. Inicialmente se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cada uno de los compuestos utilizando el método de microdilución en caldo con ayuda de un **Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.)**. Posteriormente las células se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas (Molina-González y col., 2014).

Se confeccionaron curvas de crecimiento (densidad óptica [DO₄₂₀₋₅₈₀]; **Bioscreen C**) para todos los grupos de células (no adaptadas y adaptadas) en ausencia y en presencia (MIC/2) de los biocidas (16 condiciones). El ajuste de los datos a una curva sigmoidea se realizó con la ecuación de Gompertz modificada (Garthright, 1991). Para determinar la actividad de las bombas de expulsión se empleó el inhibidor carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP; concentración final 50 µM; Sigma-Aldrich). Los parámetros de crecimiento microbiano (fase de latencia [L], ritmo máximo de crecimiento [µ] y DO en la fase estacionaria) de *E. coli* se determinaron para cada condición tanto en ausencia como en presencia de CCCP.

La hidrofobicidad de la superficie celular de los distintos grupos de células se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a solventes no polares (xileno) (Capita y col., 2014). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

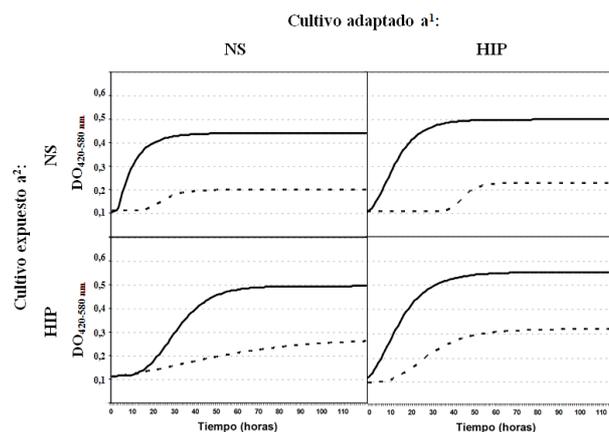
Las MICs antes de la adaptación fueron: 10,428 mg/mL (FTS), 14,876 mg/mL (NS) y 0,239 mg/mL (HIP). Tras la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas, las máximas concentraciones de compuestos que permitieron el crecimiento microbiano fueron: 11,731 mg/mL (FTS), 37,655 mg/mL (NS) y 0,403 mg/mL (HIP). La estabilidad de la adaptación se determinó realizando cada 24 horas pases en caldo de cultivo sin biocidas. La susceptibilidad reducida se mantuvo al cabo de siete días en el caso de las células adaptadas a NS o HIP.

La presencia de biocidas provocó un incremento ($P < 0,05$) de L y un descenso ($P < 0,05$) de μ y de la DO en la fase estacionaria en las células no adaptadas. La adaptación previa de *E. coli* a NS o HIP favoreció el crecimiento de la cepa en caldo de cultivo con los biocidas. Así, en presencia de NS, las células previamente adaptadas a este compuesto mostraron menores valores de L ($2,910 \pm 0,571$ h) y mayores valores de μ ($0,044 \pm 0,002 \Delta DO/h$) que las células no adaptadas ($18,782 \pm 15,159$ h y $0,006 \pm 0,001 \Delta DO/h$, respectivamente). Por su parte, las células previamente adaptadas a HIP presentaron los menores valores de L ($-0,662 \pm 2,534$ h) y los mayores valores de μ ($0,018 \pm 0,004 \Delta DO/h$) en presencia de HIP. La adaptación al FTS no modificó los parámetros de crecimiento microbiano en relación con los cultivos no adaptados.

La exposición de *E. coli* a concentraciones crecientes subinhibitorias de NS o HIP provocó una respuesta de adaptación cruzada, mostrando las células adaptadas a estos compuestos los mayores valores de μ y DO en la fase estacionaria en presencia de cualquiera de los dos biocidas.

Las células no adaptadas y no expuestas a biocidas mostraron diferencias mínimas en los parámetros de crecimiento en presencia y en ausencia de CCCP. Sin embargo, la adición del inhibidor de las bombas de expulsión tuvo un efecto marcado en el caso de las células adaptadas a NS o HIP y crecidas en presencia de dichos compuestos, observándose un incremento de L y un descenso de μ en presencia de CCCP (Figura 1).

Se encontraron importantes diferencias en la hidrofobicidad de los distintos grupos de células (el porcentaje de afinidad al xileno osciló entre $4,48 \pm 0,31\%$ y $65,32 \pm 3,39\%$), observándose los mayores valores en las células adaptadas y/o expuestas al NS o al HIP. Estos resultados sugieren el papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular en la adaptación de *E. coli* a ambos biocidas.



¹, para la adaptación, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas; ², las curvas de crecimiento se elaboraron en presencia de biocidas (concentración MIC/2). NS, nitrito sódico; HIP, hipoclorito sódico. Las líneas continuas corresponden al crecimiento en ausencia de CCCP (carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona); las líneas discontinuas corresponden al crecimiento en presencia de CCCP (50 µM).

Figura 1: Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 12806 en diferentes condiciones.

El aumento, estable en el tiempo, de la tolerancia a NS e HIP es un resultado de interés dado el uso frecuente de estos biocidas en la Industria Alimentaria y la posibilidad de su empleo a concentraciones subinhibitorias (p. ej. almacenamiento incorrecto, concentración errónea, distribución inadecuada, cantidad excesiva de materia orgánica, uso combinado de tratamientos de conservación a dosis bajas) (Capita y col., 2014). Así, es posible que las industrias de alimentos constituyan un ambiente favorecedor de la tolerancia adaptativa a los biocidas, hecho que puede aumentar la probabilidad de contaminación de los alimentos. Estos resultados sugieren que el empleo de biocidas a concentraciones subinhibitorias podría representar un riesgo para la Salud Pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Capita, R., Alonso-Calleja, C. 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53:11-48
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilms, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:1268-1280.
- Garthright, W.E. 1991. Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiol.* 8:239–248.
- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. 2014. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* 40:329-334.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-29645).

Biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus*: desarrollo e inhibición mediante compuestos constituyentes de aceites esenciales

Laura Espina¹, Daniel López², Rafael Pagán¹ y Diego García-Gonzalo¹

¹ *Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, espina@unizar.es*

² *Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg, Alemania*

El creciente riesgo que supone la presencia de biopelículas de *Staphylococcus aureus* en la industria alimentaria, debido en parte a la expansión de las resistencias a antibióticos, ha incrementado la necesidad de buscar nuevos métodos para su control. El uso de aceites esenciales o sus compuestos constituyentes (CCs) en la inhibición de la formación de las biopelículas puede suponer una alternativa prometedora al empleo de desinfectantes químicos tradicionales. En este trabajo, se probó la eficacia de los CCs carvacrol, citral y (+)-limoneno en la inhibición de la formación de biopelículas de dos cepas de *S. aureus*: SC-01 y Newman. La determinación de la actividad inhibitoria de los CCs sobre la formación de biopelículas después de 24 h de incubación, tal y como se realiza frecuentemente, se complementó con el estudio de la evolución del grosor de las biopelículas durante su formación. Este estudio no sólo permitió observar un patrón cíclico de crecimiento de biopelículas diferente para ambas cepas, sino que también reveló una importante relación entre el estadio de la formación de cada biopelícula y el grado de inhibición conseguida en la misma con 100 µL/L de carvacrol, 200 µL/L de citral, o 2000 µL/L de (+)-limoneno. En general, los CCs evaluados permitieron tanto retrasar la formación de biopelículas en la cepa Newman como inhibir su formación en un 80% en el caso de la cepa SC-01. Estos resultados apoyan la aplicación y la futura investigación de los CCs carvacrol, citral y (+)-limoneno como agentes inhibitorios de la formación de biopelículas de *S. aureus*.

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas, entendidas como comunidades inmóviles de microorganismos adheridas a una superficie o entre ellas, pueden actuar como reservorios de infecciones, suponiendo un gran riesgo para la salud pública, especialmente cuando presentan resistencia a los antimicrobianos utilizados tradicionalmente (Srey y col., 2013). En concreto, el patógeno productor de biopelículas *Staphylococcus aureus* está despertando una creciente preocupación por su gran capacidad para adaptarse a nuevos ambientes, crear resistencia a diversos antibióticos, y ampliar su capacidad infectiva (Diep y col., 2006).

Por tanto, resulta de crucial importancia evitar la formación de biopelículas en la industria alimentaria mediante nuevos antimicrobianos. En este aspecto, recientemente se ha propuesto el uso de aceites esenciales (AEs) y sus compuestos constituyentes (CCs) para el control de biopelículas de *S. aureus* (Aiemsraad y col., 2011; Adukwu y col., 2012), debido a su demostrada capacidad antibacteriana frente a células planctónicas (no pertenecientes a biopelículas). Sin embargo, la información disponible actualmente sobre la actividad inhibitoria de AEs y CCs en la formación de biopelículas de *S. aureus* es escasa y se limita a cuantificar a término la inhibición producida por cada compuesto. Por ello, en esta investigación se planteó un estudio más profundo del

potencial inhibitorio de tres CCs sobre dos cepas de *S. aureus* de interés clínico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos. *Staphylococcus aureus* SC-01 y Newman.

Compuestos antimicrobianos. Carvacrol, citral y (+)-limoneno (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Formación y cuantificación de las biopelículas. Las biopelículas se formaron en pocillos de microplacas, inoculando los microorganismos en medio de crecimiento con o sin CCs y tras su incubación estática a 37 °C durante diferentes intervalos de tiempo. El grosor de cada biopelícula se determinó mediante el ensayo de tinción con cristal violeta y medición de la absorbancia óptica a 590 nm (Kerekes y col., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad inhibitoria de diferentes concentraciones de CCs

En un primer paso, se determinó la concentración máxima no inhibitoria (CMNI) de cada CC al cabo de 24 h, estableciéndose en 100, 200 y 2000 µL/L de carvacrol, citral y (+)-limoneno, respectivamente, en ambas cepas. En un segundo paso, se midió el grosor de cada biopelícula crecida al cabo de 24 h en presencia de éstas y otras concentraciones menores (Tabla 1). Los resultados reflejan una falta de concordancia entre la concentración añadida y el efecto obtenido, observándose incluso mayor grosor

en biopelículas de *S. aureus* Newman tras la adición de algunas concentraciones de los CCs. Este fenómeno, aunque había sido observado previamente (Kerekes y col., 2013), no ha sido explicado hasta la fecha.

Tabla 1: Efecto de varias concentraciones de cada compuesto ($\mu\text{L/L}$) en el grosor de cada biopelícula de *Staphylococcus aureus* tras 24 h (en unidades de absorbancia óptica) (media \pm desviación estándar).

	SC-01	Newman
Control	5,96 \pm 1,31	1,60 \pm 0,47
Carvacrol		
10	4,61 \pm 1,20	1,51 \pm 0,73
25	2,43 \pm 1,05	2,44 \pm 0,37
50	2,69 \pm 1,07	3,46 \pm 0,39
100	1,15 \pm 0,31	1,12 \pm 0,36
Citral		
20	3,82 \pm 0,53	2,23 \pm 0,37
50	1,49 \pm 0,33	1,29 \pm 0,26
100	3,25 \pm 0,62	2,05 \pm 0,64
200	1,64 \pm 0,56	2,27 \pm 1,07
(+)-Limoneno		
200	2,94 \pm 1,33	1,24 \pm 0,26
500	4,61 \pm 0,93	2,86 \pm 0,64
1000	2,31 \pm 0,37	1,57 \pm 0,58
2000	1,36 \pm 0,29	2,25 \pm 0,74

Estudio del desarrollo de las biopelículas en ausencia y presencia de cada CC

La medición del grosor de las biopelículas a intervalos cortos de tiempo (Figura 1) permitió esclarecer la gran influencia del tiempo de incubación sobre el grosor de cada biopelícula, debido a los ciclos de creación y destrucción que se suceden de forma normal en la formación de biopelículas (Srey y col., 2013). Por ello, se concluyó que determinar el porcentaje de inhibición en la formación de biopelículas, obtenido con cada compuesto al cabo de 24 h, resulta insuficiente para conocer la efectividad inhibitoria de un CC, siendo conveniente la monitorización durante varios ciclos de crecimiento.

Por otra parte, la Figura 1 permitió describir los patrones de crecimiento de las biopelículas de ambas cepas, así como la susceptibilidad de las mismas a cada CC. La cepa SC-01 manifestó una mayor sensibilidad a la presencia de CCs, que inhibieron la formación de biopelícula alrededor del 80% al cabo de 40 h de incubación. Por el contrario, los CCs sólo retrasaron el desarrollo de la biopelícula producida por la cepa Newman, si bien la menor capacidad de esta cepa para la formación de biopelículas no permitió evidenciar grandes diferencias en presencia y ausencia de antimicrobianos.

En conclusión, esta investigación muestra el potencial de los compuestos carvacrol, citral y (+)-limoneno como inhibidores de la formación de biopelículas de *S. aureus*, aunque para la

cuantificación de su efecto inhibitorio es recomendable conocer los ciclos de su desarrollo.

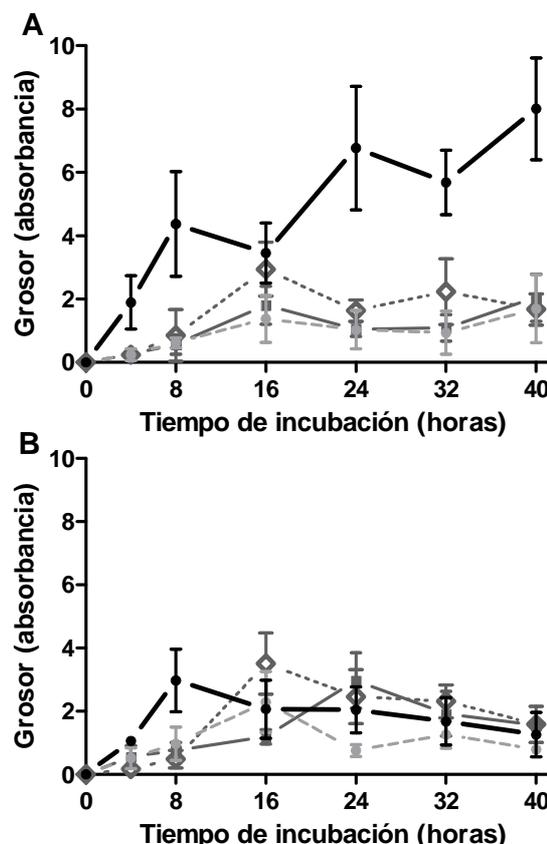


Figura 1: Evolución de la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* SC-01 (A) o Newman (B) en ausencia de compuestos añadidos (—●—) o en presencia de 100 $\mu\text{L/L}$ de carvacrol (---●---), 200 $\mu\text{L/L}$ de citral (---◇---), o 2000 $\mu\text{L/L}$ de (+)-limoneno (---■---).

BIBLIOGRAFÍA

- Adukwu, E.C., Allen, S.C., Phillips, C.A. 2012. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 113:1217-1227.
- Aiemsaaard, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweichaisupapong, S., Khunkitti, W. 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res. Vet. Sci.*, 91:e31-e37.
- Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F. 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 367:731-739.
- Kerekes, E.B., Deák, É., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., Krisch, J. 2013. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.*, 115:933-942.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31:572-585.

Formación de especies reactivas del oxígeno en *Escherichia coli* durante el tratamiento térmico

María Marcén, M^a Jesús Serrano, Santiago Condón y Pilar Mañas

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, marcen@unizar.es

El tratamiento térmico es un método tradicional de conservación de alimentos en la industria alimentaria, pero, aunque es ampliamente usado para este fin, actualmente todavía no se conoce su mecanismo final de inactivación bacteriana. En los últimos años se está poniendo de manifiesto que el estrés oxidativo y la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), podrían constituir un mecanismo general de inactivación celular frente a diversos agentes. En este trabajo se sometió a *Escherichia coli* BW 25113 a un tratamiento térmico, y se determinó la presencia de ROS mediante tinción con fluorocromos específicos y citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que durante el tratamiento térmico se generan ROS, especialmente radical superóxido, en las células de *E. coli*, hecho que sugiere que la generación de estrés oxidativo podría ser un mecanismo implicado en la muerte celular en bacterias tratadas térmicamente.

INTRODUCCIÓN

El calor es un método usado habitualmente en la industria alimentaria para garantizar la estabilidad y salubridad de los productos, debido a su capacidad para inactivar los microorganismos presentes. Aunque se ha investigado ampliamente con el objeto de conocer las causas últimas de la inactivación microbiana por calor, en la actualidad todavía no se han llegado a esclarecer. Hay evidencias científicas de que el calor produce daños en diferentes estructuras celulares como son la membrana externa de las células Gram-negativas, la membrana citoplasmática o el DNA (Mackey, 2000). Pero, a medida que avanza el conocimiento van surgiendo nuevos interrogantes respecto al mecanismo final de inactivación celular, como por ejemplo, el papel que juega el estrés oxidativo en la inactivación celular por calor.

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes, en favor de las prooxidantes. Niveles elevados de especies oxidantes en el citoplasma microbiano, tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), conducen a la presencia de daños en diferentes componentes de la célula incluyendo proteínas, membranas y material genético (Imlay, 2003). Las células bacterianas poseen cierta capacidad de eliminar ROS y de reparar las estructuras dañadas, pero si esta capacidad se ve superada, la viabilidad celular se compromete. Por lo que, este trabajo se ha centrado en el estudio de la formación de ROS en las células de *E. coli* tratadas térmicamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Suspensiones microbianas. En este estudio se usó *Escherichia coli* BW 25113. Esta cepa se mantuvo en criovial a -80°C hasta su uso. A partir del criovial se sembró

una placa de TSA-EL por agotamiento en estría que se incubó durante 24 h a 37°C. A partir de una colonia aislada se realizó el precultivo sembrándola en 10 ml de TSB-EL estéril e incubando durante 12 h a 37°C. Posteriormente se procedió a inocular un frasco de vidrio con 50 ml de TSB-EL para conseguir aproximadamente una concentración inicial de 10^6 ufc/ml. Este frasco se incubó en agitación continua a 130 rpm, a 37°C en una estufa de aire forzado hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, tras 24 h de incubación, aproximadamente.

Tratamiento térmico. Para determinar la resistencia al calor se empleó un termorresistómetro TR-SC (Condón y col., 1993). Durante el tratamiento y a intervalos de tiempo predeterminados se extrajeron muestras de 0,20 ml directamente en placas de Petri estériles, a las que inmediatamente se les añadía el medio de recuperación (TSA-EL). Las placas se incubaron para su posterior recuento.

Determinación de la formación de ROS. Para la determinación de la formación de ROS se llevó a cabo el tratamiento térmico en un equipo termostático a 58°C (Incubador FX, Zeulab, Zaragoza, España). Durante el tratamiento se realizó la extracción de muestras, a tiempos predeterminados, para llevar a cabo la tinción de las células con diferentes fluorocromos: H_2DCFDA (2',7'-diclorodihidro-fluoresceína-diacetato) que permite la detección de ROS en general, principalmente H_2O_2 y radicales hidroxilo, y DHE (dihidroetidio) que detecta radicales superóxido (Gomes y col., 2005). Como controles positivos de tinción se utilizaron células tratadas con peróxido de hidrógeno (10 mM-2 horas) y con plumbagina (5 mM-2 horas), respectivamente. Tras la tinción y lavado de las células, se introdujeron las muestras en el citómetro de flujo (Guava easyCyte, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y se procesaron los datos mediante el Software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la gráfica de supervivencia a 58°C de *E. coli* en PBS. La cinética de inactivación

fue de hombro-caída exponencial. Tras 4,5 minutos de tratamiento se alcanzaban aproximadamente 2,5 ciclos log de inactivación.

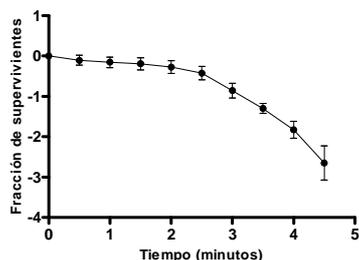


Figura 1. Gráfica de supervivencia de *E. coli* BW 25113 sometida a un tratamiento térmico a 58°C.

Seguidamente se procedió a determinar la presencia de ROS en las células sometidas a un tratamiento térmico (Figura 2).

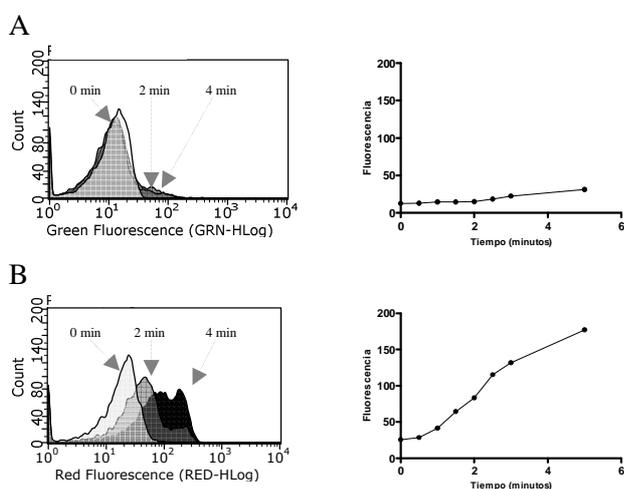


Figura 2. Estudio de la formación de ROS durante el tratamiento térmico a 58°C mediante tinción con H₂DCFDA (A) y dihidroetidio (B). Las gráficas representan el desplazamiento de los picos de fluorescencia a lo largo del tratamiento (de izquierda a derecha) y el nivel de fluorescencia en el punto más alto del pico calculado a partir de los histogramas.

Como se observa en la figura, durante el tratamiento térmico se produjo una formación progresiva de ROS, especialmente de radicales superóxido. Si bien son muchos los autores que han sugerido que el tratamiento térmico genera estrés oxidativo celular, tan solo Mols y colaboradores (2011) han descrito la formación directa de ROS en células sometidas a un tratamiento térmico. Estos autores describieron la formación de radicales superóxido en *Bacillus cereus* tratado térmicamente a 50°C durante 30 minutos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que también en *E. coli* se producen ROS durante la exposición al tratamiento térmico. Además, la formación de radicales

superóxido se produjo en mayor magnitud a mayores temperaturas de tratamiento. El porcentaje de células fluorescentes aumentó con la temperatura, para tiempos iguales de tratamiento, al igual que lo hizo el porcentaje de células inactivadas (Figura 3.)

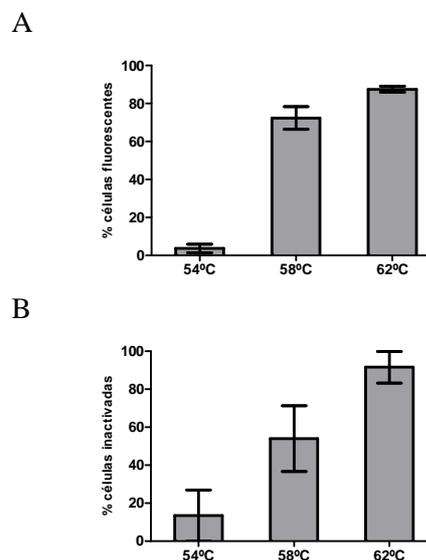


Figura 3. Porcentaje de células fluorescentes teñidas con dihidroetidio (A) y porcentaje de células inactivadas (B) tras el tratamiento de *E. coli* BW 25113 durante 2 minutos frente a diferentes temperaturas de tratamiento (54, 58 y 62°C).

Aunque será necesario realizar una investigación más amplia sobre la importancia de las ROS, estos resultados apoyan la hipótesis de que la generación de estrés oxidativo podría ser un mecanismo implicado en la muerte celular en bacterias tratadas térmicamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Bioph. Meth.* 65(2), 45-80.
- Imlay, J.A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.
- Mackey, B.M. 2000. Injured bacteria. En: *The Microbiological Safety and Quality of Food Vol. I* (Lund, M., Baird-Parker, T. C. y Gould, G. W., Eds.) pp. 315-341. Aspen Publisher: Gaithersburg.
- Mols, M., Ceragioli, M., Abee, T. 2011. Heat stress leads to superoxide formation in *Bacillus cereus* detected using the fluorescent probe MitoSOX. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 119-122.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) a través del proyecto AGL 2012-33522, "Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas en la conservación de los alimentos", el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20) y el Fondo Social Europeo.

SESIÓN IX: Tecnologías emergentes y microbiología predictiva I.

Microbiología predictiva orientada a la integración en una evaluación de riesgos microbiológicos alimentarios

Pablo S. Fernández^{1,2}, Alfredo Palop^{1,2} y Paula M. Periago^{1,2}

¹ Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, España, pablo.fernandez@upct.es

² Instituto de Biotecnología Vegetal, Campus de Excelencia MareNostrum, Universidad Politécnica de Cartagena, España

La microbiología predictiva ha experimentado un gran desarrollo en los últimos 30 años, dando lugar a modelos que permiten predecir el comportamiento de microorganismos en condiciones cada vez más complejas e, incluso, dinámicas. Actualmente la toma de decisiones se basa en la aplicación de la metodología de la evaluación de riesgos cuantitativa, para lo cual es necesario contar no sólo con predicciones puntuales, sino también conocer la variabilidad e incertidumbre de dichas predicciones. Ello requiere de una nueva orientación de la microbiología predictiva, dado que las predicciones han de ser estocásticas para que puedan integrarse en dicha evaluación de riesgos. En general, pese a la enorme cantidad de datos microbiológicos disponibles en la actualidad, aún existen lagunas de información que dificultan el desarrollo de una ERC completa en muchos casos. También conviene resaltar que los modelos predictivos y las herramientas disponibles actualmente permiten en muchos casos disponer de una información valiosa para la toma de decisiones.

Se analiza el uso de modelos predictivos en ejemplos concretos de evaluación de riesgos. Para ello se analizan tanto modelos predictivos basados en polinomios (en muchos casos disponibles a través de aplicaciones web, tales como *Combase*) como modelos dinámicos, que permiten predecir el comportamiento microbiano frente a condiciones variables de temperatura, pH o NaCl, entre otros muchos factores.

La priorización de riesgos o “risk ranking” puede ser una herramienta muy útil para su uso en evaluación de riesgos. Actualmente existen numerosas aplicaciones disponibles, con distinto grado de complejidad y que proporcionan una información que puede ser cualitativa, semi-cuantitativa o cuantitativa. Los modelos predictivos son fundamentales para poder utilizar las herramientas cuantitativas. Así, desde los árboles de decisión (puramente cualitativos) hasta las herramientas cuantitativas disponibles, tales como MicroHibro o iRisk (sistemas web desarrollados para analizar datos sobre peligros microbiológicos en alimentos y dar una estimación del riesgo potencial en la población de aparición de casos de enfermedad) existe un amplio abanico de posibilidades que se

pueden utilizar. La elección de unos u otros depende, fundamentalmente, de la calidad de los datos disponible y de la existencia o no de modelos predictivos adecuados.

Finalmente, se analizan los requisitos necesarios de nuevos datos microbiológicos para que se puedan integrar en estas herramientas, la necesidad de considerar la variabilidad e incertidumbre asociadas a ellos y los modelos predictivos más adecuados para ello.



Pablo S. Fernández Escámez es Catedrático de Universidad del área de Tecnología de Alimentos en la Universidad Politécnica de Cartagena desde 2009. Su carrera investigadora se ha desarrollado en el ámbito de la seguridad microbiológica de alimentos. Obtuvo su Doctorado en Veterinaria por la Universidad de Murcia en 1994, realizando su tesis en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC). Ha realizado estancias pre- y post-doctorales en diferentes centros europeos: Institute of Food Research Norwich, University of Bristol, CSL Aberdeen (Reino Unido) y en Unilever R&D Vlaardingen (Países Bajos), entre 1992 y 2012. Sus líneas de investigación son: evaluación de riesgos microbiológicos, microbiología predictiva, fisiología de microorganismos patógenos alimentarios, tecnologías de conservación de alimentos térmicas y no térmicas.

Desde 2012 es Experto del Panel de Riesgos Biológicos de la European Food Safety Authority de la Unión Europea (EFSA). También ha sido miembro del Panel de Publicaciones de ILSI Europe (2007-2012) y del grupo de expertos en Evaluación de riesgos microbiológicos de ILSI (2003-2012). Cuenta con más de 50 publicaciones en revistas científicas de alto impacto en el ámbito de la microbiología de alimentos y numerosos capítulos de libro de editoriales internacionales. Ha participado o dirigido más de 30 proyectos de investigación nacionales e internacionales, habiendo dirigido 7 tesis doctorales. Actualmente es Vicerrector de Investigación e Innovación de la Universidad Politécnica de Cartagena.

Perfil de temperaturas en refrigeradores domésticos. Impacto en la vida útil segura de productos cárnicos cocidos

Anna Jofre¹, Nicoletta Belletti¹, Mari Luz Latorre-Moratalla², Margarita Garriga¹ y Sara Bover-Cid¹

¹ Programa de Seguridad Alimentaria, IRTA, Monells, España, anna.jofre@irta.cat

² Departamento de Nutrición y Bromatología, Universitat de Barcelona, España

Listeria monocytogenes, debido a su capacidad de crecer en frío, es un patógeno de riesgo en productos refrigerados, especialmente en aquellos de vida útil prolongada y listos para el consumo. En el presente estudio se registró y analizó la temperatura de 118 refrigeradores domésticos, información esencial para la evaluación de la vida útil segura de productos perecederos como los productos cárnicos cocidos. La temperatura de las neveras, expresada como promedio de lecturas registradas durante un mínimo de 24h, se ajustó a una distribución normal de media 5,7°C (DE±2,3) y rango de 0,65°C a 11,35°C. Mediante el uso de la aplicación *Seafood Spoilage and Safety Predictor* (SSSP), y en base a las temperaturas de los refrigeradores domésticos analizados, se estimó la vida útil segura de los productos cárnicos cocidos listos para el consumo. La vida útil segura estimada varió entre valores de más de 90 días a 1,9°C (i.e. Percentil 5) a tan sólo 4,3 días a 9,9 °C (correspondiente al Percentil 95). Los resultados muestran el fuerte impacto de la temperatura del refrigerador sobre la seguridad microbiológica (i.e. crecimiento de *L. monocytogenes*) de los productos cárnicos cocidos listos para el consumo.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es uno de los patógenos más relevantes en productos listos para el consumo debido a su ubicuidad, persistencia en plantas de procesado de alimentos y su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración (Warriner y Namvar, 2009). Las temperaturas de conservación aplicadas durante el almacenamiento de la mayoría de los productos listos para el consumo, tanto durante la distribución como en los puntos de venta y en el hogar, son cruciales en el aseguramiento de la seguridad microbiológica de este tipo de productos hasta el fin de la vida útil.

El objetivo de este estudio fue obtener datos sobre las temperaturas de refrigeradores domésticos representativas de las condiciones de conservación de los productos cárnicos cocidos listos para el consumo (CCLC) y evaluar su impacto en el comportamiento de *L. monocytogenes*, patógeno de referencia para establecer la vida útil segura de los alimentos listos para el consumo perecederos, tal y como se establece en el Reglamento CE 2073/2005.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se registró la temperatura de un total de 118 neveras de hogares de Cataluña mediante la colocación, durante al menos 24 horas, de una sonda de registro continuo de temperatura localizada en la zona de la nevera donde el consumidor acostumbra a guardar los CCLC. El comportamiento de *L. monocytogenes* en función de la temperatura de conservación se estimó mediante la aplicación del modelo predictivo del crecimiento del patógeno, disponible en la aplicación *Seafood Spoilage and Safety Predictor* (SSSP v.3), válido para productos cárnicos

cocidos. Para ello se consideraron los valores de parámetros físico-químicos representativos de los CCLC envasados al vacío disponibles actualmente en el mercado (i.e. pH=6,0; a_w=0,974; sal=2,9%; nitrito residual inferior a 5 mg/kg, lactato=0,75%, humedad=73,63%), asumiendo una concentración inicial de *L. monocytogenes* de 1 ufc/g y determinando el tiempo necesario para aumentar 100 veces la concentración inicial (Hereu 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron una amplitud de la oscilación de la temperatura de entre 0,5°C a 12°C, siendo 2,6°C el valor de la mediana. La distribución de valores de la temperatura promedio de las neveras se ajustó a una distribución normal de media 5,7°C (DE=2,3; mín=0,65°C; máx=11,35°C). (Figura 1). Este valor entra dentro el rango de temperaturas adecuadas para la conservación de los productos listos para el consumo perecederos, para los cuales se recomienda no superar los 6 °C, manteniéndolos preferentemente entre 2 y 4 °C (CAC, 2007).

Tabla 1: Estimación de la vida útil segura de productos cárnicos cocidos listos para el consumo en función de la temperatura asociada a distintos percentiles de la distribución de la Figura 1.

Temperatura (°C)	Percentil de refrigeradores	Vida útil segura (días)
1,9	5	>90
4,2	25	20,0
5,7	50	10,8
7,0	75	7,2
9,9	95	4,3

A la temperatura media (5,7 °C), la vida útil segura (i.e. tiempo para incrementar la concentración de

L. monocytogenes de 1 ufc/g a 100 ufc/g, máximo legalmente permitido por el Reglamento CE 2073/2005) de un producto CCLC estándar, sería del orden de 10,8 días (Tabla 1). Sólo un 28% de las neveras mostró una temperatura promedio inferior o igual a los 4°C, generalmente recomendada para la conservación de los CCLC. En estos casos, la vida útil segura sería de al menos 3 semanas. En el otro extremo, un 4% de las neveras mostraron temperaturas promedio de 10°C o más. Según el modelo predictivo, a esta temperatura la vida útil segura se reduciría a 4,2 días, es decir, 5 veces inferior a la vida útil segura a 4°C.

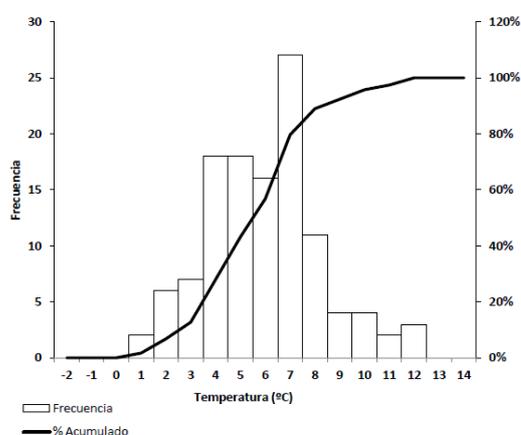


Figura 1: Distribución de temperaturas de 118 refrigeradores domésticos (promedio de lecturas registradas durante un mínimo de 24h).

Varios estudios sobre temperaturas utilizadas en el almacenamiento de productos listos para el consumo han concluido que un elevado porcentaje de neveras domésticas se encuentran muy por encima de las

temperaturas de conservación recomendadas (Carrasco y col., 2007, Garrido y col., 2010, Azevedo y col., 2005). Asimismo, estos estudios también concluyen que la mayor parte de los consumidores desconocen el impacto del abuso de temperatura sobre la vida útil segura (James y col., 2008).

En conclusión, los perfiles de tiempo-temperatura tienen un gran impacto sobre la vida útil segura de los productos cárnicos cocidos listos para el consumo. En este sentido, la educación de los consumidores sería de gran utilidad para prevenir situaciones de riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

- Azevedo, I., Regalo, M., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. and Gibbs, P.A., 2005, Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control* 16: 121-124.
- CAC (Comission del Codex Alimentarius), 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 (anexos II y III adoptados en 2009).
- Carrasco, E., Perez-Rodriguez, F., Valero, A., Garcia-Gimeno, R.M. and Zurera, G. 2007, Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis. *J. Food Protect.*, 70: 2407-2412.
- Garrido, V., García-Jalón, I. and Vitas, A.I. 2010, Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control* 21: 896-901.
- Hereu, A. 2014, Les altes pressions i la bioconservació com a estratègies de control de *L. monocytogenes* en productes carnis llestos pel consum. Assajos d'inoculació i modelització matemàtica. IRTA-Universitat de Girona.
- James, S.J., Evans, J. and James, C. 2008, A review of the performance of domestic refrigerators. *J. Food Eng.* 87: 2-10.
- Warriner, K., Namvar, A. 2009, What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Sci. Tech.*, 20:245-25

Uso de modelos no lineales para caracterizar la termorresistencia de *Cronobacter sakazakii*

Juan Pablo Huertas¹, Colin Hill^{2,3}, Avelino Álvarez^{2,3} y Alfredo Palop¹

¹ Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, España, alfredo.palop@upct.es

² Department of Microbiology, University College of Cork, Western road, Cork, Ireland.

³ Alimentary Pharmabiotic, University College of Cork, Western road, Cork, Ireland

Se han reportado gran cantidad de casos de infección por *Cronobacter sakazakii* en las unidades de recién nacidos de los hospitales. Estos brotes se han asociado al consumo de Formulas Infantiles en Polvo (FIP). Se ha propuesto a *C. sakazakii* como una de las enterobacterias más termotolerantes, reportándose valores D_T de entre 0,12 y 5,45 min a 58°C. La termorresistencia de *C. sakazakii* se determinó en un termorresistómetro Mastia en caldo LB. Los resultados obtenidos se analizaron usando el modelo clásico de Bigelow (valores D_T) y el modelo no lineal de Weibull. Las curvas de supervivencia presentaron fenómenos de cola. El tiempo para reducir la población de *C. sakazakii* en 5 ciclos logarítmicos a 58°C fue muy similar pero a altas temperaturas se observó una diferencia de casi 10 veces entre los valores calculados con el valor D_T y el modelo de Weibull. El fenómeno de cola significa que para reducir la población resistente al tratamiento es necesario aumentar el tiempo de exposición, pero el incremento del tiempo de procesado no resultará en una mayor inactivación del microorganismo, quedando siempre una población que se ha adaptado al estrés.

INTRODUCCIÓN

Cronobacter sakazakii es un bacilo Gram-negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Actualmente es considerado microorganismo patógeno oportunista emergente. La infección por este microorganismo causa meningitis, septicemia o enterocolitis, siendo los grupos de riesgo los recién nacidos y los bebés inmunodeprimidos o con bajo peso al nacer. Se ha relacionado la infección por causa de este microorganismo con el consumo de Fórmulas Infantiles en Polvo (FIP) (Fiore y col., 2008). Algunos autores han propuesto que *C. sakazakii* es una de las enterobacterias más termotolerantes, reportándose valores D_T en FIP y en medios de laboratorio entre 8,58 a 85,50 min a 50 °C; y valores z de 3,1 a 10,86 °C (Nazarowec-With y Farber, 1997; Dancer y col., 2009; Osaili y col., 2009).

La determinación del número de microorganismos supervivientes después de la aplicación de un tratamiento térmico es de gran interés, ya que esta información puede ser utilizada para poder determinar cuál es el mejor tratamiento que sea eficaz para reducir el riesgo asociado de patógenos alimentarios tal como *C. sakazakii*, ofreciendo un producto seguro y a su vez con el mínimo impacto sobre sus cualidades nutricionales y funcionales (Arroyo y col. 2009). El modelo de Weibull es un modelo flexible capaz de modelizar curvas de supervivencia lineales y no lineales (hombro y cola). Este modelo se ha usado para describir la cinética de inactivación de gran variedad de microorganismos (Esteban y col., 2013).

El presente estudio considera la aplicación de modelos no lineales (Weibull) para la termo-caracterización de *Cronobacter sakazakii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo, medios de cultivo y reactivos. Se utilizó la cepa de *Cronobacter sakazakii* DPC6529, proporcionada por el cepario de University College of Cork. Los cultivos de este microorganismo se realizaron en caldo LB y se incubaron a 37°C durante 16 h.

Determinaciones de termorresistencia. Las determinaciones de termorresistencia se realizaron en un termorresistómetro Mastia (Conesa y col. 2009). Se realizaron 3 réplicas por separado para cada condición evaluada. El recuento de los supervivientes se hizo por duplicado sembrando diluciones apropiadas en agar LB. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C

Análisis de datos. Las curvas de supervivencia se obtuvieron al representar el logaritmo de UFC/mL vs. tiempo de tratamiento. Se utilizó la forma del modelo de Weibull propuesta por Mafart y col. (2002) (Eq. 1):

$$\log N_t = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (1)$$

Donde N_t es la población final, N_0 la población inicial, δ el tiempo para la primera reducción decimal (min), y p el parámetro de forma. Se utilizó un único valor p para todas las gráficas de supervivencia obtenidas en el mismo medio de calentamiento, tal como lo propusieron Esteban y col. (2013). Los cálculos fueron realizados con la aplicación GInaFiT (versión 1.6) para Excel (Geeraerd y col., 2005). El tiempo necesario (t) para reducir la población de microorganismos en cualquier cantidad de ciclos logarítmicos (C) se puede calcular usando la siguiente ecuación (Eq.2), derivada de la Eq.1:

$$t = \delta * (C)^{1/p} \quad (2)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de supervivencia obtenidas presentaron fenómeno de cola (Fig.1). La Tabla 1 presenta los valores D_T junto con los valores δ calculados a partir del uso del modelo de Weibull, cada uno junto a su correspondiente valor r^2 y el tiempo necesario para la inactivación de 5 ciclos logarítmicos de la población.

En la Tabla 1 se puede observar que a bajas temperaturas (58 y 60°C) el tiempo necesario para reducir la población de *C. sakazakii* en 5 ciclos logarítmicos es muy similar entre ambos modelos, mientras que a temperaturas más altas (62 y 64°C) el tiempo calculado con el valor D_T es casi 10 veces más bajo que el tiempo calculado usando el modelo de Weibull. Los resultados anteriores demuestran que las curvas de supervivencia presentan un fenómeno de cola y el uso del valor D_T conllevaría una subestimación de la resistencia al calor del microorganismo, conllevando a aplicar unos tratamientos térmicos inadecuados, aumentando el riesgo asociado a *C. sakazakii*.

La presencia del fenómeno de cola en las curvas de supervivencia indica que la población más sensible muere rápidamente y mientras el tratamiento continúa, va quedando la población más resistente al tratamiento. En otras palabras, el fenómeno de cola significa que para reducir la población resistente al tratamiento es necesario aumentar el tiempo de exposición al tratamiento (Huxley, 2006), pero el incremento del tiempo de procesado no dará como resultado una mayor inactivación del microorganismo, quedando siempre una población que se ha adaptado al estrés.

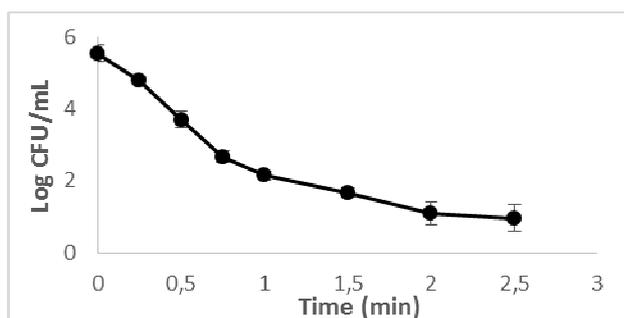


Figure 1: Termorresistencia de *C. sakazakii* DPC 6529 a 58°C en caldo LB.

BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo, C., Condón, S., Pagán, R. 2009, Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. Int. J. Food. Microbiol. 136:110-118.
- Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. 2013, Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. J. Appl. Microbiol., 107:506-513.

- Dancer, G.I., Mah, J.-H., Rhee, M.-S., Hwang, I.-G., Kang, D.-H. 2009, Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. J. Appl. Microbiol. 107:1606-1614.
- Esteban, M.D., Huertas, J.P., Fernández, P.S., Palop, A. 2013, Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 Spores. Food. Microbiol. 34:158-163.
- Fiore, A., Casale, M., Aureli. 2008, *Enterobacter sakazakii*: epidemiology, clinical presentation, prevention and control. Ann Ist Super Sanità. 44, 3:275-280.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F. 2005, GinaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. Int. J. Food. Microbiol. 102:95-105.
- Huxley, T.H. 2006, Isothermal microbial heat inactivation. In M. Peleg (Ed.). Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems. (pp. 1-47). Florida: CRC press.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. 2002, On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. Int. J. Food. Microbiol. 72:107-113.
- Nazarowec, M., Farber, J.M. 1997, Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J. Food Prot. 60:226-230.
- Osaili, T.M., Shaker, R.R., Al-Haddaq, M.S., Holley, R.A. 2009, Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. J. Appl. Microbiol. 107:928-935.

Tabla 1. Termorresistencia de *C. sakazakii* DPC6529, obtenida en condiciones isotérmicas en caldo LB, determinada mediante el modelo clásico lineal (valores D_T) y mediante el modelo de Weibull.

T (°C)	D_T (min)	R^2	$5D$ (min)	δ_T (min)	R^2	$5C$ (min)
58	0,551±0,14	0,866	2,76±0,68	0,292±0,02	0,921	2,251±0,13
60	0,134±0,01	0,959	0,669±0,06	0,0908±0,02	0,966	0,701±0,16
62	0,0485±0,01	0,984	0,0243±0,04	0,0338±0,01	0,983	0,261±0,01
64	0,0172±0,01	0,954	0,0861±0,01	0,114±0,01	0,965	0,879±0,01

Aproximación probabilística de resultados microbiológicos de presencia/ausencia para determinar la concentración de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en carne de cerdo

David Rodríguez Lázaro^{1,2}, Marta Hernández¹, Patricia González García¹, Antonio Valero³

¹ Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Valladolid, España rodlazda@gmail.com

² Área de Microbiología. Facultad de ciencias. Universidad de Burgos, España

³ Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, España

El objetivo de este estudio fue la determinación de la prevalencia y concentración de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en carne de cerdo mediante el análisis de 12 lotes de productos a lo largo de un año. Se analizaron grupos de cinco muestras justo después de su recogida en el supermercado y después de su almacenamiento a 4 y 12°C hasta el final de su vida útil (7 días). Los resultados obtenidos para *Salmonella* spp. indicaron que un total de 15 muestras (8.33 %) fueron positivas, lo que representa el 25% de los lotes analizados (i.e. al menos una de las muestras fue positiva en al menos uno de los escenarios de muestreo). La contaminación con *Salmonella* se distribuyó aleatoriamente y no se observó una correlación directa con la temperatura de almacenamiento. Para *L. monocytogenes*, 26 muestras (14.44 %) fueron positivas, lo que representa el 41.67 % de los lotes analizados. Un grupo de muestras fueron positivas únicamente al final de la vida útil pero no inmediatamente después de compra, indicando claramente que la contaminación no sólo estaba distribuida heterogéneamente sino que también muy próxima al límite de detección, y en todos los casos por debajo del límite de cuantificación. Ya que no se pueden enumerar ni *Salmonella* spp. ni *L. monocytogenes* (< 10 cfu /g), se desarrolló una aproximación probabilística basada en las distribuciones binomial y de Poisson y en los datos de presencia/ausencia para la estimación de la concentración de estos dos patógenos. Los valores de concentración estimados estuvieron por debajo de 40 ufc/ kg para ambos patógenos en más del 80% de los lotes analizados. Los datos recogidos en este estudio añadan una nueva perspectiva al conocimiento de la presencia de microorganismos de origen alimentario en este segmento de la cadena alimentaria.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en los cortes de carne de cerdo en diferentes condiciones de almacenamiento. Además, se estimaron las distribuciones estadísticas de la concentración microbiana de ambos patógenos se estimaron mediante el desarrollo de un enfoque probabilístico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo. Se analizaron una vez al mes un total de doce lotes diferentes (de mayo 2011 hasta abril 2012). Para cada lote, se tomaron quince muestras que contenían 500 g de cortes de carne de cerdo envasadas en atmósfera modificada, y se transportaron directamente al laboratorio a temperatura ambiente. En cada muestreo, se evaluaron (i) en un plazo de dos horas después de llegar al laboratorio; y al final de la vida útil del producto en las muestras almacenadas a (ii) 4 ± 1 °C o (iii) 12 ± 1 °C. Se analizaron cinco muestras fueron para cada escenario.

Análisis microbiológico de las muestras de corte de cerdo. La presencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* y la enumeración de *L. monocytogenes* se evaluaron de Acuerdo a las norma ISO 6579:2002, ISO 11290-1 e ISO 11290-2, respectivamente.

Enfoque probabilístico para derivar la concentración de *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Se desarrolló un modelo

probabilístico para derivar la concentración de patógenos para los datos de presencia/ausencia. Para la función de probabilidad, se usó una distribución binomial, que se calcularon para cada lote analizado considerando el número de positivos de las cinco muestras analizadas, y se empleó una simulación aleatoria con el número de lotes positivos y el número de muestras positivas por lote.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de *Salmonella* spp. en cortes de carne de cerdo.

15 muestras (8,33%) fueron positivas, lo que representa 4 (25%) eventos de muestreo positivos (Tabla 1). *Salmonella* se distribuyó al azar y no se observó una correlación directa con el tiempo de almacenamiento y la temperatura. Sin embargo, se observó una clara distribución estacional de la contaminación: 2 muestreos (66,67%) fueron positivos para los tres meses más calurosos (junio, julio y agosto), y en julio y agosto 9 muestras (30%) fueron positivas. Curiosamente en esos dos meses todos los escenarios de muestreo fueron positivos. Sin embargo, en los tres meses más fríos (diciembre, enero y febrero) todas las muestras analizadas fueron negativas. Se encontró *Salmonella* al final de la vida útil independientemente de la temperatura de

almacenamiento cuando se encontraba inmediatamente después de la compra. Estos hallazgos indican que *Salmonella* puede sobrevivir en la carne en refrigeración, con independencia de la temperatura utilizada.

Tabla 1

Sampling	<i>Salmonella</i> spp.			<i>L. monocytogenes</i>		
	After purchasing	End of shelf-life 4°C	End of shelf-life 12°C	After purchasing	End of shelf-life 4°C	End of shelf-life 12°C
1 (May 2011)	0	0	0	0	0	0
2 (June 2011)	0	0	0	5	5	5
3 (July 2011)	1	3	1	0	4	4
4 (August 2011)	1	1	2	0	0	0
5 (September 2011)	0	0	0	0	0	0
6 (October 2011)	2	2	1	0	0	0
7 (November 2011)	0	0	0	0	0	0
8 (December 2011)	0	0	0	0	0	1
9 (January 2012)	0	0	0	0	0	0
10 (February 2012)	0	0	0	1	0	0
11 (March 2012)	0	0	0	0	0	1
12 (April 2012)	0	1	0	0	0	0
TOTAL	4 (6.67 %)	7 (11.67 %)	4 (6.67 %)	6 (10 %)	9 (15 %)	11 (18.33 %)

Presencia de *Listeria monocytogenes* en los cortes de carne de cerdo.

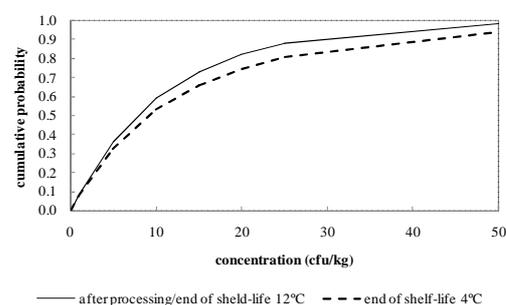
Se observó un mayor número de positivos: 26 muestras (14:44%) fueron positivas, lo que representa 5 lotes (41,67%) (Tabla 1). La enumeración no fue posible en ninguna de las muestras positivas, lo que representa que el nivel de contaminación era <10 ufc/g. Se observó un mayor número de positivos (11, 18,33%) en el final de la vida útil después de almacenamiento a 12°C en comparación con a 4°C (9,15%) y con las muestras analizadas inmediatamente después de la compra (6,10 %). El mismo número de eventos de muestreo (2) fueron positivos para los meses de verano (junio, julio y agosto), y de invierno (diciembre, enero y febrero). Sin embargo, se observó una distribución estacional: el número de muestras positivas fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en los meses de verano (23 muestras, 51,11% vs 2 muestras, 04:44%). Sólo en el período de otoño (septiembre, octubre y noviembre), todas las muestras analizadas fueron negativas.

Estimación de las distribuciones acumuladas de las concentraciones de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*.

Se puede aplicar la distribución conjunta para *Salmonella* spp. en las muestras analizadas después de la compra y después de almacenamiento a 12°C ya que el número de lotes positivos y las muestras positivas eran los mismos. No obstante, las

concentraciones más altas se estimaron para las muestras analizadas después del almacenamiento a 4°C (Figura 1a). En particular, para las concentraciones de 10 *Salmonella* spp. ufc/kg, el porcentaje de muestras igual o por debajo de este valor era 59,52% de los lotes analizados después de la compra y después de almacenamiento a 12°C. Este porcentaje se redujo hasta el 52,84% para los lotes almacenados a 4°C, sin embargo, se obtuvieron diferencias no significativas ($P > 0,05$). Las estimaciones modelo indicaron que menos del 20% de los lotes tendría una concentración mayor de 40 ufc/kg correspondiente a 1 ufc/25g.

a)



b)

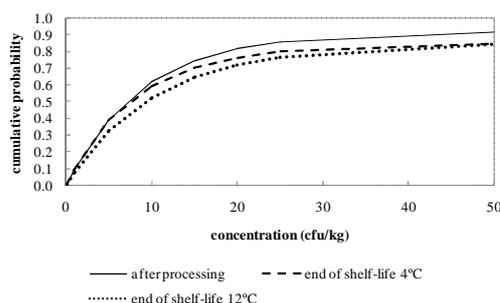


Figura 1. Distribuciones acumuladas para la concentración estimada de (A) *Salmonella* spp. y (B) *L. monocytogenes* a través del análisis de los doce primeros eventos de muestreo ($n = 60$) en los tres escenarios (después de la compra, y hasta el final de la vida útil a 4 °C y 12 °C de almacenamiento)

Se estimaron concentraciones similares para *L. monocytogenes* en los lotes analizados al final de la vida útil cuando la contaminación inicial era superior a 40 ufc/kg. Se incrementó el porcentaje acumulado de las muestras analizadas tras la compra lo que denota una concentración estimada inferior (Fig. 1b). Las diferencias mayores se obtuvieron en los valores de concentración más bajos (20 ufc/kg) ya que los porcentajes estimados correspondieron a 81,86%, 76,52% y 72,07% para los lotes analizados después de la compra y después de almacenamiento a 4°C y 12°C, respectivamente.

Agradecimientos. Proyecto BASELINE, dentro del VII Programa Marco Europeo de Investigación. Proyecto RTA RTA2011-079-C02-01

SESIÓN X: Tecnologías emergentes y microbiología predictiva II.

Posibilidades y limitaciones del plasma frío para la conservación e higienización de los alimentos

Mercedes López Fernández

Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, España, mmlopf@unizar.es

El plasma frío o plasma atmosférico no térmico (PANT) se genera, a temperatura ambiente y presión atmosférica, mediante la aplicación de un campo eléctrico o electromagnético a un gas, en el que los electrones toman la energía produciendo su aceleración hasta que sus energías se elevan lo suficiente para ionizar los átomos o las moléculas del gas con las que colisionan, liberando más electrones que provocan a su vez nuevas ionizaciones. Además, los electrones con energías adecuadas producen disociación molecular, formando átomos y radicales, siendo también capaces de excitar átomos y moléculas a niveles energéticos superiores que, al retornar a un estado más estable, emiten el exceso de energía en forma de radiaciones electromagnéticas de un amplio espectro, incluidas en el rango ultravioleta. El PANT, en consecuencia, está constituido básicamente por moléculas y átomos en estado o no de excitación, iones positivos y negativos, radicales libres, electrones y radiación ultravioleta, y tiene la capacidad de inactivar una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, mohos, levaduras e incluso esporos. Aunque el mecanismo específico no se conoce con precisión, se considera a las especies químicamente reactivas generadas las responsables de la pérdida de viabilidad, al provocar daños en las envolturas celulares, el ADN y las proteínas.

Además de su capacidad de inactivación, esta tecnología presenta otras ventajas muy importantes para la industria alimentaria, como el bajo coste de aplicación, el empleo de tiempos de tratamiento cortos, su naturaleza no tóxica y la significativa reducción del consumo de agua y agentes químicos, lo que se traduce en una importante disminución de efluentes que resulta beneficioso, no sólo desde un punto de vista económico sino también ambiental.

Este conjunto de ventajas ha hecho que en estos últimos años se considere el uso del PANT como una tecnología sumamente prometedora para la conservación de los alimentos, existiendo ya numerosos estudios que indican que su efectividad antimicrobiana depende de diversos factores, entre los que cabría citar, en primer lugar, las condiciones utilizadas para la generación del plasma (la energía aplicada, la composición y humedad del gas y la velocidad de flujo) y de tratamiento (directo o indirecto); en segundo lugar, de las características

relacionadas con los microorganismos, como el tipo de microorganismo y el grado de contaminación; por último, de ciertas propiedades del medio de tratamiento, fundamentalmente, la composición de los líquidos y las características superficiales de los sólidos.

De hecho, se han obtenido resultados muy prometedores en la descontaminación superficial de una amplia gama de alimentos, tanto de origen animal como vegetal. Así, con tratamientos de 2 minutos se han conseguido, para *Listeria monocytogenes*, reducciones de 4; 4,7; 6,5 y 8 ciclos logarítmicos en fresas, filetes de pechuga de pollo, lonchas de jamón y de queso, respectivamente. Aunque son más escasos los estudios en alimentos líquidos, se han alcanzado, por ejemplo en zumo de manzana, reducciones de 5 unidades logarítmicas de *Citrobacter freundii* al aplicar tratamientos de 8 minutos.

No obstante, la implementación de esta tecnología a nivel industrial, como una alternativa segura y eficaz a los métodos tradicionales de conservación, requiere aún la realización de un gran esfuerzo investigador en diversos aspectos, como sobre la cinética de inactivación microbiana, la contribución relativa de cada una de las especies reactivas formadas en la pérdida de viabilidad y, especialmente, en lo que se refiere a su repercusión sobre las características organolépticas y nutritivas de los alimentos.



Mercedes López Fernández, Profesora Titular de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, es responsable del equipo de investigación en el ámbito de las nuevas tecnologías de procesado de los alimentos y los mecanismos implicados en las respuestas adaptativas de los microorganismos frente al estrés. Asimismo, forma

parte del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de dicha Universidad.

Ha colaborado en 25 proyectos y contratos de investigación, en 12 como investigadora principal. Presenta una producción científica de más de 50 artículos, 40 publicados en revistas recogidas en el Science Citation

Index en los campos de "Microbiology" y "Food Science and Technology". Es autora de 3 capítulos de libro y 9 artículos de carácter divulgativo sobre diversos aspectos de interés para la industria alimentaria.

Ha dirigido 5 Tesis Doctorales, habiendo obtenido dos el Premio Extraordinario de Doctorado y una de ellas el premio a la mejor tesis de Microbiología de los Alimentos 2009-2010 otorgado por la Sociedad Española de Microbiología, y unos 25 Trabajos de Investigación realizados por los alumnos para completar su formación.

Efecto combinado de nisina y *D*-limoneno sobre *Listeria monocytogenes* aplicados mediante nanoemulsiones

Javier Maté, Paula M. Periago y Alfredo Palop

Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad Politécnica de Cartagena, España, j_ms_86@hotmail.com

La nisina y el *D*-limoneno son compuestos naturales con carácter antimicrobiano. Durante la última década, algunas investigaciones han llegado a la conclusión de que el empleo combinado de algunos aceites esenciales con la nisina podría presentar efecto sinérgico. Uno de los principales inconvenientes del empleo de estos compuestos en la industria alimentaria es su baja estabilidad debido a su naturaleza oxidativa y a su carácter hidrofóbico. El objetivo de este estudio fue evaluar el posible efecto sinérgico de nisina y *D*-limoneno en *Listeria monocytogenes*, al aplicarlos mediante una nanoemulsión. Los resultados evidenciaron un notable efecto sinérgico al emplearse de manera combinada la nisina con el *D*-limoneno, siendo este efecto mayor al aplicarlos en forma de nanoemulsión que por medio de la adición directa de los mismos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el empleo de aceites esenciales en forma de nanoemulsión podría tener numerosas aplicaciones en la industria alimentaria solventando los problemas anteriormente mencionados.

INTRODUCCIÓN

Se han desarrollado varios experimentos donde se ha evaluado el carácter antimicrobiano del *D*-limoneno frente a diferentes patógenos alimentarios como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Saccharomyces bayanus* entre otros (Chikhouné y col., 2013). En muchos de estos casos se obtuvieron resultados satisfactorios. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de los aceites esenciales, (que los hacen inmiscibles en agua), la susceptibilidad de los mismos a la degradación oxidativa (la cual disminuye considerablemente su efecto) y su pronunciado carácter aromático, ha dificultado su empleo por parte de la industria alimentaria.

Para ello, en los últimos dos años, ha comenzado a aplicarse la tecnología de nanoemulsiones, por medio del método de Inversión de Fase Catastrófica (CPI). El método CPI se encuentra entre los catalogados de "baja energía". Además cuenta con las ventajas de su escaso coste y el aprovechamiento de la energía química almacenada en el sistema (Zhang y col., 2013). Las nanoemulsiones, debido a su tamaño subcelular, proporcionan un enfoque eficaz para mejorar la estabilidad física de las sustancias activas encapsuladas y aumentar la distribución de los agentes antimicrobianos en matrices de alimentos donde se encuentran los microorganismos (Weiss y col., 2009). Aún habiendo pocos estudios actualmente, las nanoemulsiones con aceites esenciales han demostrado que presentan excelentes propiedades antimicrobianas contra una amplia variedad de microorganismos, siendo incluso necesarias menores

cantidades de los mismos para conseguir un efecto similar o incluso mayor (Donsi y col., 2011).

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de la adición conjunta de nisina y *D*-limoneno frente a *Listeria monocytogenes* en caldo de cultivo TSB (tryptic soy broth), comparando el efecto de la adición directa de los mismos al medio de cultivo, con el efecto de la adición de una nanoemulsión elaborada a partir de estos dos antimicrobianos. Para ello, se prepararon nanoemulsiones mediante el método CPI (Inversión de Fase Catastrófica) y se desarrollaron curvas de crecimiento por absorbancia en presencia de distintas concentraciones de antimicrobianos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento. En los experimentos se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* CECT 4032, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las células se hicieron crecer a 37°C en caldo TSB (*Scharlau Chemie S. A., Barcelona, España*) complementado con 0,5% de glucosa (p/v). Los cultivos se mantuvieron a -80°C en glicerol al 30% como crioprotector. Para preparar los inóculos se incubó el cultivo durante toda la noche en TSB a 37°C.

Antimicrobianos. La nisina y el *D*-limoneno se obtuvieron de Sigma Aldrich Chemie (*Steinheim, Alemania*). Se disolvieron en etanol al 50% y 95% (v/v) respectivamente (*Panreac, Barcelona, España*). Las soluciones de trabajo fueron preparadas a concentraciones finales de 30 µM y 100 µM respectivamente, y almacenadas en refrigeración hasta su uso. Las concentraciones ensayadas de nisina fue 0.0375 µM para las curvas de crecimiento y la de *D*-limoneno fue 1 mM.

Preparación de la nanoemulsión por el método CPI. Para la elaboración de la nanoemulsión de nisina y *D*-

limoneno se siguió el protocolo desarrollado por Zhang y col. (2013).

Curvas de crecimiento. El crecimiento en presencia de los antimicrobianos se determinó mediante absorbancia en un Bioscreen C (Lab Systems, Helsinki, Finlandia). Se partió de tubos con 4 mL de caldo TSB que contenían una concentración inicial de 10^3 ufc/mL. Seguidamente se añadieron los antimicrobianos a las concentraciones indicadas anteriormente y se pipetearon 400 μ L del cultivo con los antimicrobianos en cada uno de los pocillos de la microplaca del Bioscreen. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, midiéndose densidades ópticas en intervalos de 15 minutos a un intervalo de longitudes de onda de 420-580 nm. El cálculo de los parámetros de crecimiento (duración de la fase de latencia y velocidad de crecimiento) se realizó mediante el modelo de Baranyi y Roberts (1993), a través del software DMFit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de crecimiento elaboradas a partir de las densidades ópticas obtenidas mediante el Bioscreen mostraron, en los casos donde se empleó la emulsión de limoneno de manera individual y la combinación de antimicrobianos de manera directa, un aumento de la fase de latencia con respecto al control de 10.9 y 10.4 horas respectivamente (Tabla 1), con velocidades de crecimiento de 0.027 y 0.037 uds D.O./hora, siendo en este caso la velocidad de crecimiento del control de 0.120 uds. D.O./hora. Además, en ambos casos se pudo apreciar una menor densidad óptica final, la cual fue ligeramente mayor al emplear los antimicrobianos de manera combinada. Al ser aplicados en forma de emulsión, se pudo comprobar la inhibición del crecimiento del microorganismo durante las 100 horas de duración del experimento (Figura 1). En todos los casos se partió de una concentración inicial de microorganismos de 10^3 ufc/mL.

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, el empleo de los antimicrobianos en forma de nanoemulsión da lugar, a priori, a un producto miscible en medio acuoso, estable a lo largo del tiempo y, al potenciar notablemente el efecto antimicrobiano de esta combinación, se estaría contrarrestando en cierta medida la pérdida de eficacia que sufren los aceites esenciales debido a la oxidación; además de conseguir disminuir las concentraciones utilizadas hasta límites organolépticamente aceptados.

Tabla 1: Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 37°C en caldo TSB.

CONDICIÓN	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO \pm E.S. (uds. D.O. / hora)	DURACIÓN DE LA FASE DE LATENCIA \pm E.S. (horas)
CONTROL	0.120 \pm 0.002	9.726 \pm 0.050
NISINA 0.0375 μ M	0.125 \pm 0.001	13.300 \pm 0.080
LIMONENO 1 mM	0.148 \pm 0.003	11.980 \pm 0.065
EMULS. LIMONENO 1 mM	0.027 \pm 0.001	20.670 \pm 0.087
NISINA 0.0375 μ M LIMONENO 1 mM	0.037 \pm 0.00	20.100 \pm 0.173
NISINA 0.0375 μ M EMULS. LIMONENO 1 mM	0.000 \pm 0.000	> 100 horas

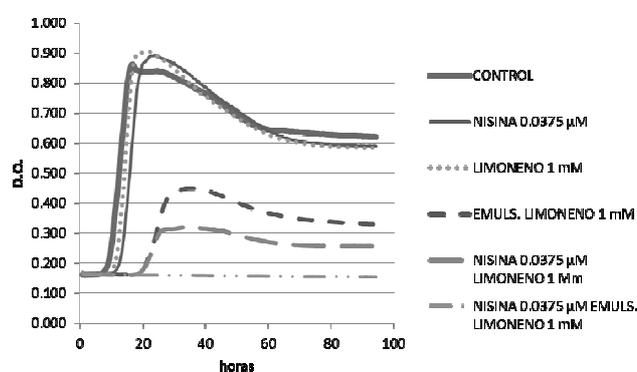


Figura 1: Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 37°C en caldo TSB. Se partió de una concentración inicial de microorganismo de 10^3 ufc/mL. Se evaluaron concentraciones de nisina (N) 0,12 ppm (p/v) y D-limoneno (L) y emulsión de D-limoneno (E) a 1 mM.

BIBLIOGRAFÍA

- Chikhoun A., Hazzit M., Kerbouche L., Baaliouamer A., Aissat K. 2013, Tetraclinis articulata (Vahl) Masters essential oils: Chemical composition and biological activities. J. Essent. Oil Res., 1–8.
- Donsì F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G. 2011, Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT-Food Sci. Technol., 44(9):1908–1914.
- Weiss J., Gaysinsky S., Davidson M., McClements J. 2009, Nanostructured encapsulation systems: Food antimicrobials. Global Issues Food Sci Technol., 425–480.
- Zhang Z., Vriesekoop F., Yuan Q., Liang H. 2013, Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsión. Food Chem., 150:307-312.

Tratamiento combinado con luz ultravioleta y calor para la pasteurización de zumo de zanahoria natural

Maria Gouma, Ignacio Álvarez, Santiago Condón

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, scondon@unizar.es

La eficacia bactericida de la luz ultravioleta sobre *E. coli* O157: H7 suspendido en zumo de zanahoria aumentó con la temperatura de tratamiento. El efecto letal de la combinación es sinérgico. Un tratamiento de luz UV (27,04 J/ml) y calor, a 60 °C, durante 3,5 minutos permitió inactivar más de 5 ciclos logarítmicos de la población de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae*. El mismo tratamiento redujo la población de esporos bacterianos de *Bacillus coagulans* y *Alicyclobacillus acidocaldarius* en 1,6 y 0,8 ciclos logarítmicos, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la radiación UV se está considerando como una posible alternativa ventajosa para la pasteurización de alimentos líquidos dado que es capaz de inactivar microorganismos con un coste económico escaso sin generar residuos tóxicos. Pese a sus ventajas, su aplicación industrial es todavía escasa por la baja capacidad de penetración de la radiación en líquidos con altos coeficientes de absorción y turbidez, como los zumos de frutas y vegetales. Para soslayar este inconveniente, algunos investigadores proponen su utilización en combinación con otras tecnologías que permitan mantener la calidad de los productos garantizando un adecuado nivel de inactivación de especies patógenas, por ejemplo los 5 ciclos logarítmicos propugnados por la FDA de los EE.UU. (U.S. FDA, 2001). Además de inactivar estos microorganismos patógenos, resultaría también de gran utilidad inactivar otras especies alterantes, puesto que esto permitiría prolongar la vida útil del producto y, por tanto, mejorar la competitividad de los fabricantes en nuestro mundo globalizado.

Recientemente, Gayán y col. (2011) demostraron que la eficacia bactericida de la luz UV aumentaba sinérgicamente con la temperatura de procesado, lo que abría la posibilidad de diseñar procesos combinados para la pasteurización de alimentos líquidos con altos coeficientes de absorción y turbidez. Por el momento, este efecto sinérgico se ha demostrado sólo en zumos de frutas ácidos con una turbidez relativamente baja, pero se desconoce su utilidad para pasteurizar otros alcalinos y más turbios que, como el zumo de zanahoria, son ampliamente consumidos en Europa.

El objetivo de esta investigación fue determinar la eficacia bactericida de un proceso combinado de luz ultravioleta y calor sobre los principales patógenos alimentarios y algunas especies alterantes suspendidas en zumo de zanahoria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para esta investigación, se utilizaron: *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium CECT 878, *Listeria monocytogenes* CECT 5672, *Staphylococcus aureus* CECT 446, *Lactobacillus plantarum* 220 CECT, *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1172, *Bacillus coagulans* CECT 4522 y *Alicyclobacillus acidocaldarius* CECT 5137.

Las suspensiones de células vegetativas se prepararon en caldo triptona soja (Oxoid, Inglaterra) suplementado con 0,6 % (p/v) de extracto de levadura (Oxoid), salvo *L. plantarum* que se cultivó en caldo MRS (Oxoid) y *S. cerevisiae* en caldo Sabouraud. Las suspensiones de esporos se prepararon en agar triptona soja (Oxoid) suplementado con 3 ppm de sulfato de manganeso.

El zumo se preparó a partir de zanahorias frescas. El zumo se extrajo de las zanahorias, lavadas y peladas, con una licuadora eléctrica doméstica y se filtró en una bolsa de "estomacher". El zumo tenía un pH de 6,5, una turbidez de 9.282 NTU y un coeficiente de absorción de 41,5 cm⁻¹. Estos valores eran muy semejantes a los de los zumos comerciales.

Los tratamientos de UV se llevaron a cabo en el equipo previamente descrito por Gayán y col. (2011).

El zumo de zanahoria se inoculó con la suspensión microbiana y posteriormente se bombeó a través del equipo a un caudal de 8,5 L/h. Una vez estabilizado el caudal se tomaron muestras a través de las válvulas colocadas a la salida de cada reactor. Tras las correspondientes diluciones, las muestras se sembraron en los medios sólidos homólogos a los utilizados para su crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones más adecuadas de tratamiento se establecieron tomando como referencia a *E. coli* O157:H7. Para ello, el zumo contaminado se trató con luz ultravioleta a 25, 50 y 60 °C. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 1. Como se observa en la figura, la luz UV inactivó 3,3 log₁₀; sin embargo la eficacia letal aumentó con la temperatura de tratamiento, produciendo más de 5 ciclos de inactivación a 60 °C.

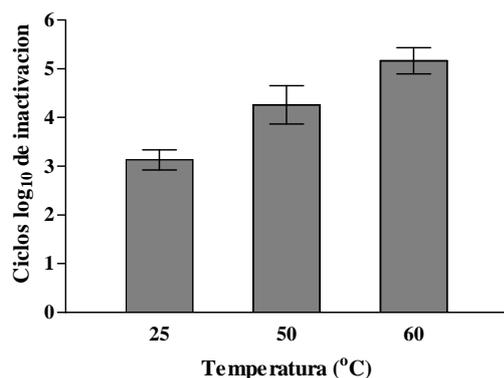


Figura 1: Inactivación de *E. coli* O157:H7, suspendido en zumo de zanahoria, por un tratamiento de luz UV-C (27,04 J/mL) a diferentes temperaturas.

Dado que 60 °C es una temperatura relativamente elevada, estudiamos si la eficacia letal total conseguida era el resultado de un efecto aditivo o sinérgico. Como muestra la figura 2 un tratamiento térmico de la misma duración apenas inactivaba a esta especie medio ciclo logarítmico, lo que demostraba que el efecto observado con el proceso combinado era sinérgico.

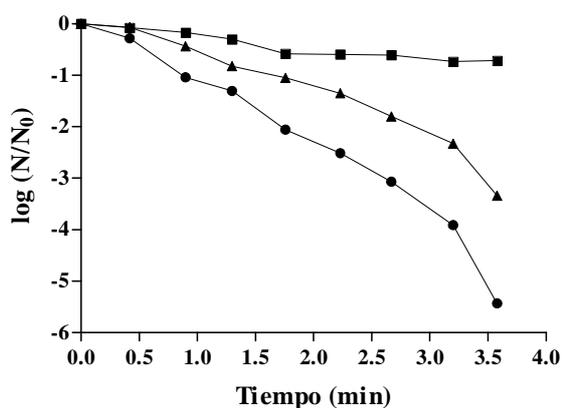


Figura 2: Curvas de supervivencia de *E. coli* O157:H7 tratado por UV (▲), calor a 60 °C (■) y el proceso combinado UV-H a 60°C(●).

Dado que el tratamiento con luz UV a 60 °C fue capaz de garantizar 5 ciclos de inactivación de *E. coli* se decidió investigar el efecto letal de este tratamiento sobre otras células vegetativas de microorganismos patógenos, alterantes y de esporos bacterianos. El nivel máximo de inactivación alcanzado para cada microorganismo, junto con el tiempo de tratamiento necesario para lograrlo, se incluye en la Tabla 1.

Como se observa en la tabla, el tratamiento de UV a 60 °C permitió conseguir más de 5 ciclos log₁₀ de inactivación de todas las especies vegetativas patógenas. *E. coli* y *L. monocytogenes* resultaron las más resistentes, precisando una dosis de 27,04 J/mL

de luz ultravioleta para alcanzar el nivel de inactivación deseado. Las especies vegetativas alterantes resultaron menos resistentes que esas dos patógenas. El tratamiento fue también capaz de inactivar aproximadamente el 90 % de los esporos bacterianos.

Tabla 1: Ciclos logarítmicos de inactivación de distintas especies microbianas suspendidas en zumo de zanahoria sometidas a un tratamiento combinado de luz UV-C a 60 °C.

Microorganismo	Ciclos Log ₁₀ inactivación	Tiempo tratamiento (min)
<i>E.coli</i> O157:H7	5,4	3,6
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,3	3,6
<i>Salmonella</i> Typhimurium	> 6,0	2,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	>5,0	1,8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5,7	3,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	> 5,0	0,9
Esporos de <i>Bacillus coagulans</i>	1,6	3,6
Esporos de <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	0,8	3,6

El zumo obtenido tras el tratamiento mostraba un pH y una textura que no difería significativamente de la del zumo recién exprimido. El análisis del color demostró una pequeña diferencia ($\Delta E= 1,2$) entre ambos zumos, siendo el tratado ligeramente más rojo y ligeramente menos amarillo que el fresco.

Estos resultados indican que la combinación de la luz UV (27,04 J/ml) y calor, a 60 °C, durante 3,5 minutos podría ser una alternativa muy ventajosa para la pasteurización del zumo de zanahoria. Actualmente se están realizando experimentos para estudiar la evolución de la calidad del zumo en las condiciones habituales de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Gayán, E., Monfort, S., Álvarez, I., Condón, S. 2011. UV-C inactivation of *E. coli* at different temperatures. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12,4 :531-541.

U.S. Food and Drug Administration (2001). Hazard analysis and critical control points (HACCP): Final rule. Federal Register 66. Washington, DC: U.S. Food and Drug Administration.

Agradecimientos. Esta investigación ha sido financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20), el Fondo Social Europeo y MENR de Grecia (2007-2013).

Inactivación de esporos de *Alicyclobacillus spp.* mediante tratamientos combinados de alta presión y temperatura en zumo de naranja

Sergio J. Ramos¹, Raquel Virto¹ y Santiago Condón²

¹ Área de I+D+i, Nuevas Tecnologías de conservación, Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA). Ctra. NA-134, Km. 53, 31570 San Adrián, Navarra, España, sramos@cnta.es

² Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza

Los esporos de *Alicyclobacillus spp.* pueden sobrevivir a los tratamientos térmicos de pasteurización utilizados habitualmente en los zumos de frutas comerciales, provocando la alteración de estos productos. Teniendo en cuenta los casos de alteración detectados y las pérdidas económicas ocasionadas en la industria de zumos de frutas, se estudió el uso de la Alta Presión (600 MPa) en combinación con temperatura (40-80 °C) (HPT) y tiempos de 0 a 30 min para la inactivación de esporos de *Alicyclobacillus spp.* en zumo de naranja. Los tratamientos de alta presión a temperatura ambiente y a 40 °C consiguieron menos de 1 log de inactivación en todas las cepas estudiadas. La combinación de alta presión y temperaturas de 60 °C y 80 °C permitió obtener mayores niveles de inactivación en todas las cepas, siendo esta inactivación mayor a mayor tiempo de tratamiento. Tras 30 min de tratamiento a 600 MPa y 60 °C se obtuvieron entre 3.3 y 4.4 log de inactivación en función de la cepa estudiada. En el caso de un tratamiento a 600 MPa y 80 °C se consiguieron >5 log en todas las cepas tras 5 minutos de tratamiento. En todos los casos la cepa que mostró mayor resistencia fue *A. acidoterrestris* CECT 7094. La resistencia de la cepa 7094 fue mayor cuando se inoculó sola en zumo de naranja comercial que en un cultivo mixto en un zumo recién exprimido, siendo necesario un tratamiento de al menos 600 MPa y 80 °C durante 5 y 2 minutos respectivamente para conseguir 5 log de inactivación. Los resultados de este estudio demuestran que la tecnología HPT podría ser una alternativa prometedora para el control de las alteraciones producidas en zumos y bebidas de frutas por esporos de *Alicyclobacillus spp.*

INTRODUCCIÓN

La alta acidez (pH < 4,6) de la mayoría de los zumos de frutas no permite el crecimiento de patógenos y de la mayoría de los esporos bacterianos. Generalmente, la alteración microbiana de los zumos de frutas se controla mediante tratamientos de pasteurización de 85-95 °C durante 1-2 minutos.

Sin embargo, la presencia de esporos termoacidófilos de *Alicyclobacillus spp.* es un problema en la industria de zumos a nivel mundial. Se ha sugerido el uso de *Alicyclobacillus* como microorganismo de referencia para el diseño de procesos de pasteurización en zumos de frutas estables microbiológicamente (Silva y col., 2012).

La tecnología de Alta Presión en combinación con temperatura (HPT) es una alternativa potencial al tratamiento térmico en zumos de frutas. El objetivo principal de este estudio fue (i) determinar el efecto letal de los tratamientos HPT en la resistencia de diferentes cepas de *Alicyclobacillus spp.* en zumo de naranja comercial; (ii) seleccionar la cepa más resistente a los tratamientos HPT; (iii) establecer la presión y temperatura óptimas para inactivar al menos 5 log la población de esporos; y (iv) evaluar el efecto del tratamiento combinado óptimo sobre un cultivo mixto de 5 cepas de *Alicyclobacillus spp.* en zumo de naranja fresco recién exprimido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de *Alicyclobacillus spp.* y medio de crecimiento. Las cepas de *A. acidoterrestris* CECT 7094, *A. acidocaldarius* CECT 4328 y *Alicyclobacillus sp.* CECT 5137 fueron adquiridas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las cepas *A. acidoterrestris* DSM 2498 y *A. acidiphilus* DSM 14558 fueron adquiridas de la Colección Alemana de Cultivos Microbiológicos (DSMZ). Estas cepas se incubaron en YSG (pH 3,5) a 42 °C durante 3 días para obtener una suspensión fresca de trabajo a una concentración de aproximadamente 10⁸-10⁹ ufc/ml.

Producción de esporos de *Alicyclobacillus spp.* Las suspensiones frescas de cada cepa se inocularon en placas de YSG agar (YSGa) que se incubaron a 42°C durante 10 días hasta obtener un 90-99 % de esporulación.

Medio de tratamiento. Zumo de naranja comercial (Marca Eroski, España) fue usado como medio de tratamiento para determinar el efecto letal de los tratamientos HPT sobre las distintas cepas de *Alicyclobacillus spp.* El efecto del tratamiento óptimo sobre un cultivo mixto de las distintas cepas se llevó a cabo en zumo de naranja recién exprimido a partir de naranjas de la variedad Valencia. Las muestras de zumo se inocularon con las distintas cepas por separado y, con el cultivo mixto a una concentración aproximada de 10⁷ ufc/ml en bolsas de plástico a vacío.

Tratamientos HPT. Los tratamientos HPT se llevaron a cabo en un equipo de Alta Presión isostático de Stansted Fluid Power LTD FPG 11500 B (Stansted, Essex, UK). Las

muestras se trataron a 600 MPa a temperatura ambiente (20 °C) y a 40, 60 y 80 °C durante 0 a 30 minutos.

Tratamientos térmicos de los esporos. El tratamiento térmico a 90 °C de las distintas cepas se llevó a cabo en un termorresistómetro (Condón y col., 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos aplicados en zumo de naranja comercial a 600 MPa a temperatura ambiente y a 40°C no consiguieron niveles de inactivación superiores a 1 log en ninguna de las cepas estudiadas (datos no mostrados). Sin embargo, la combinación de alta presión a 600 MPa y temperaturas de 60 y 80 °C permitió obtener mayores niveles de inactivación en todas las cepas (Figuras 1 y 2). Como era de esperar, a mayor tiempo de tratamiento se obtuvieron mayores niveles de inactivación. A 60 °C, se consiguieron niveles de inactivación entre 3.3 y 4.6 log al mayor tiempo de tratamiento aplicado. El aumento de temperatura hasta 80 °C permitió obtener > 5 log de inactivación en todas las cepas tras 5 minutos de tratamiento.

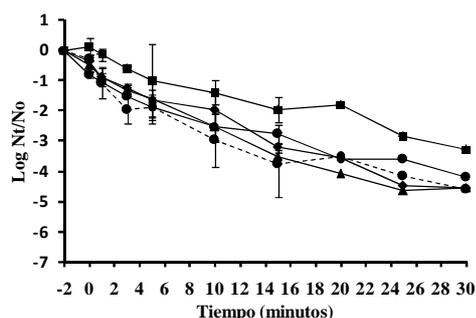


Figura 1: Curvas de supervivencia de distintas cepas de *Alicyclobacillus* spp. a 600 MPa y 60 °C: (■) CECT 7094; (●) CECT 5137; (◆) CECT 4328; (● discontinuo) DSMZ 2498; (▲) DSMZ 14558.

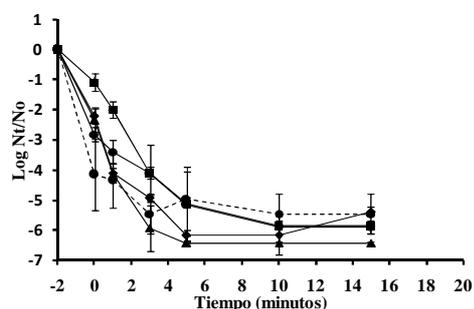


Figura 2: Curvas de supervivencia de distintas cepas de *Alicyclobacillus* spp. a 600 MPa y 80 °C: (■) CECT 7094; (●) CECT 5137; (◆) CECT 4328; (● discontinuo) DSMZ 2498; (▲) DSMZ 14558.

La resistencia a la presión de las 5 cepas de *Alicyclobacillus* se comparó también con su resistencia a un tratamiento térmico a 90°C. Como se

ha visto, las cepas de *Alicyclobacillus* mostraron una resistencia diferente a la presión siendo la cepa *A. acidoterrestris* CECT 7094 la más resistente. Sin embargo, la resistencia a la presión no se correlacionó con la resistencia al calor, siendo la cepa *A. acidoterrestris* DSM 2498 la más resistente al tratamiento térmico. Los valores D obtenidos para cada cepa fueron: D₉₀ (CECT 2498) 7,5; D₉₀ (CECT 4328) 15,9; D₉₀ (CECT 5137) 9,2; D₉₀ (CECT 7094) 11; D₉₀ (CECT 14558) 16,1 minutos.

Debido a la diferente resistencia de las cepas a los tratamientos HPT, se comparó la resistencia de las 5 cepas inoculadas en un cultivo mixto en zumo de naranja recién exprimido con los datos obtenidos en la cepa 7094 en zumo de naranja comercial (Figura 3).

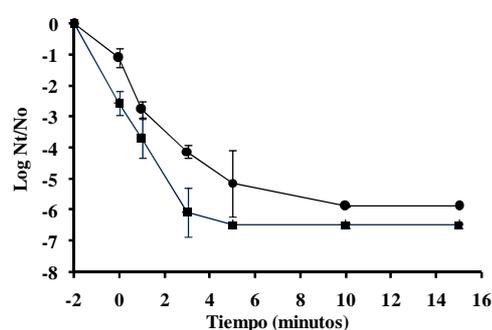


Figura 3: Curvas de supervivencia de *A. acidoterrestris* CECT 7094 (●) en zumo de naranja comercial y de un cultivo mixto de 5 cepas de *Alicyclobacillus* en zumo de naranja recién exprimido (■) tratados a 600 MPa y 80 °C.

Los resultados obtenidos mostraron que la resistencia de la cepa 7094 fue mayor cuando fue inoculada sola en zumo de naranja comercial que en un cultivo mixto en zumo recién exprimido, siendo necesario un tratamiento de al menos 600 MPa y 80 °C durante 5 y 2 minutos respectivamente para conseguir 5 log de inactivación.

Los resultados de este estudio demuestran que la tecnología HPT podría ser una alternativa prometedora para el control de las alteraciones producidas en zumos y bebidas de frutas por esporos de *Alicyclobacillus* spp.

BIBLIOGRAFÍA

- Silva, F., Tan, E., Farid, M. 2012, Bacterial spore inactivation at 45-65 °C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. Food Microbiol., 32:206-211.
- Condón, S., Arrizubieta, M.J., Sala, F.J. 1993, Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology. J. Microbiol. Methods, 18:357-366.

Influencia de la temperatura del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en la permeabilización de *Chlorella vulgaris*.

Elisa Luengo, Andrea Bordetas, Ignacio Álvarez y Javier Raso

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, eluengo@unizar.es

En esta investigación, se estudió la influencia de la temperatura (10-40°C) del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) de distintas intensidades (10-25 kV/cm) en la electroporación de la microalga *Chlorella vulgaris*. Tanto la permeabilización reversible como irreversible detectada como el porcentaje de captación de yoduro de propidio (YP) aumentaron con el campo eléctrico y la temperatura de tratamiento. Por otro lado, un aumento de la temperatura permitió descender el campo eléctrico crítico necesario para producir una permeabilización irreversible de la membrana plasmática. Mientras un tratamiento de 15kV/cm-75µs a 25 y 40°C fue suficiente para obtener el máximo grado de permeabilización, cuando las células de *C. vulgaris* fueron tratadas por PEAV, a 10°C incluso con el campo eléctrico más alto investigado (25 kV/cm) sólo un 80% de las células fueron permeabilizadas. Por lo tanto, teniendo en cuenta que un aumento en la extracción de bioproductos de las microalgas está basado en la formación de poros irreversibles, la aplicación de PEAV a temperaturas superiores a 25°C permitiría utilizar intensidades de tratamiento moderadas.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las microalgas han despertado un gran interés ya que son una fuente natural, renovable, disponible de forma continua y abundante de compuestos que pueden ser utilizados en la industria como aditivos naturales o compuestos activos en las formulaciones. *Chlorella vulgaris* es un buen ejemplo, ya que es fuente abundante de luteína. La luteína es una xantofila, utilizada como pigmento natural (E-161 b), pero que además ejerce un efecto protector frente a la degeneración macular y ciertos tipos de cáncer debido a su poder antioxidante.

Uno de los pasos clave para la obtención de bioproductos de las microalgas, es el proceso de extracción. Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) producen la electroporación de la membrana celular, es decir, un aumento de la permeabilidad de la membrana al paso de iones y macromoléculas. Diversos estudios han demostrado la capacidad de los PEAV para permeabilizar la membrana de las microalgas y mejorar la extracción de bioproductos (Grimi y col. 2014). Sin embargo, además de los parámetros del tratamiento (tiempo, campo eléctrico), se ha demostrado que la temperatura a la cual se aplican los PEAV también ejerce un papel importante en la electroporación de la membrana. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la temperatura de tratamiento en la permeabilización de la membrana plasmática de *Chlorella vulgaris*.

MATERIAL Y MÉTODOS

C. vulgaris fue cultivada en medio BG-11 a 30°C. La densidad celular fue determinada mediante microscopio con

una cámara de Thoma. Las células se trataron cuando se encontraban en fase estacionaria entre el día 10 y 15 de crecimiento.

Tratamiento PEAV. Los microorganismos fueron tratados en una cámara a temperatura (10.0, 25.0, 40.0 ± 1.0°C) de electrodos paralelos con una separación entre los electrodos de 0,25 cm y un área de 1,76 cm². Antes del tratamiento las células de *C. vulgaris* fueron centrifugadas a 3000×g 10 min y resuspendidas en tampón citrato-fosfato McIlvaine (1 mS/cm; pH 7) con concentración final de 10⁹ UFC/ml. Se aplicaron tratamientos de PEAV de hasta 50 pulsos de onda cuadrada de 3µs a 0,5 Hz de 10, 15, 20 y 25 kV/cm.

Determinación de la permeabilización celular con Yoduro de Propidio (YP). Para la determinación de la permeabilización causada por los PEAV se utilizó el fluorocromo YP. Para la determinación de la permeabilización total (reversible e irreversible), el YP fue añadido antes del tratamiento de PEAV. Una vez aplicado el tratamiento las muestras se incubaron 15 min en la oscuridad y tras lavarlas dos veces se midió su fluorescencia mediante un fluorímetro. Para la determinación de la permeabilización irreversible, se siguió el mismo protocolo, sin embargo, el YP fue añadido después del tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra, como ejemplo, la influencia de un tratamiento de PEAV de 75 µs (25 pulsos de 3µs) aplicado a varios campos eléctricos y temperaturas en la permeabilización de *C. vulgaris*, evaluada como el % de captación de YP. Independientemente del protocolo de tinción, el % de captación de YP aumentó con el campo eléctrico y la temperatura.

Cuando el YP fue añadido antes del tratamiento de PEAV para detectar la permeabilización total, se observó que en tratamientos aplicados a 25 y 40°C el

% de captación de YP era máximo incluso con el campo eléctrico más bajo investigado (10kV/cm). Sin embargo, cuando la temperatura de tratamiento descendió a 10°C, fue necesario aumentar el campo eléctrico por encima de los 15kV/cm para poder obtener el mismo grado de permeabilización.

Por otro lado, cuando el YP fue añadido tras el tratamiento para detectar la permeabilización irreversible, en los tratamientos aplicados a 25 y 40°C, fue necesario un campo eléctrico de al menos 15kV/cm para conseguir el máximo grado de permeabilización. A 10°C, la temperatura más baja estudiada, incluso con el campo eléctrico más alto aplicado (25kV/cm) no se consiguió este % de permeabilización alcanzado a temperaturas más altas. Esta diferencia observada entre la captación de YP cuando éste se añadió antes o después del tratamiento revela la existencia de permeabilización reversible. Es decir, que las células de *C.vulgaris* se electroporaron durante el tratamiento permitiendo la entrada de YP. Sin embargo, tras el tratamiento, estos poros se cerraron impidiendo la entrada al YP. Por lo tanto, mientras que a 25 y 40°C, esta reversibilidad solo se observa con el campo eléctrico más bajo estudiado (10kV/cm), a 10°C, el % de captación de YP fue siempre inferior cuando este se añadió tras el tratamiento. Por ejemplo, a 10kV/cm, se detectó un 75% de captación de YP cuando este fue añadido antes del tratamiento, pero tan solo se detectó un 5% cuando este se añadió después del tratamiento.

Los modelos teóricos indican que cuando una célula se somete a un campo eléctrico, este induce un potencial transmembrana que produce una reorganización estructural de la bicapa lipídica, provocando la formación de poros hidrofílicos. La reversibilidad o irreversibilidad del tratamiento ha sido correlacionada con el número de poros formados en la membrana plasmática. Existe una relación entre la temperatura y los cambios de fase del estado gel a líquido-cristalino de la membrana plasmática. Un aumento de la temperatura, implica una menor ordenación de la bicapa lipídica. Diversos estudios han demostrado que esta menor ordenación hace la membrana más sensible a la acción del campo eléctrico (Reigada, 2014). Por lo tanto una mayor organización de la estructura a bajas temperaturas provocaría que el mismo campo eléctrico aplicado a menores temperaturas produjera un menor número de poros en la membrana y, por lo tanto, facilitaría la recuperación de la misma.

La aplicación de PEAV para la extracción de compuestos de interés de las microalgas está basada en la permeabilización irreversible de las membranas. Si se tiene en cuenta que la mayoría de los compuestos de interés se encuentran dentro de

orgánulos en el interior de las células, el tiempo necesario para su extracción es mayor que el tiempo que permanecen abiertos los poros (Saulis y col. 1991). Por lo tanto, sería recomendable la aplicación de PEAV a temperaturas por encima de los 25 °C que permitirían utilizar campos eléctricos moderados y por lo tanto tratamientos menos energéticos, para permeabilizar las células de *C. vulgaris* y mejorar la extracción de los compuestos de interés como la luteína.

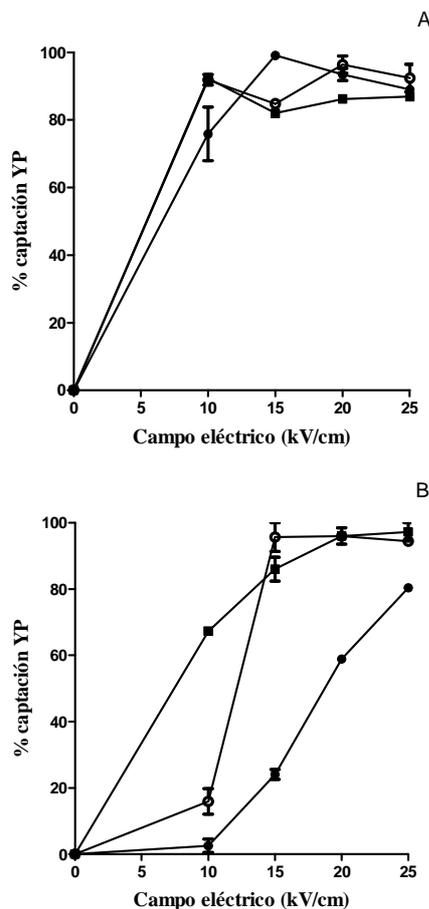


Figura 1. Influencia del campo eléctrico a varias temperaturas de tratamiento en el % de captación de YP, cuando el YP fue añadido antes (A) y después (B) del tratamiento. Tiempo de tratamiento: 75µs (25 pulsos de 3µs). 10 °C (●), 25 °C (○), 40 °C (■).

BIBLIOGRAFÍA

- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresour. Technol.*, 153, 254-259.
- Reigada, R. (2014). Electroporation of heterogeneous lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1838(3), 814-821.
- Saulis, G., Venslauskas, M. S., & Naktinis, J. (1991). kinetics of pore resealing in cell-membranes after electroporation. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 26(1), 1-13.

Agradecimientos. Investigación financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20) y el Fondo Social Europeo. E.L. agradece su beca al Gobierno de Aragón.

Efecto de las altas presiones y de la composición química sobre la microbiota del jamón Serrano

Nerea Martínez-Onandi, Ana Rivas-Cañedo, Antonia Picon y Manuel Núñez

Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, España, martinez.nerea@inia.es

Se han estudiado 60 jamones Serranos, con contenidos de grasa intramuscular entre el 1,8 y el 14,0% y de sal entre el 1,7 y el 6,8%. De cada jamón se tomaron dos porciones de la maza, que fueron envasadas a vacío. Una se utilizó como control (C) y la otra fue tratada por altas presiones (AP) a 600 MPa durante 6 min a 21°C. La mitad de las muestras fueron analizadas a los 3 días del tratamiento de AP y el resto se mantuvo a 4°C durante 5 meses para simular el periodo de comercialización y venta. En las muestras control los niveles medios iniciales de microorganismos aerobios totales, psicrotrofos, y mohos y levaduras fueron de 3,1, 3,0 y 3,0 log ufc / g, respectivamente, los de micrococáceas de 2,3 log ufc / g y los de bacterias lácticas de 1,5 log ufc / g. El tratamiento de AP redujo significativamente ($P < 0,001$) los niveles de todos los grupos microbianos, con reducciones de 1,2 a 2,0 unidades logarítmicas tras su aplicación. Después de 5 meses a 4°C, en las muestras C se observó un aumento de aproximadamente una unidad logarítmica en todos los grupos microbianos. En las muestras AP se produjo una recuperación de los microorganismos (a excepción de las bacterias lácticas) hasta alcanzar niveles similares a los de las muestras C. Se observó que las muestras de jamón con mayor contenido en grasa tenían niveles significativamente ($P < 0,05$) más bajos de microorganismos aerobios totales, psicrotrofos y mohos y levaduras, mientras que las muestras con mayor contenido en sal tenían niveles significativamente ($P < 0,05$) más elevados de microorganismos aerobios totales, psicrotrofos, bacterias lácticas y mohos y levaduras.

INTRODUCCIÓN

El jamón curado es uno de los productos cárnicos más apreciados en España por sus características sensoriales (Toldrá y col., 1998). Debido a la demanda creciente de alimentos listos para el consumo con niveles reducidos de grasa y sal, las industrias tienden a producir jamón Serrano con menor contenido de grasa y sal. Sin embargo, un bajo contenido en grasa puede afectar negativamente al sabor y aroma del producto y un bajo contenido en sal puede aumentar el riesgo microbiológico.

Una gran proporción de jamones son comercializados tras ser deshuesados, divididos en tacos o lonchas y envasados. Aunque por su baja actividad de agua el jamón curado sea un alimento bastante seguro, durante su procesado y manipulación en la industria puede contaminarse por bacterias patógenas o alterantes (Morales y col., 2006). Los tratamientos por altas presiones (AP) permiten mejorar la seguridad de los alimentos listos para el consumo, al reducir la carga microbiana sin apenas afectar a las características nutritivas y sensoriales del producto.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las AP sobre la microbiota del jamón Serrano con diferentes contenidos de grasa intramuscular y sal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de jamones Serranos. Se salaron 60 jamones Serranos de diferentes razas aplicando entre 0,6 y 1,5 días /

kg de peso fresco, para obtener productos con amplios rangos de contenido de grasa y sal. Tras el salado y lavado, los jamones fueron curados en una cámara a 3°C y humedad relativa del 75%. La temperatura de la cámara fue aumentando gradualmente hasta 20°C. Los jamones fueron curados hasta conseguir una merma del 36%.

Muestras y tratamiento de AP. Se tomaron dos porciones de unos 150 g de la maza y se envasaron a vacío. Una de las porciones (AP) fue tratada a 600 MPa durante 6 min a 21°C en un equipo Wave de 120 L (Hiperbaric, Burgos) y la otra (C) sirvió de control. La mitad de las muestras, tanto AP como C, fueron analizadas a los 3 días del tratamiento y el resto se mantuvo a 4°C durante 5 meses para simular el periodo de comercialización y venta.

Determinaciones fisicoquímicas. El contenido en grasa intramuscular fue analizado mediante el método Folch (1957) y el contenido en sal mediante el método de la AOAC (2000).

Análisis microbiológicos. Se homogeneizaron 10 g de jamón serrano en 90 mL de agua de peptona salina al 0,1% estéril. Se prepararon diluciones decimales en la misma solución, y se realizaron las siguientes determinaciones: microorganismos aerobios totales, (PCA, 30°C, 48 h), psicrotrofos totales, (PCA, 8°C, 7 días), bacterias lácticas (MRS, 30°C, 72 h en anaerobiosis), enterobacteriáceas (VRBG, 37°C, 24 h en doble capa), enterococos (KAA, 37°C, 24 h), micrococáceas (MSA, 37°C, 36 h), estafilococos (BP, 37°C, 24 h), mohos y levaduras (SDA, 25°C, 5 días), presencia / ausencia de *Listeria monocytogenes* y presencia / ausencia de *Salmonella* (mediante enriquecimiento primario, enriquecimiento secundario y siembra en medios selectivos apropiados).

Análisis estadísticos. Las muestras fueron clasificadas en tres niveles utilizando la media $\pm 0,5$ D.S. como criterio.

Se realizaron análisis de varianza con el tratamiento de AP y una de las variables de composición como efectos principales, y comparación de medias mediante el test de Tukey, utilizando el programa SPSS (SPSS, Inc., EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las altas presiones

El tratamiento de AP (Figura 1) redujo significativamente ($P < 0,05$) los niveles de todos los grupos microbianos detectados, obteniéndose reducciones comprendidas entre 1,2 y 2,0 unidades logarítmicas para la mayoría de ellos.

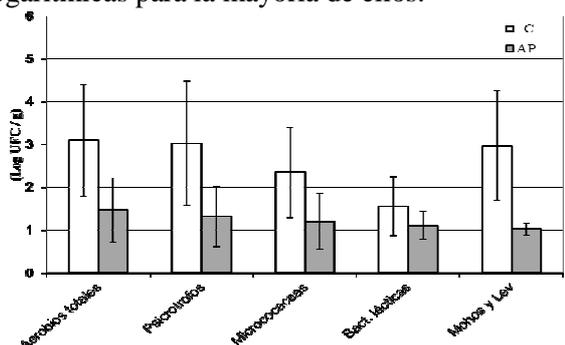


Figura 1: Niveles microbianos en jamón Serrano (C: muestras control; AP: muestras tratadas por AP) tras la aplicación del tratamiento.

Durante los 5 meses de almacenamiento en refrigeración (Figura 2) en las muestras C tuvo lugar un aumento de aproximadamente una unidad logarítmica en todos los grupos microbianos, mientras que en las muestras AP se produjo una recuperación en los niveles de microorganismos, con excepción de las bacterias lácticas, hasta niveles similares a los de las muestras C.

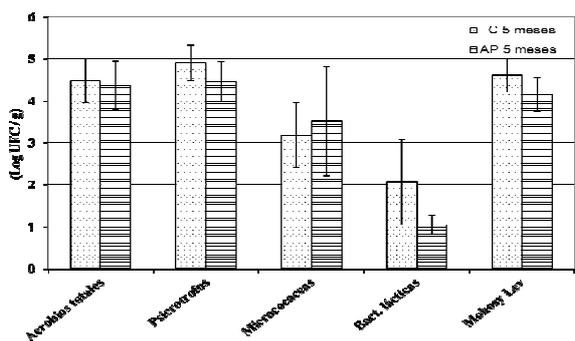


Figura 2: Niveles microbianos en jamón Serrano tras un periodo de almacenamiento a 4°C durante 5 meses.

Efecto de la composición del jamón

En los análisis fisicoquímicos de las muestras de jamón Serrano se obtuvieron contenidos de grasa intramuscular comprendidos entre el 1,8 y el 14,0% y de sal entre el 1,7 y el 6,8%.

En las muestras C se observaron niveles significativamente ($P < 0,05$) más bajos de microorganismos aerobios totales (Figura 3), psicrotrofos y mohos y levaduras al aumentar el contenido en grasa, mientras que eran significativamente ($P < 0,05$) más altos los niveles de microorganismos aerobios totales (Figura 4), psicrotrofos, bacterias lácticas y mohos y levaduras en las de mayor contenido en sal. En las muestras tratadas por AP no se observó un efecto de la composición sobre los niveles de microorganismos.

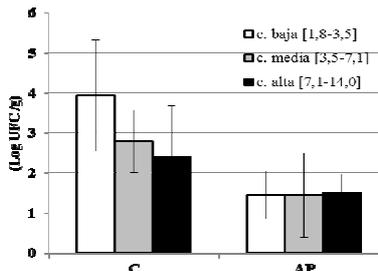


Figura 3: Niveles de microorganismos aerobios totales en jamón Serrano en función de la concentración de grasa de las muestras.

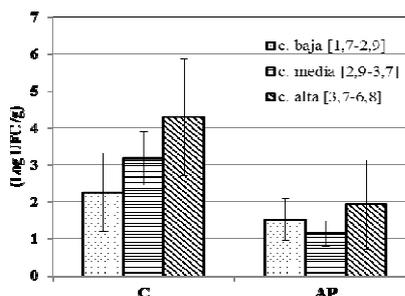


Figura 4: Niveles de microorganismos aerobios totales en jamón Serrano en función de la concentración de sal de las muestras.

Tras 5 meses de almacenamiento en refrigeración, se observaron niveles significativamente ($P < 0,05$) más bajos de microorganismos aerobios totales, psicrotrofos, micrococáceas y mohos y levaduras en las muestras C y AP con mayor contenido en grasa. No se observó un efecto significativo del contenido en sal sobre ninguno de los grupos microbianos detectados.

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C., 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Washington D.C, EE.UU.
 Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, 226, 497-509.
 Morales, P., Calzada, J., 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. J Food Prot, 69, 2539-2543.
 Toldrá, F., Flores, M. 1998. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. Crit Rev Food Sci Nutr, 38, 331-352.

Efecto combinado de calor y nisina en la inactivación de *Clostridium sporogenes*

María Ros-Chumillas, M^a Dolores Esteban, y Alfredo Palop

Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad Politécnica de Cartagena, España, may.ros@upct.es

Clostridium sporogenes es una bacteria anaerobia presente en alimentos y responsable de ocasionar daños y alteraciones en los productos alimentarios. Sus esporas son capaces de sobrevivir a las tecnologías térmicas de procesado actuales y a los conservantes químicos, y posteriormente, son capaces de germinar y crecer en envases cerrados herméticamente. La tendencia de la industria alimentaria para asegurar la estabilidad y seguridad microbiológica de estos alimentos es la de dar un sobreprocesado a los productos, lo que conlleva un detrimento de las características sensoriales del mismo. Sin embargo, los consumidores, demandan actualmente alimentos con mejores características organolépticas y nutritivas. La nisina es una bacteriocina capaz de inhibir algunas variedades de células vegetativas y esporos de bacterias Gram-positivas como *Clostridium*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la nisina adicionada tanto en el medio de calentamiento como de recuperación sobre la resistencia térmica de *C. sporogenes* en tampón fosfato y en caldo ternera.

INTRODUCCIÓN

Clostridium sporogenes es una bacteria anaerobia presente en alimentos y responsable de ocasionar daños y alteraciones en los productos alimentarios. Sus esporas son capaces de sobrevivir a las tecnologías térmicas de procesado actuales y a los conservantes químicos, y posteriormente, son capaces de germinar y crecer en envases cerrados herméticamente (Naim y col. 2008).

La nisina (E-234) es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, reconocida como GRAS (Generally Recognized As Safe). Su uso como conservante alimentario está autorizado en la Unión Europea por la Directiva 95/2/CE sobre aditivos alimentarios diferentes a los colorantes y los edulcorantes, modificada por la Directiva 98/72/CE. Este compuesto es utilizado mayoritariamente en la industria quesera para controlar el crecimiento de *Clostridium* spp. y en otros alimentos cremosos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la nisina adicionada tanto en el medio de calentamiento como de recuperación sobre la resistencia térmica de *C. sporogenes* en tampón fosfato (PBS) y en caldo ternera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo. La cepa utilizada para este estudio fue *Clostridium sporogenes* S3213 13A (suspensión amablemente facilitada por el Centre Technique para la Conservation des Produits Agricoles, Avignon, Francia). La suspensión de esporos se dejó madurar al menos dos semanas antes de llevar a cabo las determinaciones de su termorresistencia y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Determinaciones de termorresistencia. Las determinaciones de termorresistencia se llevaron a cabo en un termorresistómetro Mastia (Conesa y col. 2009). Los tratamientos isotérmicos se llevaron a cabo a: 95 y 100 °C. Una vez estabilizada la temperatura de tratamiento en el medio de calentamiento (400 mL de PBS pH=7.5 y caldo de ternera pH= 5.8), éste se inoculaba con 0,2 mL de la suspensión de esporos. La extracción de muestras se realizaba a intervalos predeterminados de tiempo. Para el recuento de viables, a las muestras se le realizaban las diluciones seriadas apropiadas en agua de peptona, se sembraban en doble capa en agar carne-hígado glucosa con y sin la adición de nisina en una concentración de 0,01 mg L⁻¹ (Sigma Aldrich, Alemania) y se incubaban en anaerobiosis a 37 °C durante 48 h. Todas las determinaciones de termorresistencia se realizaron al menos por duplicado.

Análisis de datos. Las curvas de supervivencia mostraron fenómenos de hombro o cola. Por esta razón se eligió el modelo no lineal de Weibull para describir dichas curvas. Para aplicar el modelo se utilizó la función de supervivencia de la distribución de Weibull propuesta por Mafart y col. (2002) (ec.1).

$$\text{Log} \frac{N}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (1)$$

donde δ representa el tiempo necesario para la primera reducción decimal (min) y p es el parámetro de forma.

Análisis estadístico. Las regresiones no lineales del modelo de Weibull se estimaron con la herramienta Solver de Excel (Microsoft® Excel 2000 para Windows®).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los valores de termorresistencia entre ambos medios de calentamiento utilizados. Cuando adicionamos 0,01 mg L⁻¹ de nisina al medio de calentamiento no se observó efecto significativo en la termorresistencia del microorganismo, lo que concuerda con otros autores (Huertas y col. 2014).

Sin embargo, cuando la misma concentración de nisina fue añadida al medio de recuperación, los resultados mostraron un notable efecto de la nisina sobre la termorresistencia, incluso a concentraciones muy bajas (0,01 mg L⁻¹) como se observan en las figura 1. De hecho, el valor δ_{105} bajó de 0,91 a 0,02 en PBS y de 0,82 a 0,08 en caldo de ternera al adicionar 0,01 mg L⁻¹ de nisina al medio. Los efectos observados fueron muy similares en las dos temperaturas estudiadas (95 y 100°C). Estos resultados fueron similares a los encontrados por Huertas y col. (2014) para *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

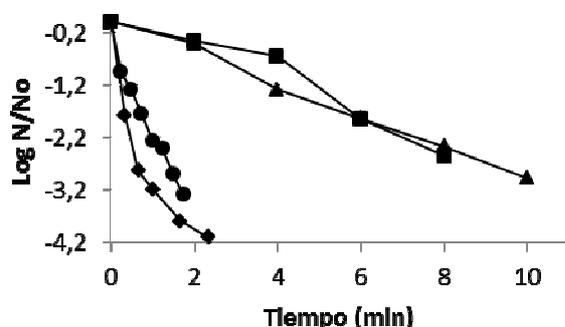


Figura 1: Curvas de supervivencia de *C. sporogenes* con nisina en el medio de recuperación a 100°C en PBS y caldo de ternera. (■) control en caldo de ternera; (●) Nisina 0.01 mg L⁻¹ en caldo de ternera; (▲) control en PBS (◆) Nisina 0.01 mg L⁻¹ en PBS.

Dado que las curvas de supervivencia de *C. sporogenes* mostraban una tendencia no lineal, con forma de hombro para ambos medios utilizados y con forma de cola para PBS con la adición de nisina, se utilizó el modelo no lineal de Weibull obteniéndose $p \geq 1$ tanto para PBS como caldo de ternera ($p_{PBS}=1.29$ y $p_{CALDO}=1.32$), mientras que para los experimentos realizados con la adición de nisina al medio de recuperación se

obtuvieron unos valores $p \leq 1$ ($p_{PBS}=0.73$ y $p_{CALDO}=1.03$).

La adición de nisina inhibe la germinación de las esporas de *C. sporogenes* reduciendo los daños ocasionados por este microorganismo. Además, adicionando nisina podrían reducirse los tiempos en los tratamientos industriales evitando un sobreprocesado de los alimentos y una pérdida de sus características sensoriales.

BIBLIOGRAFÍA

- Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P. S., Esnoz, A., Palop, A. 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *J Appl Microbiol*, 107: 506-513.
- Huertas, J.P., Esteban, M-D., Antolinos, V., Palop, A. 2014. Combined effect of natural antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Food Control*, 35:73-78.
- Naim, F., Zareifard, M.R., Zhu, S., Huizing, R.H., Grabowski, S., Marcotte, M. 2008. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: From kinetics to process validation. *Food Microbiol*, 25: 936-941.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int J Food Microbiol*, 72: 107-113.

Evaluación de un sistema de envasado activo antimicrobiano para el control microbiológico de queso curado elaborado con leche cruda de oveja

Ana González-Vicente, Andrés Otero, María-Luisa García-López y José M. Rodríguez-Calleja

D. Higiene y Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, jm.rcalleja@unileon.es

En este trabajo, se estudió un sistema de envasado activo antimicrobiano para mejorar la calidad microbiológica de queso curado elaborado con leche cruda de oveja, prestando especial atención al control de *Listeria monocytogenes*. Una parte de las láminas de queso utilizadas se inocularon con un caldo de cultivo de *L. monocytogenes* y todas las muestras se envasaron, o bien en un sistema antimicrobiano formado por biopelículas de gelatina con aceite esencial de tomillo (5 g/l) y nisina (32 mg/l), o en un sistema control con atmósfera modificada comercial. El sistema de envasado antimicrobiano estudiado disminuyó la población inicial de microorganismos viables aerobios psicrotrofos desde $4,79 \pm 0,18 \log_{10}$ ufc/g a $2,68 \pm 0,03 \log_{10}$ ufc/g en las primeras dos semanas de almacenamiento, siendo los recuentos significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los obtenidos en las muestras control y sin cambios sensoriales apreciables. El sistema activo fue eficaz para controlar *L. monocytogenes* hasta ocho semanas después del envasado, mostrando diferencias significativas respecto a los recuentos en las muestras control. Este sistema antimicrobiano permite incrementar el grado de inocuidad de láminas de queso curado de oveja, mediante el control de *L. monocytogenes*, además de mejorar su calidad microbiológica general en las primeras semanas de almacenamiento.

INTRODUCCIÓN

La producción de queso de oveja en España es la segunda más importante en la UE y, a nivel nacional, son mayoritariamente elaborados en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. La microbiota general (especialmente mohos y clostridios) puede limitar su vida útil pero, desde el punto de vista sanitario, la presencia de algunos peligros biológicos, como *Listeria monocytogenes*, suponen un riesgo en alimentos listos para el consumo.

En este trabajo, se estudió un sistema de envasado activo antimicrobiano para mejorar la calidad microbiológica de queso curado elaborado con leche cruda de oveja, prestando especial atención al control de *L. monocytogenes*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del inóculo bacteriano. Se empleó la cepa L99 de *L. monocytogenes*, de origen alimentario, a partir de su cultivo (37 °C/24 h/en agitación) en tubos de caldo TSB con 0,6% de extracto de levadura (Oxoid, Barcelona).

Diseño experimental. Se utilizaron láminas de queso de oveja curado (10g) fabricado en una industria quesera con leche cruda de oveja. Una parte de las muestras de queso fueron inoculadas con un caldo de cultivo conteniendo la cepa L99, para alcanzar dos niveles diferentes de esta bacteria (ca. 10^2 y ca. 10^4 ufc/g), y la otra parte no se inocularon. Todas las muestras fueron envasadas: o bien, (a) bajo un sistema de envasado antimicrobiano (EA) compuesto por biopelículas comestibles de gelatina alimentaria (Sancho de Borja S.L., Borja, Zaragoza) con la incorporación de aceite esencial de tomillo (5 g/l; National Food Ingredients LTD, Limerick, Irlanda) y nisina (32

mg/l; Sigma Aldrich Química S.A., Madrid, España), mediante un procedimiento basado en el descrito por Wang y col. (2007), una atmósfera de 40% CO₂ y 60% N₂ y barquetas de polipropileno con bolsas de cobertura multicapa; o bien, (b) en el mismo sistema pero con biopelículas comestibles de gelatina sin estos compuestos antimicrobianos (EAM). De este modo, se prepararon muestras sin inocular envasadas en un sistema activo (EA) y en un sistema convencional (EAM), y muestras inoculadas con la cepa L99 envasadas en un sistema activo (EA-L99) y en un sistema convencional (EAM-L99).

Almacenamiento y análisis. Todas las muestras de queso se conservaron en la oscuridad a 5 °C ± 1 °C, siendo analizadas semanalmente. Cada día de análisis y para cada condición de envasado se determinaron por cuadruplicado los recuentos de microorganismos viables aerobios psicrotrofos (RVAP), en placas de agar PCA (Oxoid; 7 °C /10 días), y de *L. monocytogenes*, en agar cromogénico selectivo y diferencial para *Listeria* (Oxoid; 37 °C/48 h). Adicionalmente, se midieron el pH y la concentración de gases en cada bandeja.

Muestras de queso sin inocular se evaluaron en cuanto a su aceptabilidad general y aroma (panel de 10 miembros) utilizando una escala hedónica para detectar diferencias entre los dos sistemas de envasado utilizados.

Análisis estadístico. Los resultados sensoriales, fisicoquímicos y microbiológicos se procesaron estadísticamente mediante el programa informático "Statistica for Windows" v 7.1 (Statsoft, Chicago IL, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pequeñas variaciones en la atmósfera gaseosa registrada en el interior de las bandejas no dependían del tipo de envasado. Se determinaron valores de O₂ comprendidos entre 0,87 % y 2,87 %, y de CO₂ entre 35,94 % y 41,00 %. Los valores iniciales de pH en las láminas de queso ($5,62 \pm 0,02$) no mostraron una tendencia clara a lo largo del almacenamiento excepto en las muestras EAM donde se apreció un incremento hasta $5,97 \pm 0,36$.

En las muestras de queso inoculadas con niveles de *L. monocytogenes* de ca. 10^4 ufc/g, el sistema de envasado activo basado en aceite esencial de tomillo y nisina disminuyó la población inicial de microorganismos viables aerobios psicrotrofos desde $4,79 \pm 0,18$ log ufc/g a $2,68 \pm 0,03$ log ufc/g en las primeras dos semanas de almacenamiento, siendo los recuentos significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los obtenidos en las muestras EAM (Figura 1a). Más allá de este punto de almacenamiento estas diferencias fueron menos significativas. Además, la concentración inicial de la cepa estudiada de *L. monocytogenes* ($3,70 \pm 0,11$ log ufc/g) disminuyó en mayor medida en las muestras EA-L99 que en las EAM- L99 (Figura 1b). Este efecto anti-listeria se extendió hasta las ocho semanas del almacenamiento a refrigeración, momento en el que el recuento de la cepa L99 fue de $2,36 \pm 0,35$ log₁₀ ufc/g, significativamente ($p < 0,05$) inferior al observado en las muestras EAM- L99 ($2,90 \pm 0,20$ log₁₀ ufc/g).

Cuando las muestras de queso se inocularon con niveles próximos a 10^2 ufc/g de la cepa L99, el potencial antimicrobiano del sistema activo estudiado fue menor y con diferencias poco significativas ($p > 0,05$).

En términos globales, el panel de expertos no encontró diferencias (aroma y aceptabilidad general) entre las muestras EA y las EAM.

Algunos estudios ponen de manifiesto que la eficacia de películas antimicrobianas *in vitro* es muy superior a la observada en alimentos, condicionado no solo al microorganismo estudiado sino también a otro gran número de factores (Han, 2005). En este trabajo, se ha comprobado que, aunque se observó actividad antilisteria, el efecto del sistema activo antimicrobiano diseñado fue menor al encontrado utilizando medios de cultivo (datos no mostrados) probablemente por la interacción de los compuestos activos con, principalmente, la fracción grasa presente en el queso curado.

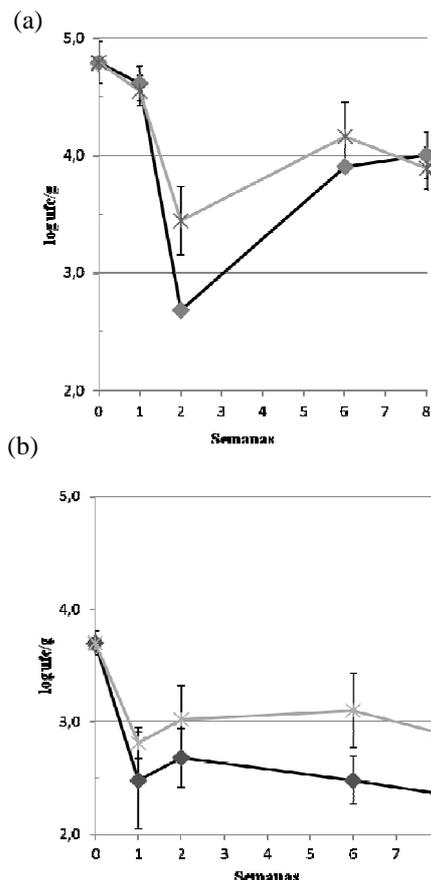


Figura 1: Evolución de los recuentos (a) de microorganismos viables aerobios psicrotrofos y (b) de *L. monocytogenes*, en muestras de queso, inoculadas con ca. 10^4 ufc/g de la cepa L99 de *L. monocytogenes*, envasadas en un sistema antimicrobiano formado por aceite esencial de tomillo (5 g/l) y nisina (32 mg/l) (◆) y en atmósfera modificada comercial (X), durante su almacenamiento a refrigeración.

CONCLUSIONES

El sistema de envasado antimicrobiano, formado por biopelículas de gelatina con aceite esencial de tomillo (5 g/l) y nisina (32 mg/l), controla (inhibe) *L. monocytogenes* en láminas de queso curado de oveja, mejorando además su calidad microbiológica general en las primeras semanas de almacenamiento. Este sistema de envasado asegura un mayor grado de inocuidad en queso curado de oveja aunque la inclusión de otro factor antimicrobiano adicional podría potenciar su eficacia, extendiéndola durante toda la vida útil del queso.

BIBLIOGRAFÍA

- Han, J. H. 2005. Introduction to active food packaging technologies. In: Han, J. H. (Ed.), Innovations in food packaging. Academic Press, Londres, pp. 80-107
- Wang LZ, Liu L, Holmes J, Kerry JF, Kerry JP. 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. Int. J. Food Sci. Tech. 42:1128-1138.

Resistencia al calor de *Clostridium sporogenes* en condiciones no isotérmicas en tampón y caldo de ternera

M.-Dolores Esteban, María Ros-Chumillas y Alfredo Palop

Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad Politécnica de Cartagena, España, mdolores.esteban@upct.es

Clostridium sporogenes es una bacteria anaerobia presente en los alimentos, y capaz de sobrevivir, en determinadas condiciones, a las tecnologías térmicas de procesado actuales y posteriormente, de germinar y crecer en envases cerrados herméticamente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia térmica de *Cl. sporogenes* en tampón fosfato y en caldo de ternera tanto en condiciones isotérmicas como no isotérmicas de calentamiento. Las curvas de supervivencia obtenidas en condiciones isotérmicas mostraron fenómenos de hombro, por lo que se empleó el modelo no lineal de Weibull para caracterizar su termorresistencia. La termorresistencia fue similar en ambos medios de calentamiento ($\delta_{105^{\circ}\text{C}} = 0,91$ min en tampón; $\delta_{105^{\circ}\text{C}} = 0,67$ min en caldo de ternera). Cuando se sometió a condiciones no isotérmicas de calentamiento, los recuentos obtenidos, tanto a velocidades de calentamiento bajas como altas, fueron predichos adecuadamente con este modelo no lineal elaborado a partir de los datos isotérmicos.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, han aparecido microorganismos termorresistentes capaces de sobrevivir al procesado de los alimentos y posteriormente crecer durante el almacenamiento, pudiendo ocasionar no sólo toxiinfecciones alimentarias sino también la alteración de lotes de productos, con la elevada pérdida económica que ello conlleva. Por esto, la industria alimentaria está tendiendo a sobreprocesar sus productos, lo que conlleva una pérdida en la calidad sensorial de los mismos.

El efecto de las velocidades de calentamiento de los tratamientos térmicos no ha sido todavía estudiado en profundidad, aunque han sido varios los autores que han utilizado métodos no isotérmicos para estudiar las cinéticas de inactivación microbianas (Conesa y col. 2003; Fernández y col. 1999).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia térmica de *Cl. sporogenes* en tampón fosfato y en caldo de ternera tanto en condiciones isotérmicas como no isotérmicas de calentamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo. La cepa utilizada para este estudio fue *Clostridium sporogenes* S3213 13A (suspensión amablemente facilitada por el Centre Technique para la Conservation des Produits Agricoles, Avignon, Francia). La suspensión de esporos se dejó madurar al menos dos semanas antes de llevar a cabo las determinaciones de su termorresistencia y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Determinaciones de termorresistencia. Las determinaciones de termorresistencia se llevaron a cabo en un termorresistómetro Mastia (Conesa y col. 2009), que permite realizar determinaciones de termorresistencia a

determinadas velocidades de calentamiento. Los tratamientos isotérmicos se llevaron a cabo a 95, 100, 105, 107,5, 110 y 112,5°C. Para la realización de los tratamientos no isotérmicos, el termorresistómetro se programó con un perfil de temperatura lineal, a una temperatura inicial de 95°C y hasta una temperatura final de 110°C y 115°C para velocidades de calentamiento de 1 y 20°C/min respectivamente.

Una vez estabilizada la temperatura de tratamiento en el medio de calentamiento (400mL de tampón fosfato salino (PBS) pH= 7,5 y caldo de ternera pH= 5,8), éste se inoculaba con 0,2 mL de la suspensión de esporos. La extracción de muestras se realizaba a intervalos predeterminados de tiempo. Para el recuento de viables, a las muestras se le realizaban las diluciones seriadas apropiadas en agua de peptona, se sembraban en doble capa en agar carne-hígado glucosa y se incubaban en anaerobiosis a 37°C durante 48h. Todas las determinaciones de termorresistencia se realizaron al menos por triplicado.

Análisis de datos. Las curvas de supervivencia mostraron fenómeno de hombro. Por esta razón, se eligió un modelo no lineal, como es el modelo de Weibull, para describir dichas curvas. Para aplicar el modelo, se utilizó la tasa de inactivación logarítmica tiempo dependiente desarrollada por van Zuijlen y col. (2010) a partir de la distribución de Weibull propuesta por Mafart y col. (2002) (ec.1).

$$\frac{dN}{dt} = -p \times \left(\frac{1}{\delta}\right)^p \times t^{p-1} \quad (1)$$

donde δ representa el tiempo necesario para la primera reducción decimal (min) y p es el parámetro de forma.

Las predicciones de supervivientes para los experimentos no isotérmicos se basaron en la dependencia de δ con la temperatura (Mafart y col.2002).

Análisis estadístico. Las regresiones no lineales del modelo de Weibull fueron estimadas con la herramienta Solver de Excel (Microsoft® Excel 2000 para Windows®).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de supervivencia de *C. sporogenes* cuando fue sometido a tratamientos isotérmicos de calentamiento mostraron fenómeno de hombro (Figura 1).

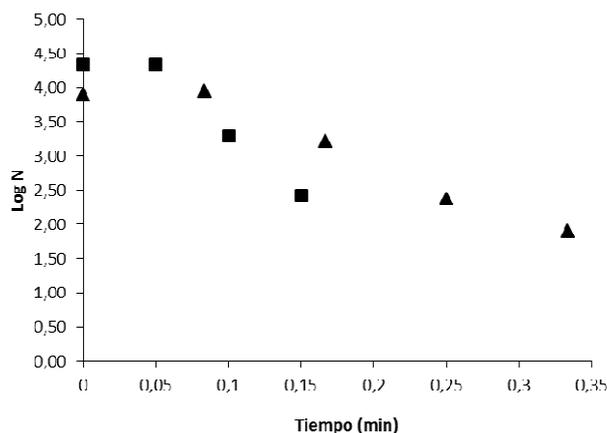


Figura 1: Gráficas de supervivencia de *Clostridium sporogenes* S3213 13A sometido a un tratamiento térmico de 110°C en distintos medios de calentamiento. (■) PBS; (▲) Caldo de ternera.

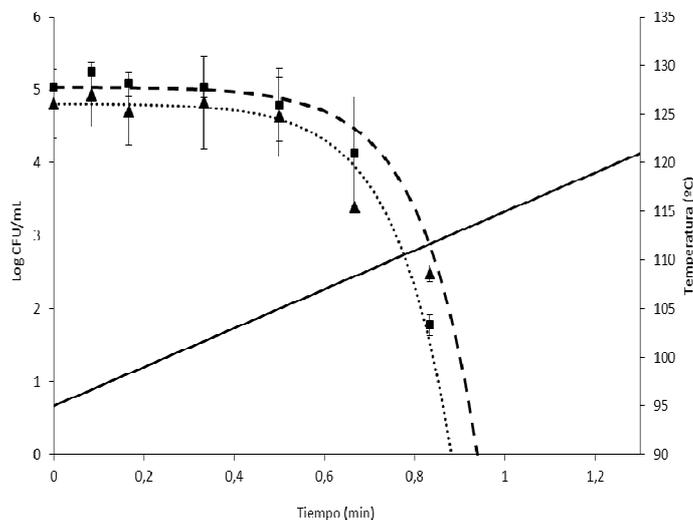
No se observaron diferencias entre las determinaciones de termorresistencia llevadas a cabo en PBS y en caldo de ternera (Fig.1). La influencia del medio de calentamiento en la termorresistencia de los microorganismos ha sido ampliamente investigada. Mafart y Leguerinel (1998) encontraron una clara relación entre la temperatura y el pH en la resistencia al calor de las esporas de todos los microorganismos estudiados, excepto para *Clostridium botulinum*.

Cuando *C. sporogenes* se sometió a condiciones no isotérmicas de calentamiento, los recuentos obtenidos, tanto a velocidades bajas como altas, fueron predichos adecuadamente por el modelo no lineal de Weibull, elaborado a partir de los datos isotérmicos (Fig.2).

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Esteban y col. (2013) para *Bacillus sporothermodurans*. Sin embargo, Valdramidis y col. (2006) obtuvieron parámetros equivalentes utilizando modelos isotérmicos y no isotérmicos debido, posiblemente, a la adaptación de los microorganismos a las bajas velocidades de calentamiento.

Estos resultados permitirían una mejor predicción de los supervivientes a los tratamientos térmicos que se aplican habitualmente a los alimentos en conserva y, por lo tanto, un mejor ajuste de los mismos.

Figura 2: Curvas de supervivencia de *Clostridium sporogenes* S3213 13A sometido a un tratamiento no- isotérmico de 20°C/min en distintos medios de calentamiento. (—) Perfil de temperatura; (■, ···· Predicciones para el modelo de Weibull) PBS; (▲, - - - Predicciones para el modelo de Weibull) Caldo de ternera.



BIBLIOGRAFÍA

- Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P. S., Esnoz, A., Palop, A. 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 506-513.
- Conesa, R., Periago, P. M., Esnoz, A., López, A., Palop, A. 2003. Prediction of *Bacillus subtilis* spore survival after a combined non-isothermal-isothermal heat treatment. *European Food Res. Technol.*, 217: 319-324.
- Esteban, M. D., Huertas, J. P., Fernández, P. S., Palop, A. 2013. Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. *Food Microbiol.*, 34: 158-163.
- Fernández, A., Ocio, M. J., Fernández, P. S., Rodrigo, M., Martínez, A. 1999. Application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiol.*, 16: 607-613.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.*, 72: 107-113.
- Van Zuijlen, A., Periago, P.M., Amézquita, A., Palop, A., Brul, S., Fernández, P.S. 2010. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilisation. *Food Res. Int.*, 43: 1895-1901.

Prevención de hinchazón tardía en queso Castellano mediante la reuterina producida *in situ* por *Lactobacillus reuteri* INIA P572

Natalia Gómez-Torres¹, Marta Ávila¹, David Delgado², Pilar Gaya¹, Luis Rodríguez² y Sonia Garde¹

¹Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. de La Coruña km 7, Madrid 28040, España, natalia.gomez@inia.es

²Estación Tecnológica de la Leche, ITACyL, Ctra. de Autilla SN, Palencia 34071, España

En este trabajo, hemos evaluado la adición de *L. reuteri* INIA P572, productor de reuterina, junto con glicerol en la elaboración de queso Castellano, con el fin de controlar el crecimiento de *C. tyrobutyricum* INIA 68 y prevenir así la hinchazón tardía que este causa. *L. reuteri* INIA P572 sobrevivió a la fabricación de queso y produjo reuterina *in situ*, aunque sólo se detectó a las 6 h y 24 h. Sin embargo, la reuterina producida fue suficiente para inhibir el desarrollo de *C. tyrobutyricum* INIA 68 y prevenir la hinchazón durante la maduración (90 d). Los quesos con reuterina mostraron un valor de pH ligeramente superior y un recuento de lactococos ligeramente inferior que el queso control (elaborado solo con el fermento) a las 24 h. Los quesos hinchados presentaron menores niveles de ácido láctico y mayores de los ácidos propiónico y butírico que el queso control. Sin embargo, en el queso con reuterina y con esporas de *Clostridium* no se detectó la producción de ácidos propiónico ni butírico. El queso con *L. reuteri* INIA P572 y glicerol (con reuterina, pero sin esporas de *Clostridium*) presentó un mayor índice de proteólisis global, mayores niveles de aminoácidos libres y actividad aminopeptidásica que el queso control y que el queso elaborado con *L. reuteri* INIA P572 pero sin glicerol, a partir de los 30 d. El queso con reuterina mostró menores valores de *L** (luminosidad) y *b** (tendencia al amarillo) y de fracturabilidad, firmeza y elasticidad que los dos quesos anteriormente mencionados. Sin embargo, el queso con reuterina obtuvo mayores puntuaciones para la calidad del color, textura, aroma y sabor que el queso control a partir de los 60 d, tras ser evaluado por un panel de catadores. Los resultados obtenidos demuestran que la producción de reuterina *in situ* es una estrategia novedosa y eficaz para prevenir la hinchazón tardía del queso, manteniendo o mejorando la calidad del producto.

INTRODUCCIÓN

El queso Castellano, elaborado en Castilla y León, fundamentalmente con leche de oveja, es un queso de pasta prensada, de tierno a curado. Una de las principales alteraciones microbiológicas que puede sufrir es la hinchazón tardía o butírica, que se produce como consecuencia del desarrollo en el interior del queso de algunas especies del género *Clostridium*, principalmente *Clostridium tyrobutyricum*, capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácido butírico, ácido acético, CO₂ e H₂. Esto origina defectos de textura, aroma y sabor que imposibilitan la comercialización del queso. Tradicionalmente, se ha controlado el desarrollo de *Clostridium* en queso con la adición de nitrato o lisozima, o mediante la bactofugación y microfiltración de la leche, pero el empleo de nuevos cultivos de bacterias lácticas productoras de compuestos antimicrobianos efectivos frente a *Clostridium* es una estrategia muy prometedora, especialmente para la industria quesera. Entre las bacterias lácticas productoras de compuestos antimicrobianos se encuentran algunas cepas de *Lactobacillus reuteri* capaces de producir reuterina (3-hidroxipropionaldehído) a partir del metabolismo anaeróbico del glicerol. La reuterina es un potente compuesto antimicrobiano con un gran espectro inhibitorio, soluble en agua, estable en un amplio

rango de pH y resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas. En este estudio, hemos evaluado la adición de *L. reuteri* INIA P572, productor de reuterina, como adjunto en la elaboración de queso Castellano de oveja junto con glicerol (30 mM), con el fin de controlar el crecimiento de *C. tyrobutyricum* INIA 68 en el queso y prevenir así la aparición de hinchazón tardía en el mismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La fabricación de queso Castellano, de aproximadamente 3 kg, se realizó a partir de leche pasteurizada de oveja. Se elaboraron 6 cubas y cada una se inoculó con las bacterias correspondientes (Tabla 1). Los quesos se maduraron durante 90 días a 12 °C y 85% HR.

Tabla 1: Adición de bacterias y glicerol en las cubas para la elaboración de queso Castellano.

	INÓCULOS Y GLICEROL
Cuba 1	Fermento
Cuba 2	Fermento + <i>L. reuteri</i>
Cuba 3	Fermento + <i>L. reuteri</i> + Glicerol 30 mM
Cuba 4	Fermento + <i>L. reuteri</i> + <i>C. tyrobutyricum</i>
Cuba 5	Fermento + <i>L. reuteri</i> + <i>C. tyrobutyricum</i> + Glicerol 30 mM
Cuba 6	Fermento + <i>C. tyrobutyricum</i>

Fermento comercial mesófilo Rhodia MA 011 (*Lactococcus lactis*); *L. reuteri* INIA P572; *C. tyrobutyricum* INIA 68.

Durante la maduración, se examinaron los quesos regularmente para detectar síntomas de hinchazón tardía y se realizaron análisis microbiológicos y físico-químicos (pH, actividad aminopeptidásica, proteólisis global, ácidos

orgánicos, aminoácidos libres, textura, color), se determinó la producción de reuterina y se realizó una evaluación sensorial (Garde y col., 2006; Gómez-Torres y col., 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

L. reuteri INIA P572 sobrevivió a la fabricación de queso, con niveles medios de $7,38 \log_{10}$ ufc/g queso a 1 d. En los dos quesos elaborados con *L. reuteri* y sin glicerol (Tabla 1, cubas 2 y 4), se observó un descenso medio de $1,44 \log_{10}$ ufc/g en los niveles de lactobacilos entre 1 y 30 d. Sin embargo, en los quesos elaborados con *L. reuteri* INIA P572 y glicerol (Tabla 1, cubas 3 y 5) se observó un descenso medio de los niveles de lactobacilos a los 30 d de $3,16 \log_{10}$ ufc/g queso, respecto al día 1. En estos últimos quesos, se detectó la presencia de reuterina libre a las 6 y 24 h de maduración, lo que podría explicar los menores recuentos de lactobacilos. A lo largo de la maduración, se produjo un aumento de los recuentos de lactobacilos en todos los quesos, incluso en los no inoculados con *L. reuteri*, posiblemente procedentes del ambiente de quesería. Los quesos con reuterina mostraron un recuento de lactococos ligeramente inferior que el queso control (Tabla 1, cuba 1) a las 24 h. En todos los quesos, se observó un descenso gradual de los niveles de lactococos a lo largo de la maduración. *C. tyrobutyricum* INIA 68 fue capaz de germinar y producir hinchazón tardía en el queso. Sin embargo, la adición de la cepa productora de reuterina, *L. reuteri* INIA P572, y glicerol a la leche de fabricación (Tabla 1, cuba 5) previno la aparición de la hinchazón tardía durante los 90 d que duró el estudio. El queso elaborado con *L. reuteri* INIA P572, pero sin glicerol (sin reuterina) sí presentó hinchazón.

Los quesos con reuterina mostraron unos valores medios de pH (5,25 y 5,32) superiores al queso control (4,98) a lo largo de la maduración. En general, los quesos con hinchazón (Tabla 1, cubas 4 y 6) mostraron mayores valores de pH que el queso control a partir de los 60 d, coincidiendo con la disminución de la concentración de ácido láctico y el aumento de los ácidos propiónico y butírico como consecuencia de la fermentación butírica llevada a cabo por *C. tyrobutyricum* INIA 68. Sin embargo, en el queso con reuterina y con esporas de *Clostridium* no se detectó la producción de ácidos propiónico ni butírico.

Para evaluar el efecto de la reuterina sobre la proteólisis, la textura, el color y las características organolépticas del queso, se elaboraron tres quesos sin esporas de *Clostridium* (Tabla 1, cubas 1-3). El queso elaborado con *L. reuteri* INIA P572 y glicerol (reuterina) presentó un mayor índice de proteólisis global y una mayor concentración de aminoácidos libres que el queso control a partir de los 30 d, siendo la concentración de aminoácidos libres totales 1,8,

1,4, y 1,7 veces mayor en el queso con reuterina que en el queso control a los 30, 60 y 90 d, respectivamente. La actividad aminopeptidásica fue mayor en el queso con reuterina que en el queso control a los 30 y 90 d. Sin embargo, el queso elaborado con *L. reuteri* INIA P572 y sin glicerol mostró unos valores de proteólisis global, aminoácidos libres y actividad aminopeptidásica similares e incluso inferiores a los del queso control. Por tanto, la mayor proteólisis observada en el queso con reuterina podría atribuirse a un efecto lítico de esta sobre las células del fermento y del propio *L. reuteri* INIA P572, que daría lugar a la liberación de su contenido enzimático intracelular (peptidasas) a la matriz del queso, favoreciendo la formación de péptidos pequeños y aminoácidos. Por otra parte, el mayor pH observado en el queso con reuterina durante toda la maduración también pudo contribuir a la mayor proteólisis observada en este queso, ya que la mayoría de las enzimas proteolíticas tienen un pH óptimo de actividad cercano a la neutralidad.

En consonancia con la mayor proteólisis observada en el queso con reuterina, este queso mostró menores valores de fracturabilidad, firmeza y elasticidad que el queso control y que el queso elaborado con *L. reuteri* INIA P572 y sin glicerol. El queso con reuterina mostró menores valores para los parámetros de color L^* (luminosidad) y b^* (tendencia al amarillo) que el queso control durante toda la maduración. A pesar de las diferencias encontradas en la textura y color de los quesos, el queso con reuterina obtuvo unas mayores puntuaciones en la calidad de estas características, y en la calidad del aroma y del sabor que el queso control a partir de los 60 d, tras ser evaluado por un panel de catadores.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que la producción de reuterina *in situ* es una estrategia novedosa y eficaz para prevenir la hinchazón tardía del queso, manteniendo o mejorando la calidad del producto.

BIBLIOGRAFÍA

- Garde, S., Ávila, M., Gaya, P., Medina, M. Nuñez, M. 2006, Proteolysis of Hispánico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. J. Dairy Sci., 89:840-849.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P. Garde, S. 2014, Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. Food Microbiol., 42: 82-88.

Influencia de la variación de pH y temperatura, en la actividad antifúngica de un envase activo con canela en fase vapor

Sofía Manso y Cristina Nerín

Dpto. de Química Analítica (I3A), Universidad de Zaragoza, España. Email: smanso@unizar.es

Se ha estudiado la influencia de las variables pH y temperatura en la actividad de los aceites esenciales en contacto directo y en fase vapor. A pesar de que ambas variables afectan al crecimiento de la colonia del moho (resultados no mostrados), las MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) y MFC (Concentración Mínima Fungicida) de canela y orégano obtenidas en medio líquido, se mantuvieron constantes frente a tres pH y dos temperaturas de incubación para cinco cepas. Además, se evaluó la actividad antifúngica de un envase activo de polipropileno (PP) con aceite esencial de canela en fase vapor, obteniendo en todos los casos la misma concentración sub-inhibitoria con PP 2% canela, e inhibición total del moho a partir de ésta. Este último experimento se llevó a cabo frente a cuatro de las cinco cepas evaluadas en el caso anterior, cada una a dos pH y dos temperaturas de incubación. Los compuestos volátiles liberados desde el material mostraron en todos los casos una gran actividad. Por tanto, las variables estudiadas no disminuyeron la actividad de los aceites esenciales, viéndose ésta en algunos casos reforzada, como en el envase activo a pH 3 y temperatura 6°C.

INTRODUCCIÓN

A la hora de desarrollar un envase activo es importante conocer la influencia que ejercen diversas variables en su actividad antimicrobiana. Por ello, en este trabajo se ha estudiado cómo afectan diferentes condiciones de almacenamiento (pH y temperatura) en la actividad antifúngica alcanzada. El diseño experimental se ha llevado a cabo en primer lugar en contacto directo en medio líquido y a continuación con el envase activo en fase vapor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales. Todas las cepas de moho provenían de la CECT (Valencia, España). Los aceites esenciales de canela y orégano de Argolide (España), y los PP activos con canela (2-8%) y PP control (0%) de Artibal (España). Los medios de cultivo (Scharlau) fueron PDA para *Penicillium* y MEA para *Aspergillus*.

MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) y MFC (Concentración Mínima Fungicida). Se midieron ambas concentraciones por macrodilución en medio líquido (Manso y col., 2013), estudiando para cada cepa dos pH y tres temperaturas de incubación.

Evaluación antifúngica del envase activo. Los films de PP activos (2-6%) se evaluaron en fase vapor (López y col., 2007a) durante 30 días. El crecimiento del moho se midió respecto a una escala cualitativa de 5 puntos (Manso y col., 2013), convertido posteriormente en porcentaje de crecimiento considerando las tres réplicas de cada opción, y el 100% de crecimiento del control. En una primera parte, se evaluaron cuatro cepas, a dos diferentes temperaturas y pH 5,6, y a continuación dos de las cepas anteriores a pH 3 y dos temperaturas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MIC y MFC

Las determinaciones de MIC y MFC obtenidas para canela y orégano se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente. Como se puede observar, se obtuvieron valores muy parecidos en todos los casos, lo que indica que ambas variables no afectaron de manera relevante a la actividad antifúngica de los aceites esenciales. La actividad del aceite esencial de canela fue en todos los casos mayor que la del aceite esencial de orégano.

Tabla 1: MIC y MFC de canela (en mg/mL), frente a cinco cepas (10^5 UFC/mL) bajo diferente pH y temperatura.

Cepa	°C	CANELA					
		pH 3		pH 5		pH 7	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A.flavus</i> ¹	25	0,1	0,1	0,1	0,1-0,2	0,1	0,1-0,2
	37	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>A.flavus</i> ²	25	0,05-0,1	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1	0,2-0,4
	37	0,05-0,1	0,05-0,1	0,1	0,1	0,1-0,2	0,1-0,2
<i>A.niger</i>	25	0,05-0,1	0,1	0,1	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2
	37	0,05-0,1	0,05-0,1	0,1	0,1	0,1-0,2	0,1-0,2
<i>P.roq.</i>	25	0,05-0,1	0,2	0,1	0,2-0,4	0,1	0,2-0,4
	6	0,05-0,1	0,2-0,4	0,05-0,1	0,2-0,4	0,05-0,1	0,2-0,4
<i>P.exp.</i>	25	0,05	0,1	0,1	0,1-0,2	0,05-0,1	0,2
	6	0,05	0,1	0,05-0,1	0,1-0,2	0,1	0,2

Nota: Las dos cepas de *A. flavus* son la CECT 2949⁽¹⁾ y CECT 2687⁽²⁾. Las dos cepas abreviadas de *Penicillium* corresponden a *P. roqueforti* y *P. expansum*.

Tabla 2: MIC y MFC de orégano (en mg/mL), frente a cinco cepas (10^5 CFU/mL) bajo diferente pH y temperatura.

Cepa	°C	ORÉGANO					
		pH 3		pH 5		pH 7	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A.flavus</i> ¹	25	0,2	0,2-0,4	0,2-0,4	0,4	0,2	0,4
	37	0,2	0,2-0,4	0,2	0,2	0,2	0,2-0,4
<i>A.flavus</i> ²	25	0,1-0,2	0,2-0,4	0,2	0,4	0,2-0,4	0,4
	37	0,1-0,2	0,2	0,2	0,2-0,4	0,2	0,4
<i>A.niger</i>	25	0,1	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4
	37	0,1-0,2	0,2-0,4	0,2	0,2-0,4	0,2	0,4
<i>P.roq.</i>	25	0,1	0,4	0,1-0,2	0,4	0,1	0,4-0,8
	6	0,1	0,4-0,8	0,1	0,4-0,8	0,1	0,4
<i>P.exp.</i>	25	0,1-0,2	0,4	0,2	0,4	0,2-0,4	0,4
	6	0,1-0,2	0,4	0,1-0,2	0,4	0,2	0,4

Nota: Las dos cepas de *A. flavus* son la CECT 2949⁽¹⁾ y CECT 2687⁽²⁾. Las dos cepas abreviadas de *Penicillium* corresponden a *P. roqueforti* y *P. expansum*.

Evaluación antifúngica del envase activo

El envase activo con canela en fase vapor mostró actividad frente a todas las cepas evaluadas y bajo todas las condiciones de estudio (figuras 1 y 2).

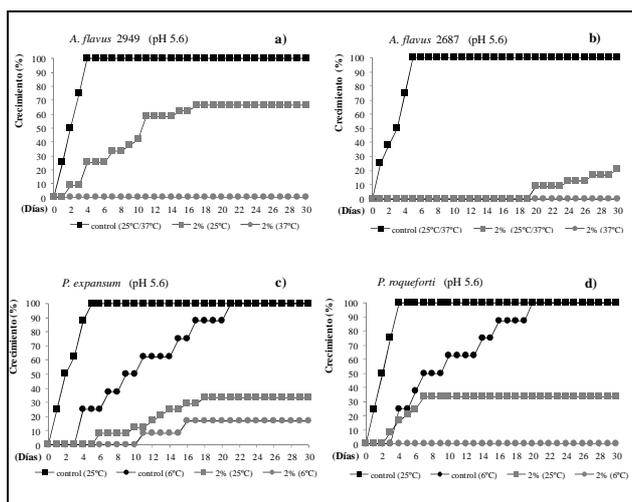


Figura 1: PP activo con canela en fase vapor, a pH 5,6 y diferente temperatura para cada cepa.

La concentración sub-inhibitoria fue en todos los casos PP 2% canela, mostrando una clara reducción del crecimiento respecto al control. Las concentraciones superiores (PP 4% y 6%) consiguieron la inhibición total en todos los casos, razón por la cual no se encuentran representadas en las figuras. Además, dichas concentraciones demostraron su actividad fungicida, al no obtener ningún crecimiento tras retirar los films activos.

En un experimento previo realizado, se midió la velocidad de crecimiento de la colonia control de las mismas cinco cepas, incubándolas bajo los mismos tres pH y dos temperaturas por cada una de ellas (datos no mostrados). Los resultados mostraron que

ambas variables influían en la velocidad de crecimiento de la colonia, siendo ésta menor en condiciones extremas como pH 3 y 6°C de temperatura.

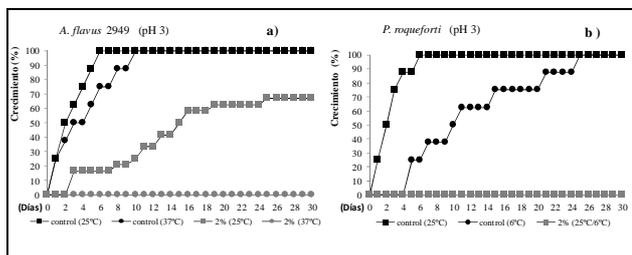


Figura 2: PP activo con canela en fase vapor, a pH 3 y diferente temperatura para cada cepa.

De esta manera, las condiciones de incubación reforzaron ligeramente la actividad del envase activo. La inhibición total de las dos cepas de *A. flavus* a 37°C (fig.1a y fig.1b) se debió a una reducción en la tasa de esporulación observada a esa temperatura respecto a 25°C. En los controles, esta diferencia fue menor, de manera que no fue detectable por la escala cualitativa. La temperatura de 6°C sin embargo sí que provocó un enlentecimiento marcado en ambas cepas de *Penicillium*, tanto en los activos como controles (fig.1c y fig.1d). Por otra parte, el envase activo a pH 3 (figura 2) causó una mayor actividad antifúngica respecto al pH 5,6, siendo esta influencia más acusada en las temperaturas de 37 °C y 6°C que en la óptima de 25°C (fig.2a y fig.2b respectivamente). En este caso, el enlentecimiento del control respecto a pH 5,6 sí que fue lo suficientemente marcado como para mostrarse en la escala.

CONCLUSIONES

En conclusión, la concentración sub-inhibitoria mostró un decrecimiento del moho que se vio reforzado en aquellos casos donde las condiciones de cultivo no fueron óptimas. Además de la actividad antifúngica, este mismo envase en fase vapor ha demostrado poseer una buena capacidad antimicotoxigénica (Manso y col., 2014).

BIBLIOGRAFÍA

López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C. 2007. Development of Flexible Antimicrobial Films using Essential Oils as Active Agents. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 8814-8824.
 Manso, S., Cacho-Nerín, F., Becerril, R., Nerín, C. 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30(2): 370-378.
 Manso, S., Pezo, D., Gómez-Lus, R., Nerín, C. 2014. Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control*, 45(0): 101-108.

Eliminación de *Listeria monocytogenes* en quesos blandos madurados por mohos mediante radiación beta

Raquel Velasco, Juan A. Ordóñez, M. Isabel Cambero y M. Concepción Cabeza

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid, España. rvelasco@vet.ucm.es

Como alternativa a otras tecnologías, se ha utilizado la de electrones acelerados para la eliminación de *Listeria monocytogenes* de los quesos Camembert y Brie. Asimismo, se ha estudiado el efecto de dicho tratamiento en la microbiota láctica de estos quesos y en sus propiedades físico-químicas. Las dosis de ionización requeridas para alcanzar el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) respecto a *L. monocytogenes* fueron de 1,27 y 2,59 kGy de acuerdo a los criterios microbiológicos establecidos por la UE y la USDA, respectivamente. El tratamiento produjo también una disminución del número de bacterias lácticas, aunque las células dañadas se recuperaron durante el almacenamiento a 14°C. A las dosis mencionadas, no se observaron cambios sustanciales en el pH y la actividad de agua.

INTRODUCCIÓN

Los quesos de pasta blanda se han asociado repetidas veces a brotes de listeriosis, en especial las variedades maduradas con mohos superficiales. Los microorganismos patógenos pueden contaminar estos productos a partir de varias fuentes lo que puede traducirse en un peligro sanitario (enfermedades alimentarias) y/o comercial (decomisos de mercancías) si se detectan a niveles superiores a los establecidos en las reglamentaciones. Preocupa *L. monocytogenes* ya que se trata de una bacteria ubicua en la industria alimentaria que se acantona en lugares recónditos de los equipos formando biofilms, donde puede persistir durante tiempos muy largos y llegar ocasionalmente a la matriz alimentaria. Cuando esto ocurre, puede multiplicarse hasta niveles no deseables durante el almacenamiento del producto debido, por una parte, al relativamente elevado pH de estos quesos y, por otra, al carácter psicrotrofo de esta bacteria. Las tecnologías de conservación convencionales no pueden aplicarse al queso dispuesto para su distribución. Este trabajo muestra la utilidad de la aplicación de electrones acelerados en estos quesos para eliminar *L. monocytogenes* hasta niveles seguros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos. Se han utilizado *L. monocytogenes* (Scott A, CIP 103575, serotipo 4b) y *L. innocua* (NCTC 11288). Para cada experimento, se prepararon cultivos recientes (incubación durante 24 horas a 32°C en caldo TSB) revitalizados a partir de cepas congeladas. El cultivo se centrifugó a 4°C y el sedimento se resuspendió en 50 ml de solución salina estéril, obteniéndose una carga del orden de 10^8 células/ml. Se utilizó un número elevado de células para calcular las cinéticas de destrucción de ambas cepas.

Preparación de las muestras y tratamiento de irradiación. Se adquirieron en el mercado porciones individuales (30 g) de quesos Brie y Camembert elaborados con leche pasteurizada, las cuales se contaminaron para el

establecimiento de los parámetros de destrucción microbiana. Para ello, alícuotas de 0,1 ml de la suspensión bacteriana se inocularon en cinco zonas diferentes de la pieza de queso. Las muestras se transportaron en recipientes isoterms (<5°C) a la planta de electrones acelerados IONISOS IBERICA, SA, sita en Tarancón donde se trataron con dosis entre 0,2 y 2 kGy en un equipo que opera a 10 MeV. La dosis absorbida se determinó midiendo la absorbancia de dosímetros de triacetato de celulosa, tratados simultáneamente con las muestras. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (18-20°C) por triplicado. Tras el tratamiento, las muestras se transportaron al laboratorio donde se realizaron los análisis correspondientes al día 0. El resto de muestras se almacenaron a 4 y 14°C (como ejemplo de abuso de temperatura durante la distribución del producto) para estudiar el comportamiento en el tiempo de la microbiota láctica (LAB), así como el de las características que pueden afectar a su recuperación de la misma (pH y actividad de agua, a_w).

pH y actividad de agua (a_w). El pH se determinó directamente en las muestras (pasta y corteza), por triplicado, utilizando un pHmetro de punción Crison 25+. La a_w se midió a 25 °C con un higrómetro Decagon CX1.

Análisis microbiológicos. Las muestras destinadas al recuento de supervivientes (viables totales, TVC) al tratamiento se homogeneizaron en Stomacher y su tasa se determinó en Plate Count Agar. El recuento de lactobacilos se realizó mediante siembra en doble capa de agar MRS a pH 5,5. Las placas se incubaron a 32°C durante 48 h.

Para establecer los parámetros de resistencia de las listerias al tratamiento, se utilizó agar Palcam con emulsión yema de huevo adicionado de Polimixina B, Acriflavina-HCl y Ceftazimida para inhibir el crecimiento de la microbiota autóctona. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Estimación del criterio de rendimiento (CR). De acuerdo con las referencias bibliográficas se estimó una contaminación de *L. monocytogenes* máxima de 10 cél/g (ICMSF, 2002; Cabeza y col., 2007) y una velocidad de crecimiento de 0,071 log₁₀ ufc/día a 4°C (FDA, 2003). Asumiendo para estos quesos una vida útil de 60 días a 4°C, se alcanzaría una carga de listerias en el momento de su

consumo de 5,26 log₁₀. Estos datos permiten estimar que se requieren 3,26 y 6,65 reducciones decimales para alcanzar, con cualquier tecnología, el FSO de acuerdo a los criterios establecidos por la UE y USDA, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físico-químicas

Inmediatamente después del tratamiento no hubo diferencias significativas en la *a_w* y el pH entre las muestras control y las tratadas. Sin embargo, durante el almacenamiento se observó un ligero aumento de la *a_w* en todas las muestras que se ha atribuido al acúmulo de fracciones nitrogenadas de bajo peso molecular resultante de la proteólisis típica de estos quesos. En el pH se observaron ligeras diferencias, aunque no significativas, entre la pasta y la corteza durante el almacenamiento pero, en cualquier caso, la magnitud de estos cambios no fue suficiente para influir en el crecimiento microbiano.

Análisis microbiológicos

El tratamiento con 1 kGy produjo una reducción del orden de 2 y 3 log₁₀ de la tasa de LAB en las muestras de Camembert y Brie, respectivamente, estimándose *grosso modo*, valores D (radiación absorbida que ocasiona una reducción decimal) de 0,42 kGy (Camembert) y 0,51 kGy (Brie). No obstante, las células dañadas se recuperaron durante el almacenamiento a 14°C hasta niveles prácticamente similares a los originales. Este fenómeno hay que considerarlo como favorable, dado que la microbiota normal de estos quesos puede seguir ejerciendo sus funciones en la maduración. Sin embargo, la respuesta de las LAB en las muestras almacenadas a 4°C fue la siguiente: en las muestras de Camembert no tratadas y tratadas con 1 y 2 kGy se mantuvieron estables, pero a 3 kGy su número fue declinando progresivamente. En el queso Brie la tendencia fue similar, aunque a dosis de 2 kGy también se observó una ligera disminución de su número. A esta temperatura es menos importante la actividad de las LAB porque su crecimiento es menor.

Seguridad alimentaria

Para ambos quesos, la respuesta de las listerias al tratamiento con electrones acelerados se ajustó, como era de esperar, a una reacción de primer orden. En la tabla se muestran las ecuaciones que definen la muerte de estas bacterias, pudiéndose calcular valores D para *L. innocua* de 0,36 y 0,39 kGy en los quesos Camembert y Brie, respectivamente, y para *L. monocytogenes* de 0,34 kGy en ambos tipos. Los resultados confirman, una vez más, la mayor

sensibilidad a la radiación de *L. monocytogenes* vs. *L. innocua*.

Tabla 1. Ecuaciones de supervivencia de *L. monocytogenes* y *L. innocua* en quesos Camembert y Brie tratadas con radiación beta (DA = dosis de radiación absorbida, kGy).

QUESO	ESPECIE	ECUACIÓN
Camembert	<i>L. innocua</i>	Log ufc/g = 7,42 - 2,80 x DA (R ² =0,96)
Camembert	<i>L. monocytogenes</i>	Log ufc/g = 9,26 - 2,95 x DA (R ² =0,99)
Brie	<i>L. innocua</i>	Log ufc/g = 7,29 - 2,5 x DA (R ² =0,94)
Brie	<i>L. monocytogenes</i>	Log ufc/g = 9,26 - 2,92 x DA (R ² =0,99)

El criterio de proceso (CP = CR x valor D) se calculó teniendo en cuenta el máximo valor D hallado en los experimentos realizados, resultando ser el de 0,39 kGy para *L. innocua* en queso Brie. En consecuencia, las dosis necesarias para conseguir FSO son de 1,27 y 2,59 kGy, respectivamente para los productos distribuidos en la UE y EEUU. Estos valores son aplicables también a países que hayan elegido uno u otro criterio microbiológico. Estas dosis se encuentran en los niveles considerados como aceptables (2,5 kGy) por la EFSA (2011).

BIBLIOGRAFÍA

- Cabeza, M.C., Cambero, I., de la Hoz, L., 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.*, 8:299-305.
- EFSA. 2011, Statement summarizing the conclusions and recommendations from the opinions on the safety of irradiation of food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels. *EFSA Journal*, 9:2107.
- FDA. 2003, Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Appendix 8: Growth of *Listeria monocytogenes* in foods. Washington, USA: Food and Drug Administration.
- ICMSF. 2002 *Listeria monocytogenes* in cooked sausage (Frankfurters). En: *Microorganisms in Foods: Microbiological Testing in Food Safety Management*, vol. 7 (Eds. R.B. Tompkin, L. Garam, T.A. Roberts, R.L. Buchanan, M. van Schothorst, S. Dahms and M.B. Cole, eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, pp 285-312.

Agradecimientos. El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2010-19158 y CSD0007-00016.

Efecto de los pulsos de luz en los parámetros de crecimiento de *Bacillus cereus*

Gonzalo García de Fernando, Juan S. Aguirre, Eva Hierro, Xavier F. Hospital y Manuela Fernández

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, España, mingui@ucm.es

Se ha estudiado el efecto de la tecnología de pulsos de luz (*PL*) en la fase de latencia (λ) y en la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}) de *Bacillus cereus* (CECT 131/ATCC 10876). Se aplicaron distintas dosis de *PL* para conseguir entre 0 y 4 reducciones logarítmicas. Tras la obtención de células individualizadas supervivientes a dichos tratamientos, se comprobó que cuanto mayor es la fluencia (J/cm^2), mayor es la λ y menor la μ_{max} de las células.

Los parámetros de crecimiento de *B. cereus* observados tras la aplicación de *PL* se compararon con datos obtenidos al aplicar tratamientos térmicos y de irradiación con electrones acelerados, con iguales efectos microbicidas. Tanto la irradiación como los *PL* provocan una disminución de la μ_{max} , mientras que los tratamientos térmicos no afectan a este parámetro. Por consiguiente, los *PL* y la irradiación con electrones acelerados alargan más la vida útil de un alimento que un tratamiento térmico convencional, hecho muy relevante para el análisis cuantitativo del riesgo microbiológico.

INTRODUCCIÓN

La tecnología de pulsos de luz (*PL*) constituye una alternativa para higienizar la superficie de los alimentos listos para el consumo. Los *PL* tienen un efecto antimicrobiano demostrado debido sobre todo al componente UV-C del pulso, que induce la formación de dímeros de pirimidina en el ADN (Gómez-López y col., 2005).

Los *PL* pueden emplearse para la higienización de superficies que contactan con productos alimenticios o directamente en alimentos, tales como los mínimamente procesados. En estos productos existe una mayor probabilidad de que algunos microorganismos sobrevivan al procesado, debido a la aplicación de tratamientos conservantes de intensidad menor o más ajustada. No obstante, es de esperar que los “potenciales supervivientes” estén dañados y, quizás, no sean viables, pero también cabe la posibilidad de que puedan llegar a crecer, si las condiciones les son favorables. Por tanto, es comprensible la importancia del estudio del efecto de los *PL* en los microorganismos, sobre todo en los patógenos, como *Bacillus cereus*. Dado su carácter esporulado, este microorganismo resiste muchos factores estresantes, lo que le hace un buen candidato para el objetivo de este trabajo que, en concreto, consistió en estudiar el efecto de los *PL* en la fase de latencia (λ) y la tasa específica de crecimiento (μ_{max}) de *B. cereus*. Además, dichos parámetros se han comparado con los correspondientes a tratamientos térmicos y de irradiación con electrones acelerados, aplicados en la mismas condiciones (Aguirre y col., 2012, 2013).

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del inóculo. Se utilizó *B. cereus* ATCC 10876 esporulado y germinado de acuerdo con el protocolo de Johnson y col. (1982).

Tratamiento por *PL* y estimación de los parámetros cinéticos. Previamente, se calculó la fluencia necesaria para reducir el número de viables en un 90% (D_{PL}) en placas de TSA tratadas con pulsos de luz en un equipo SBS-XeMatic-2L-A, utilizando una lámpara a media potencia (1 *PL*= 0,175 J/cm^2). El D_{PL} resultante fue 0,348 J/cm^2 . Para estimar la λ y la μ_{max} se pulsaron placas de TSA inoculadas superficialmente con *B. cereus* para reducir el número de células viables entre 0 y 4 log ufc/cm². Se recuperó el agar y se homogenizó en Stomacher con TSB. A continuación se recogió una alícuota a partir de la cual se prepararon diluciones decimales sucesivas hasta obtener, teóricamente, una sola célula en 300 μ l; este volumen se depositó en cada uno de los 200 pocillos de microplacas de Bioscreen C para seguir la evolución del crecimiento a 22 °C, de acuerdo con el método de McKellar y Hawke (2006). Las λ y μ_{max} se calcularon de acuerdo con el método descrito por Aguirre y col. (2012, 2013).

En paralelo, se controló la concentración celular en las diferentes diluciones mediante recuento directo en masa de un número elevado de muestras (de 10 a 16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra el efecto de la intensidad del tratamiento y el tipo de tratamiento aplicado en la λ de los microorganismos supervivientes. La λ se prolongó al aumentar la intensidad del tratamiento conservante. Las λ siempre fueron menores en las células tratadas térmicamente que en las irradiadas o pulsadas. Esto puede deberse a que el calor provoca daños en las proteínas de la membrana e inactivan enzimas metabólicas, mientras que la irradiación y los

PL afecta al ADN microbiano y estos daños son más difíciles de reparar, tal como sugirieron Montville y Matthews (2005).

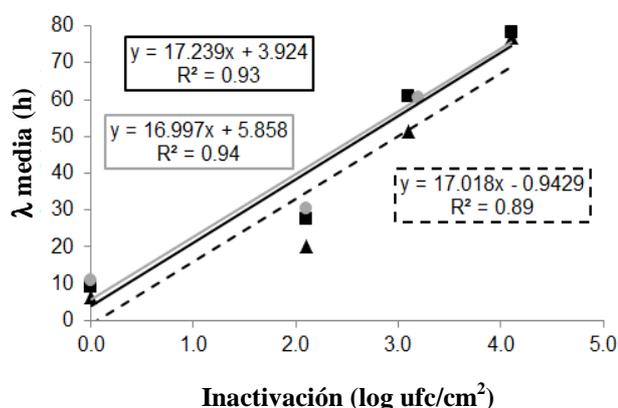


Figura 1: Comparación de las λ medias de células individualizadas de *B. cereus* supervivientes a diferentes tratamientos con PL (■), irradiación con electrones acelerados (●) y calor (▲).

La Figura 2 muestra el efecto de los tres tratamientos en la μ_{max} de las bacterias supervivientes. El calor no afecta a la velocidad de crecimiento de las células supervivientes al tratamiento, mientras que la irradiación y los PL, que dañan el ADN microbiano, provocan un enlentecimiento de la multiplicación, que, en el caso de los PL, resulta ser proporcional a la fluencia empleada. Así pues, cuanto mayor es la fluencia, menor es el número de supervivientes y éstos crecen más lentamente. La ecuación que se muestra en la Figura 2 corresponde a una polinomial, con un coeficiente de determinación (R^2) muy elevado (0,99), lo que indica la relación existente entre las variables “grado de inactivación” y “velocidad de crecimiento”. Debe resaltarse que los efectos de tratamientos conservantes que logran la misma inactivación microbiana produciendo daños en el ADN son muy parecidos. Es decir, las células supervivientes a la irradiación con electrones acelerados (Aguirre y col., 2013) o con PL presentan una deceleración en su velocidad de multiplicación que no difiere significativamente, siempre que la inactivación alcanzada sea la misma.

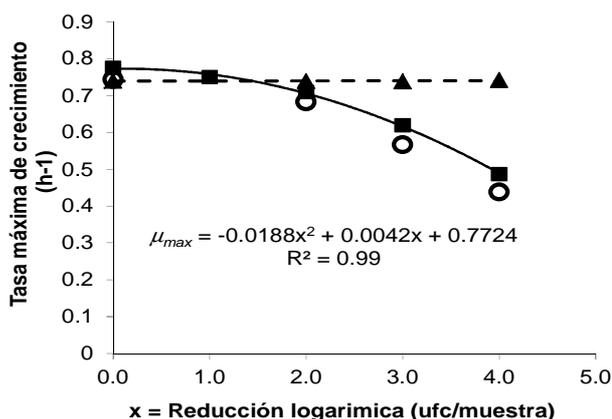


Figura 2: Comparación de las m_{max} de *B. cereus* supervivientes a diferentes tratamientos con PL (■), irradiación con electrones acelerados (●) y calor (▲).

Por consiguiente, la vida útil –microbiológica– de un alimento tratado con PL o con electrones acelerados, en el que se lograra la misma inactivación microbiana que en uno tratado térmicamente, sería más prolongada como consecuencia de un crecimiento más lento de los supervivientes en el producto terminado.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, J.S., Ordoñez, J.A., García de Fernando, G.D., 2012. A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. *Int J. Food Microbiol* 153, 444-452.
- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R., González, R., García de Fernando, G.D. 2013. E-beam irradiation affects the maximum specific growth rate of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Science and Tech*, 48, 382-386.
- Gómez-López V.M., Devlieghere F., Bonduelle V., Debevere J. 2005. Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *J. Appl. Microbiol* 99, 460-470.
- Johnson, K.M., Nelson, C.L., Busta, F.F., 1982. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses. *J. Food Sci* 47, 1268-1271.
- McKellar, R.C., Hawke, A., 2006. Assessment of distributions for fitting lag times of individual cells in bacterial populations. *Int J. Food Microbiol* 106, 169-175.
- Montville, T.J., Matthews, K.R., 2005. Spores and their significance. *Food microbiology: an introduction*, Montville and K.R. Matthews (eds). ASM Press, Washington, D.C.

Estudio del efecto antimicrobiano de diferentes aceites de oliva y polifenoles sobre cepas intestinales.

Antonio Cobo¹, Marina Hidalgo¹, Rosario Lucas¹, Elena Ortega¹, Isabel Prieto², Rubén Pérez¹, M^a José Grande¹, Antonio Gálvez¹ y Magdalena Martínez Cañamero¹

¹Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, acmolino@ujaen.es

²Área de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén.

Actualmente existe acuerdo en la influencia de la dieta sobre la composición de la microbiota intestinal. Desde un principio ha habido mucho interés en el estudio del efecto de las dietas altas en grasa por su implicación en el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina y, por tanto, su relación con el conjunto de síntomas conocidos como “síndrome metabólico”. Sin embargo, no se había estudiado el efecto de diferentes grasas con distinto nivel de saturación. Por ello, alimentamos cuatro grupos de 10 ratones con tres dietas altas en grasas (aceite de oliva virgen, refinado y mantequilla) así como con una dieta control durante 12 semanas, recogiendo las heces al inicio, tras 6 semanas y antes del sacrificio. La microbiota intestinal fue estudiada y evaluada con métodos independientes y dependientes de cultivo, obteniéndose 91 cepas aisladas a partir de las distintas muestras. En este punto, y dado la conocida actividad antimicrobiana del aceite de oliva y de sus componentes, nos preguntamos si esta actividad antimicrobiana se mantendría con las cepas intestinales obtenidas y si habría alguna relación entre el tipo de dieta a partir de la cual se habían aislado las cepas y el posible grado de inhibición. Por ello, sobre las 91 cepas aisladas hemos determinado la actividad antimicrobiana de los dos aceites de oliva (virgen extra y refinado) previamente utilizados en la composición de las dietas, así como de dos polifenoles presentes en el aceite (oleuropeína e hidroxitirosol) mediante ensayo en pocillos y mediante ensayos de microtitulación a distintas concentraciones (oleuropeína a 500, 250, 125 y 62 µg/ml; hidroxitirosol a 125, 62, 30 y 15 µg/ml; aceites al 3, 5 y 7%).

INTRODUCCIÓN

Cada vez se presta más atención a la fracción no saponificable del aceite de oliva virgen como responsable de los beneficios que conlleva esta grasa para la salud del consumidor. Es también conocida la actividad antimicrobiana de estos compuestos sobre una variedad muy amplia de grupos bacterianos, por lo que se podría relacionar su presencia en la dieta con la actividad del aceite de oliva como modulador intestinal. Por ello hemos medido la actividad antimicrobiana *in vitro* de polifenoles y aceites utilizados previamente en dietas en ratones sobre las cepas intestinales de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas. En este estudio se ha utilizado una colección de 91 cepas aisladas en TSA y BEA y procedentes de la microbiota intestinal de distintos ratones alimentados de con tres tipos diferentes de dietas: mantequilla, aceite de oliva virgen extra y aceite refinado, y a lo largo de 6 y 12 semanas.

Ensayo de actividad antimicrobiana de distintos polifenoles. Se ha determinado la actividad antimicrobiana de dos polifenoles, oleuropeína e hidroxitirosol, mediante ensayo de microtitulación. Para ello se han preparado concentraciones de 500, 250, 125 y 62,5 µg/ml en el caso

de la oleuropeína y de 125, 62, 30 y 15 µg/ml para el hidroxitirosol. En placas de 96 pocillos se adicionaron las diferentes cepas con las concentraciones de los distintos antimicrobianos para observar a las 24h el crecimiento microbiano mediante lectura de la densidad óptica a 595 nm en un lector de placas.

Ensayo de actividad antimicrobiana de dos aceites mediante técnica de los pocillos (Tagg y McGiven, 1971). Para el ensayo se ha utilizado un aceite oliva virgen extra y un aceite de oliva refinado suave. En placas de BHA tamponado con pocillos de acero de 8 mm se añadió una sobrecapa de BHA con cada una de las cepas control, una vez solidificado se añadieron en los pocillos 85 µl de cada uno de los dos tipos de aceites. Se incubaron las placas durante 24h para observar posteriormente la aparición de halos indicativo de actividad antimicrobiana de los aceites.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se ha realizado en una colección de 91 cepas, sobre las que se ha ensayado la actividad antimicrobiana de los dos aceites de oliva utilizados en las dietas a partir de las que se obtuvieron las heces y dos de los polifenoles característicos de la fracción no saponificable del aceite de oliva virgen.

Actividad antimicrobiana de distintos polifenoles.

Se determinó sobre las 91 cepas aisladas la actividad antimicrobiana de la oleuropeína y el hidroxitirosol. Los resultados obtenidos mostrados en las figuras 1, 2 y 3 indican que en general la mayoría de las cepas son más resistentes al hidroxitirosol que a la oleuropeína.

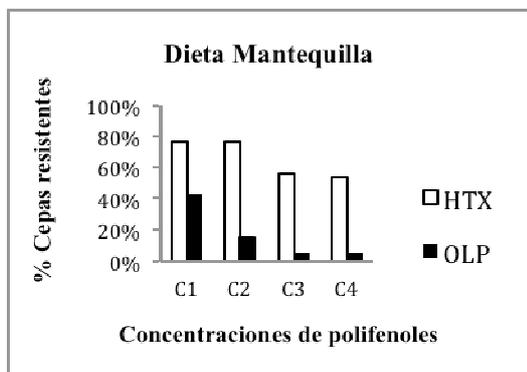


Figura 1: Porcentaje de cepas procedentes de ratones alimentados con dieta de mantequilla y resistentes a los distintos polifenoles. C1: concentración más baja de cada polifenol. C4: concentración más alta de cada polifenol.

En el caso de las cepas procedentes de heces de animales alimentados con una dieta alta en aceite de oliva virgen, el porcentaje de resistencia se eleva al 100% en las dos concentraciones más bajas de hidroxitirosol, superando el 60% incluso en el ensayo con concentración mayor (Figura 2).

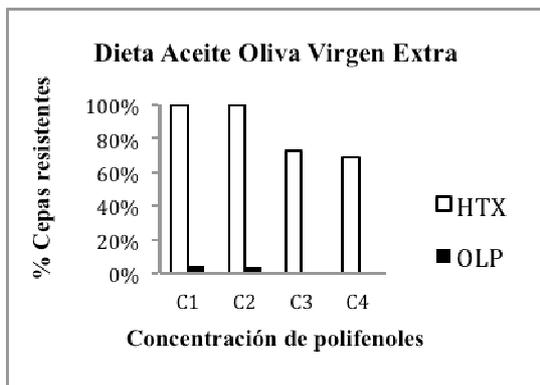


Figura 2: Porcentaje de cepas procedentes de ratones alimentados con dieta de aceite de oliva virgen y resistentes a los distintos polifenoles. C1: concentración más baja de cada polifenol. C4: concentración más alta de cada polifenol.

Siguiendo con el caso del hidroxitirosol, aunque hay un mayor número de cepas resistentes aisladas de ratones alimentados con aceite de oliva virgen extra, va seguido en número de cepas resistentes por el aceite refinado, que mantiene un número elevado incluso en las dos concentraciones más altas (Figura 3). En el caso de la oleuropeína, por el contrario, el

mayor número de cepas resistentes aparece en las cepas aisladas de ratones alimentados con dieta de mantequilla (Figura 1).

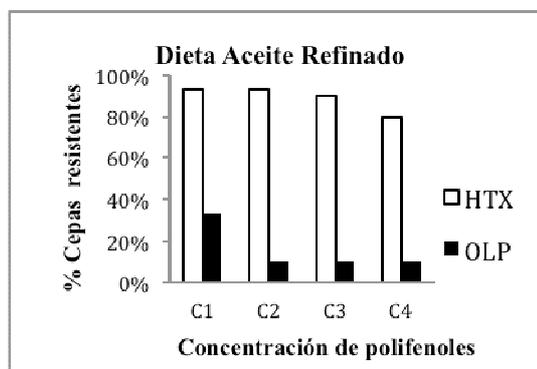


Figura 3: Porcentaje de cepas procedentes de ratones alimentados con dieta de aceite refinado y resistentes a los distintos polifenoles. C1: concentración más baja de cada polifenol. C4: concentración más alta de cada polifenol.

Actividad antimicrobiana del Aceite Oliva Virgen Extra y Aceite Refinado

En los ensayos realizados para observar la actividad antimicrobiana de los dos aceites solo se observó una pequeña inhibición en 2 de las 91 cepas ensayadas (Tabla 1). Estas cepas procedían de ratones alimentados con dieta de aceite de oliva refinado, llegando a observarse un halo de 11 mm de inhibición por parte del aceite de oliva virgen extra.

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de los distintos aceites.

CEPA	ACEITE OLIVA VIRGEN EXTRA (Halo mm)	ACEITE OLIVA REFINADO (Halo mm)
6 O5-1	11	0
12 O3-3	11	9

BIBLIOGRAFÍA

Tagg, JR., McGiven, AR. 1971, Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol., 21:94

Agradecimientos. Este trabajo ha sido subvencionado por la CEICE-JA (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340).

Evaluación del efecto antimicrobiano de nanopartículas frente a levaduras enológicas

Lucía Polo, Anna Aguilar, Isabel Pardo y Sergi Ferrer

ENOLAB – Laboratorio de Microbiología Enológica.
ERI BioTecMed / Microcluster IVISOCA. Universitat de València. España.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la acción antimicrobiana de nanopartículas de diversos metales sobre levaduras asociadas en el proceso de vinificación y determinar la posibilidad de su utilización en mostos/vinos para controlar las poblaciones de este tipo de microorganismos. Se ha estudiado el efecto sobre el crecimiento de cuatro concentraciones de tres nanopartículas compuestas de zinc, plata y una mezcla de plata y cobre, respectivamente. Dado que los efectos de los antimicrobianos dependen de la concentración de microorganismos, se ha evaluado la acción de las nanopartículas sobre dos concentraciones de levaduras: 10^3 y 10^7 ufc/mL. Se ha observado que el tipo de nanopartícula que impide el crecimiento de la gran mayoría de las levaduras ensayadas es la que contiene los dos metales plata/cobre. Igualmente, se ha puesto en evidencia que el efecto de las nanopartículas depende de la concentración de células ensayadas y de la concentración de la nanopartícula ensayada. La nanopartícula de plata impide el crecimiento de la mayoría de las levaduras cuando se inoculan a bajas concentraciones de células, sin embargo, a la concentración de inóculo más elevada sólo se consigue controlar o minimizar el crecimiento cuando se emplean las concentraciones más altas (0.05 y 0.025 $\mu\text{g/mL}$). Las nanopartículas de zinc no tienen efecto antimicrobiano notable sobre el crecimiento de ninguna de las levaduras ensayadas a ninguna de las concentraciones probadas, ni a baja ni a alta concentración de células.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la nanotecnología ha sido objeto de un amplio desarrollo principalmente en sectores como las telecomunicaciones, automoción, medicina, industria aeroespacial, etc., y actualmente en la industria alimentaria (FSAI, 2008; Uriarte y Bald, 2008). Estudios recientes han demostrado que las nanopartículas de plata, cobre y óxido de zinc tienen efecto antimicrobiano sobre un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y que, además, presentan actividades antifúngicas y antivirales (Borkow y Gabbay, 2009; Marambio-Jones y Hoek, 2010).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron cuatro concentraciones de nanopartículas (Tabla 1) que contenían una concentración del metal correspondiente inferior o igual al permitido por la legislación.

NANOPARTICULAS	CONCENTRACIONES del metal ($\mu\text{g/mL}$)				
	0*	1	2	3	4
ZINC	0	5	25	1, 25	0,25
PLATA/ COBRE	0	0,1	0,05	0,02	0,01
PLATA	0	0,05	0,025	0,01	0,005

Tabla 1. Concentraciones expresadas en $\mu\text{g/mL}$ utilizadas en los ensayos de cada nanopartícula ensayadas. * Códigos numéricos usados en la Tabla 2.

Microorganismos testados. Se ensayaron 2 cepas de las siguientes especies *Brettanomyces bruxelensis* (ENOLAB 4945, AQ928), *Zigosaccharomyces bailii* (ENOLAB 5205, ENOLAB 4975), *Hanseniaspora uvarum* (CECT 10389, CECT 1444), *Pichia anómala* (CECT 1114, AQ 2421) y *Saccharomyces cerevisiae* (ENOLAB 4404, ENOLAB 5019) y una cepa de las especies *Schizosaccharomyces pombe* (CECT 10685) y *Saccharomyces paradoxus* (AQ 2156).

Medio y condiciones de crecimiento. Las levaduras se crecieron en medio líquido YPD (glucosa 20 g, extracto de levadura 10 g, peptona micológica 20 g/por litro). Las nanopartículas procedían de la empresa Nanocustom. Los ensayos se realizaron en medio OPM (Berbegal, 2014). El medio con las nanopartículas se distribuyó a razón de 200 μL /pocillo en microplacas de 96 pocillos. Las levaduras, precultivadas en YPD líquido, se inocularon a dos concentraciones: 1×10^3 y 1×10^7 ufc/mL) y se incubaron en agitación a 28 ° C durante 30 días. El crecimiento se determinó mediante lectura de la D.O._{600nm} dos veces al día. Para determinar si la D.O. del medio con nanopartícula evolucionaba con el tiempo se incluyeron en la microplaca pocillos con medio OPM con las diferentes concentraciones de nanopartícula pero sin inóculo de levaduras. A partir de las cinéticas de crecimiento obtenidas en cada caso, se determinó el Área Bajo Curva (Berbegal, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas de zinc no inhiben el crecimiento de ninguna de las levaduras a ninguna concentración de inóculo. Las nanopartículas de plata inhiben el crecimiento de todas las levaduras cuando la concentración del inóculo es de 1×10^3 ufc/ mL, a

excepción de *Z. bailii* ENOLAB 4975 y *S. pombe* CECT 10685. *Z. bailii* ENOLAB 4975 sólo es capaz de crecer a una concentración de 0.005 µg/mL, aunque su crecimiento se reduce en un 57 %. *S. pombe* CECT 10685 crece en todas las concentraciones de plata ensayadas aunque experimenta una reducción del crecimiento del 40%. Cuando las células están a una concentración 10⁷ ufc/mL, la plata no impide el crecimiento de ninguna cepa excepto el de *H. uvarum* CECT 10389. Las cepas de *P. anomala* y *S. cerevisiae*, *S. pombe* CECT 10685 y *Z. bailii* CECT 5205 crecen a todas las concentraciones ensayadas, mientras que *Z. bailii* ENOLAB 4975, *H. uvarum* CECT 1444 y ambas cepas de *B. bruxelensis* sólo crecen a 0.01 y 0.005 µg/mL.

Las nanopartículas de plata/cobre inhiben el crecimiento de todas las cepas cuando el inóculo es de 1x10³ ufc/mL, excepto el de *S. pombe* CECT 10685 que consigue crecer a las dos concentraciones más bajas. Cuando se usa un inóculo de 1x10⁷ ufc/mL, *P. anomala* CECT1114 y *Z. bailii* ENOLAB 4975 crecen en todas las concentraciones ensayadas, aunque el grado de inhibición del crecimiento es mayor a mayor concentración de nanopartícula. *S. cerevisiae* ENOLAB 4404, *Z. bailii* ENOLAB 5205 y *S. paradoxus* AQ 2156 son capaces de crecer con 0.01 y 0.02 µg/mL con este tipo de nanopartícula. *S. cerevisiae* ENOLAB 5019, *S. pombe* CECT 10685 y *P. anomala* AQ 2421 son capaces de crecer incluso a 0.05 µg/mL aunque su crecimiento se reduce en un 18%, 74% y 12% respectivamente. Ninguna de las cepas de *H. uvarum* ni de *B. bruxelensis* muestran crecimiento en presencia de esta nanopartícula a ninguna de las dos concentraciones de células ensayadas. En resumen, las nanopartículas de zinc apenas afectan al crecimiento, las de plata inhiben el crecimiento solo a bajas concentraciones de células, mientras que las de plata/cobre son las más efectivas a concentraciones altas de células.

BIBLIOGRAFÍA

Berbegal, C. 2014. Novel liquid starter cultures for malolactic fermentation in wine. Tesis doctoral. Universitat de Valencia.
 Borkow G., Gabbay J. 2009. Current Chemistry Biological 3, 272–278.
 FSAI. 2008. Food Safety Authority of Ireland. Food Additives, Chemical Contaminants & Residues, Dublin.
 Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. V. (2010). Journal of Nanoparticle Research, 12, 1531-1551.
 Uriarte, M., Bald, C. (2008). Alimentación, equipos y tecnología, 27, 50-54.

CEPAS		PLATA		PLATA/COBRE		ZINC	
		1x10 ³	1x10 ⁷	1x10 ³	1x10 ⁷	1x10 ³	1x10 ⁷
<i>B. bruxelensis</i> AQ928	0	58,3	60,1	49,0	49,8	44,7	46,6
	1	-	-	-	-	38,0	46,0
	2	-	-	-	-	45,4	46,3
	3	-	18,7	-	-	36,7	47,2
	4	-	50,7	-	-	40,0	49,5
<i>B. bruxelensis</i> ENOLAB 4945	0	61,4	64,8	46,7	57,0	46,9	52,7
	1	-	-	-	-	51,2	51,2
	2	-	-	-	-	49,3	53,3
	3	-	49,2	-	-	49,9	53,1
	4	-	52,5	-	-	49,9	53,0
<i>H. uvarum</i> CECT 10389	0	15,6	33,5	21,1	21,0	37,0	37,0
	1	-	-	-	-	30,3	33,1
	2	-	-	-	-	25,5	27,4
	3	-	-	-	-	39,1	37,9
	4	-	-	-	-	28,9	34,1
<i>H. uvarum</i> CECT 1444	0	28,5	21,9	32,7	29,8	31,0	20,7
	1	-	-	-	-	25,9	23,5
	2	-	-	-	-	26,2	20,5
	3	-	14,8	-	-	29,1	24,6
	4	-	16,4	-	-	27,3	21,7
<i>P. anomala</i> AQ2421	0	41,9	47,8	54,5	38,2	51,5	39,5
	1	-	25,3	-	-	57,7	40,0
	2	-	30,2	-	33,6	57,1	40,8
	3	-	44,1	-	35,8	56,2	40,0
	4	-	36,3	-	34,7	51,6	38,5
<i>P. anomala</i> CECT 1114	0	32,6	35,9	51,8	32,2	35,2	30,6
	1	-	15,9	-	14,1	35,1	29,2
	2	-	25,8	-	20,8	37,9	29,6
	3	-	32,8	-	23,6	33,9	29,2
	4	-	29,9	-	25,0	35,1	30,4
<i>S. cerevisiae</i> ENOLAB 4404	0	58,4	51,6	55,6	51,8	62,9	55,3
	1	-	24,9	-	-	60,5	57,5
	2	-	29,7	-	-	58,7	52,9
	3	-	38,3	-	37,5	59,4	53,7
	4	-	47,9	-	37,2	61,2	55,7
<i>S. cerevisiae</i> ENOLAB 5019	0	58,0	50,7	56,0	48,8	57,5	54,9
	1	-	21,7	-	-	55,2	48,2
	2	-	29,3	-	40,1	56,3	50,4
	3	-	43,4	-	39,8	55,9	48,3
	4	-	44,7	-	40,8	57,3	45,7
<i>S. paradoxus</i> AQ2156	0	54,8	45,7	54,5	44,3	51,3	36,3
	1	-	17,5	-	-	53,4	35,0
	2	-	21,2	-	-	53,1	32,9
	3	-	38,9	-	18,9	51,1	34,7
	4	-	39,2	-	38,4	52,2	34,8
<i>S. pombe</i> CECT 10685	0	51,1	48,9	54,5	48,0	54,0	48,6
	1	30,1	31,6	-	-	52,1	46,1
	2	32,6	35,9	-	12,3	51,5	45,4
	3	34,0	41,1	33,2	33,9	51,9	46,7
	4	32,5	47,5	35,5	40,3	54,2	45,4
<i>Z. bailii</i> ENOLAB 4975	0	45,4	42,1	54,2	43,1	55,0	47,3
	1	-	-	-	25,4	54,8	43,5
	2	-	-	-	28,9	52,4	40,7
	3	-	34,3	-	36,0	51,2	43,2
	4	19,5	39,0	-	38,8	50,8	43,9
<i>Z. bailii</i> ENOLAB 5205	0	53,9	48,7	56,0	49,7	54,5	44,1
	1	-	20,0	-	-	51,9	42,4
	2	-	24,6	-	-	49,7	39,9
	3	-	35,2	-	38,1	54,0	44,2
	4	-	46,1	-	37,1	49,8	45,7

Tabla 2. Datos de área bajo la curva que presentan las distintas levaduras al crecer en medio OPM con nanopartículas de plata, plata/cobre y zinc.

Agradecimientos. Los autores del trabajo agradecen a la empresa Nanocustom la cesión gratuita de las nanopartículas utilizadas en este estudio.

Efecto de mohos seleccionados sobre la población de ácaros en jamón curado

Aránzazu Picón¹, Alfredo García¹, David Gragera², Félix Núñez¹ y Miguel Angel Asensio¹

¹ Higiene y Seguridad Alimentaria, Universidad de Extremadura, España, apiconcr@alumnos.unex.es

² Parasitosis Animales, Universidad de Extremadura, España.

El control de los ácaros sigue siendo un problema importante en los sistemas de elaboración tradicional de jamón curado. Se está estudiando la utilidad de mohos con actividad acaricida como cultivos protectores durante la maduración, basándose en la producción de quitinasas y proteasas, tal como se ha comprobado en productos vegetales. Partiendo de diversos mohos con intensa actividad quitinasa obtenidos de jamones curados, se ha estudiado el comportamiento de *Tyrophagus putrescentiae* en medios de cultivo, lonchas y en centros de jamón inoculados con los mohos seleccionados. Los resultados obtenidos, sugieren que una población fúngica seleccionada puede contribuir al control los ácaros en los alimentos de larga maduración.

INTRODUCCIÓN

Debido a las desventajas que presenta el uso de los métodos convencionales para el control de los ácaros, se están desarrollando nuevos métodos de control, como la utilización de mohos entomopatógenos. Existen estudios, en los que se han utilizado estos mohos en la lucha contra artrópodos de productos vegetales. Los mohos más citados son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. No obstante, la utilización de mohos de productos vegetales tendría poco valor en jamón curado, debido a su escasa capacidad para desarrollarse en las condiciones ambientales que concurren durante la maduración. El objetivo del presente trabajo ha consistido en evaluar la actividad de mohos aislados de jamón curado frente al ácaro *Tyrophagus putrescentiae* en medios de cultivo y en centros de jamón curado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado los mohos siguientes:

-ITQ10, ITQ17, ITQ41, ITQ44 y ITQ52 aislados de jamón curado en la empresa Ibéricos Torreón Salamanca S.L.

-*Beauveria bassiana* CECT 20191, CECT 20548 y CECT 20142, *Metarhizium anisopliae* CECT 2952 de la colección Española de Cultivos Tipo

-*Penicillium chrysogenum* (RP42C) y *Penicillium brevicompactum* de la colección Higiene y Seguridad Alimentaria de la UEx.

Los ácaros (*Tyrophagus putrescentiae*) fueron aislados de jamones.

Para el conteo de los ácaros se utilizó microscopio óptico y microscopio de visión invertida, una cámara de Mc Master, solución salina sobresaturada (SSSS) con densidad 1,18 g/mL, viales para flotaciones y matraces aforados.

Cultivo de los ácaros. Se introdujeron unos 20 ácaros en frascos para cultivos celulares, con un filtro de 0,2 µm en el tapón para permitir la ventilación, que contenían dos cucharadas de pienso para ácaros (pienso de ratón/levadura

desamargada de cerveza 1/1). Cada diez días se añadía más pienso y se cambiaba de bote una porción de la población.

Inoculación en medios de cultivo sólido. Se utilizaron placas con dos medios de cultivo: Agar extracto de malta (AEM) y medio mínimo con quitina coloidal (MMQ) (Souza., 2009).

Los mohos se sembraban por extensión en la superficie.

Se incubaron a 25°C y 85-90% de humedad relativa durante 7 días y se introdujeron unos 15 ácaros por placa. Se realizó un recuento final a los 30 días tras la inoculación de los ácaros.

Inoculación de lonchas de jamón. Se obtuvieron lonchas de 3,5 cm de ancho por 4 cm de largo y unos 3 mm de grosor. Se esterilizaron con alcohol y la mitad de las lonchas se recubrieron con quitina coloidal. Una vez preparadas, las lonchas se depositaron en placas de Petri inoculándose con los mohos seleccionados. Se incubaron a 25°C y 85-90% humedad relativa. A los 8 días, cuando el moho estaba implantado en las lonchas, se introdujeron unos 15 ácaros por placa. Y se mantuvieron durante 28 días en las mismas condiciones, hasta realizar un conteo de los ácaros utilizando el microscopio.

Inoculación en centros de jamón. Los centros de jamón se esterilizaron superficialmente con etanol y se sembraron individualmente con los mohos de estudio en una cabina de bioseguridad. Seguidamente los centros se introdujeron en recipientes de metacrilato con ventilación forzada a través de un filtro con fin de evitar la contaminación del exterior. Se mantuvieron en cámaras con condiciones controladas a 25°C y 85-90% de humedad relativa. A los 10 días, cuando el moho cubría casi en la totalidad la superficie de la porción de jamón, se inocularon aproximadamente 30 ácaros por pieza. A los 28 días se procedió a la toma de muestras de superficies de jamón para proceder al conteo de los ácaros. El recuento se realizó haciendo flotaciones en SSSS, recogiendo la parte superficial de la solución y contando individuos y huevos en cámara Mc Master, por cuadruplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio realizado con medios de cultivo los mohos se desarrollaban mejor en el medio AEM, por su riqueza en azúcares, que en el medio mínimo con quitina. En las lonchas, el crecimiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae* obtenidos de la CECT fue muy limitado o incluso inexistente; el resto de los mohos sí crecieron en las lonchas inoculadas. En los centros de jamón se observó un claro efecto en la población de ácaros, dependiendo de la cepa inoculada.

En los medios de cultivo (Fig. 1), el lote control inoculado con *P. brevicompactum* mostró un mayor recuento de ácaros. En las lonchas de jamón, esterilizadas antes de incorporar los ácaros, se produjo un desarrollo de distintos microorganismos, probablemente aportados con los propios ácaros, que no favorecieron el desarrollo de ácaros. En los centros de jamón con una población fúngica espontánea, analizando el 20-25% de la superficie total de la muestra se obtuvo un alto número de adultos y de larvas, encontrándose también una cantidad muy superior de huevos.

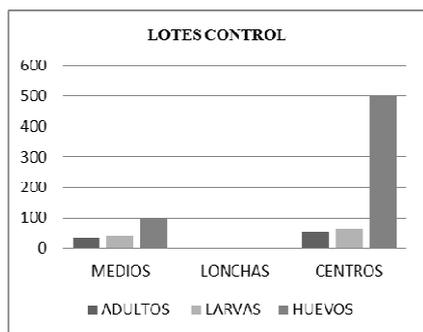


Figura 1: Evolución de los ácaros en los lotes control.

En la figura 2 se comparan los diferentes estudios realizados con la cepa ITQ44. En los medio de cultivo se observa una reducción del número de adultos, mientras que en los centros de jamón prácticamente no se observan formas larvarias.

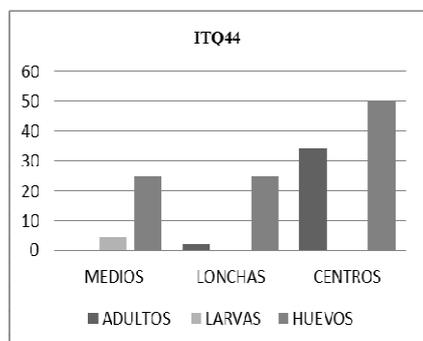


Figura 2: Efecto de la cepa ITQ44 en el desarrollo de ácaros

Con la cepa ITQ52 también se observa que el número de adultos y de larvas es menor, siendo más patente en los centros de jamón (Fig. 3).

La cepa RP42C (Fig. 4) favorece el crecimiento de los ácaros en los medios de cultivo, e incluso en los centros de jamón el número de larvas supera al del lote con una población fúngica espontánea del lote control.

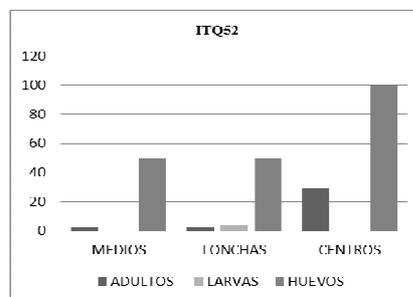


Figura 3: Efecto de la cepa ITQ52 en el desarrollo de ácaros

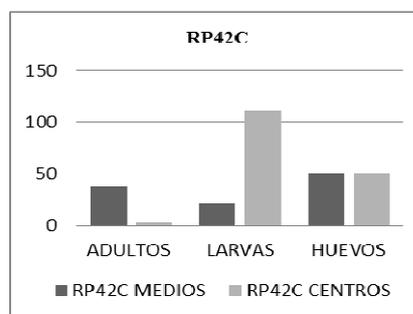


Figura 4: Efecto de la cepa RP42C en el desarrollo de ácaros

Por lo tanto, los mohos seleccionados por su alta actividad quitinasa provocan una reducción en el número de ácaros, especialmente de larvas, logrando que la población de ácaros sea sensiblemente menor que en los lotes con otros mohos.

La secuenciación de la región de los ITS y de la β -tubulina revelaron que la cepa ITS44 es *Penicillium nalgiovense*, un microorganismo ampliamente descrito en productos cárnicos madurados, mientras que la cepa ITS52 se corresponde con *Beauveria bassiana*. Antes de aplicar estos mohos a nivel industrial es necesario evaluar su impacto en las características sensoriales del jamón.

Los resultados obtenidos sugieren que la población fúngica seleccionada por su actividad quitinasa puede contribuir al control de los ácaros en productos cárnicos madurados.

BIBLIOGRAFÍA

Souza Claudiana P. 2009. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. World J. Microbiol. Biotechnol., 25:2079–2082

Agradecimientos. El presente trabajo se ha sido financiado por el CDTI (proyecto IDI20120340) e Ibéricos Torreón Salamanca S.L.

Presurización *versus* pasteurización en *smoothies* de fruta: calidad, seguridad y vida útil

Anna Jofré¹, Pierre Picouet², Adriana Hurtado³, Sancho Bañón³, José M. Ros³ y M. Dolors Guàrdia²

¹ Programa de Seguridad Alimentaria, IRTA, Monells, España, anna.jofre@irta.cat

² Programa de Tecnología Alimentaria, IRTA, Monells, España

³ Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia, Murcia, España

Los *smoothies* de fruta representan una alternativa al consumo de fruta fresca. En el presente estudio se elaboró un *smoothie* de fruta con manzana, plátano, naranja y fresa que fue sometido a presurización (350 MPa, 5 min) o pasteurización (80°C, 7 min). A nivel microbiológico, los *smoothies* presurizados y pasteurizados mostraron mejor calidad que los no tratados. La caracterización fisicoquímica y sensorial, en cambio, mostró resultados más parecidos entre los no tratados y los sometidos a un tratamiento de altas presiones. Consecuentemente, la presurización permite alargar la vida útil de los *smoothies* de fruta con menores alteraciones de su calidad sensorial.

INTRODUCCIÓN

En España, el consumo de frutas y hortalizas se sitúa por debajo de las recomendaciones de la OMS (400 g/día) (WHO, 2008) y se ha observado una tendencia a la baja en su consumo entre el grupo de población de los jóvenes. El consumo de batidos de frutas tipo *smoothies*, muy en auge en los últimos años, supone una nueva forma saludable y cómoda de consumir fruta ya que es una bebida que no contiene azúcar añadido, ni conservantes, ni colorantes y evita la preparación de la fruta antes de su consumo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se elaboró un *smoothie* de fruta con manzana, plátano, naranja y fresa (pH 3,8 y 12 °Brix). El producto elaborado y envasado en botellas de 250 ml se sometió a un tratamiento de alta presión (5 min a 350 MPa) que se comparó con un tratamiento térmico equivalente (7 min a 80°C) y con muestras no tratadas (control). Los *smoothies* se conservaron a 4°C y se evaluaron tanto microbiológicamente (mesófilos (PCA a 30°C durante 3 días), psicrófilos (PCA a 4°C durante 10 días), mohos+levaduras (YGC a 25°C durante 5 días) y coliformes y *E. coli* (coli ID, Biomerieux), *L. monocytogenes* y *Salmonella* se investigaron mediante enriquecimiento en BHI durante 48h seguido de crecimiento en medios selectivos y confirmación por PCR (Stollewerk y col. 2011), como sus características fisicoquímicas y sensoriales a tiempo inicial y a lo largo de su vida útil (7, 14, 21 y 28 días). Se realizaron dos ensayos independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A nivel microbiológico, la presurización (HPP) y la pasteurización (TT) redujeron de forma similar los recuentos de psicrófilos, mohos y levaduras (Figura 2) y coliformes, los cuales se mantuvieron a niveles inferiores a 1 Log ufc/g durante toda la vida útil del producto. Los *smoothies* presurizados y los pasteurizados mostraron recuentos de mesófilos 2,2 y

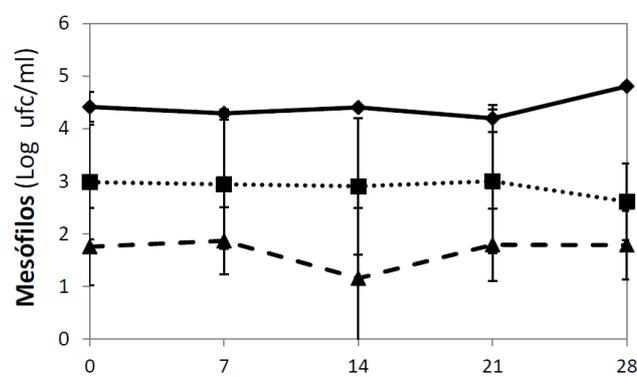


Figura 1: Evolución de los mesófilos en *smoothies* de fruta control, presurizados (HPP) y tratados térmicamente (TT) almacenados durante 28 días a 4°C.

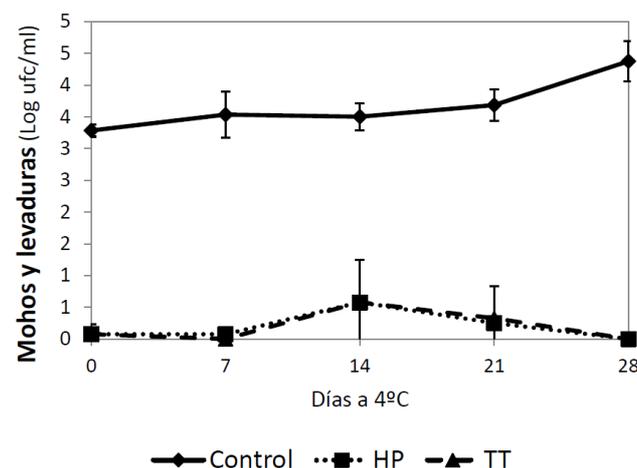


Figura 2: Evolución de los mohos y levaduras en *smoothies* de fruta control, presurizados (HPP) y tratados térmicamente (TT) almacenados durante 28 días a 4°C.

3,0 log inferiores al control, respectivamente, niveles que se mantuvieron constantes durante los 28 días de conservación a 4°C (Figura 1). No se detectó *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ni *E. coli*.

Tabla 1: Color instrumental e índice de pardeamiento (IP) de los *smoothies* de fruta control (C), presurizados (HPP) y tratados térmicamente (TT).

	P	RMSE	C	HPP	TT
L*	<0.0001	0.0085	46.34 ^c	48.21 ^b	50.40 ^a
a	<0.0001	0.0079	17.93 ^a	16.45 ^b	15.27 ^c
b	0.0041	1.4928	23.18 ^b	24.61 ^a	24.85 ^a
IP	0.0003	5.4439	94.87 ^a	93.02 ^a	86.99 ^b

A nivel de color instrumental se observaron diferencias en los valores L*, a y b, especialmente entre el tratamiento control y el tratamiento térmico. Destacan también las diferencias en el índice de pardeamiento, significativamente inferior en los *smoothies* tratados térmicamente (87,0) en comparación con los no procesados y los presurizados, que no presentaron diferencias significativas (93,0-94,9) (Tabla 1). Este índice podría relacionarse con la actividad enzimática detectada, ya que el tratamiento por alta presión no inactiva las enzimas y el producto presurizado se comporta como el control (Keenan y col. 2012). La caracterización sensorial realizada por un panel de seis catadores expertos, mostró mayores diferencias entre el producto control y el tratado térmicamente que entre el control y el presurizado. Los *smoothies* tratados térmicamente se caracterizaron por presentar intensidades elevadas de color marrón oxidado y de olor y flavor a cocido, así como mayor viscosidad y granulosidad (Figura 3). Estos atributos no son propios de un *smoothie* de fruta. En cuanto a la aceptabilidad general, la del producto presurizado (6,3) fue similar a la del producto no tratado (7,9), mientras que la del producto tratado térmicamente, fue significativamente inferior (4,5).

producto, la calidad sensorial del *smoothie* de fruta presurizado es superior a la del producto tratado térmicamente.

BIBLIOGRAFÍA

Keenan, D.F. , Rößle, C., Gormely, R., Butler, F., Brunton, N.P. 2012, Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. LWT - Food Sci. Tech. 45:50–57.

Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Ferrini, G., Garriga, M. 2011, Ensuring food safety by an innovative fermented sausage manufacturing system. Food Control, 22:1984–1991.

WHO (World Health Organization) 2008, WHO European Action Plan for Food and Nutrition 2007-2012. (http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0017/74402/E91153.pdf) WHO, Copenhagen, Denmark.

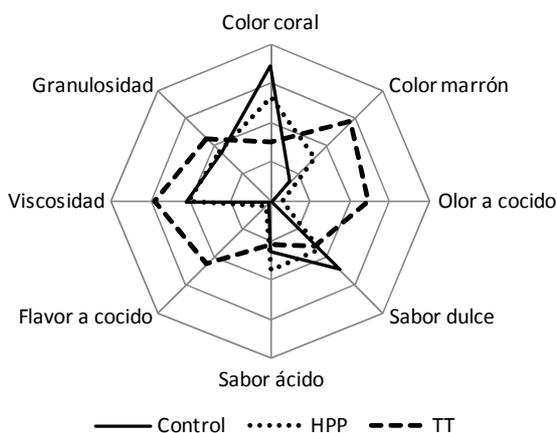


Figura 3: Caracterización sensorial de los *smoothies* de fruta control, presurizados (HPP) y tratados térmicamente (TT).

Se puede concluir que aunque la presurización y la pasteurización térmica alargan la vida útil del

Estudio de vida útil de dos cortes comerciales de carne de ternera envasada en atmósfera modificada: Efecto del porcentaje de CO₂ empleado

M. Camino García-Fontán, Aida Cachaldora y Gloria García

Fundación Centro Tecnológico de la Carne. Avda. Galicia nº 4 - Parque Tecnológico de Galicia 32900. Ourense.
caminogarcia@ceteca.net

En el presente estudio se ensayó el efecto de dos mezclas de gases (80% O₂+20% CO₂ y 70% O₂+30%CO₂) sobre la vida útil de dos tipos de cortes comerciales (filete vs. carne para guisar) de carne de ternera. Se evaluó la calidad microbiológica mediante el recuento de aerobios psicrófilos, enterobacterias, *Escherichia coli* y la presencia/ausencia de *Salmonella*, tras 0, 3, 6, 7 y 8 días de almacenamiento a refrigeración. Al comparar las estrategias de envasado, se pudo constatar el efecto bacteriostático del CO₂ de tal manera que la mayor concentración de CO₂ empleada en la atmósfera implicó menores recuentos de aerobios psicrófilos y enterobacterias a lo largo del almacenamiento, para los dos cortes comerciales. Cabe destacar que tanto *E. coli* como *Salmonella* se encontraron, en todas las muestras analizadas, dentro de los valores aconsejados por el CENAN para carnes frescas, refrigeradas y congeladas. A partir de los resultados obtenidos de este estudio, podríamos establecer una vida útil de 7-8 días, para el caso del corte comercial “filete”, y de 3 días para el corte comercial “carne para guisar”, en las dos atmósferas ensayadas.

INTRODUCCIÓN

La carne, debido a su elevado contenido en agua y abundancia de importantes nutrientes, es un excelente sustrato para el crecimiento de bacterias, tanto alterantes como patógenas, que junto con las alteraciones del color (pigmentos musculares) y el enranciamiento de la grasa constituyen los principales mecanismos de deterioro de la carne fresca. Estos factores son importantes para la vida útil y consecuentemente para la aceptación por parte del consumidor (García y col., 2011).

Una de las alternativas para controlar los parámetros de la calidad y prolongar la vida útil de la carne fresca es el envasado en atmósfera modificada, que consiste en la evacuación del aire del interior del envase y la inyección del gas o combinación de gases más adecuados a los requerimientos del producto (principalmente O₂, CO₂ y N₂). Cada gas juega un papel específico en la conservación del alimento, así el O₂ estimula el crecimiento de bacterias aerobias, inhibe el crecimiento de anaerobios (McMillin y col., 2008) y promueve la formación de la oximioglobina, pigmento responsable del color rojo brillante característico de la carne fresca (O'Grady y col., 2000). Sin embargo, la presencia de oxígeno también aumenta la tasa de oxidación de los lípidos, lo que provoca cambios indeseables en el color y sabor (Love y Pearson, 1971). La función del CO₂ en el interior de los envases es retrasar el crecimiento microbiano, por su papel tanto bacteriostático como fungicida (García y col., 2011), siendo el efecto inhibitorio directamente proporcional a su concentración. Finalmente, el N₂ es un gas inerte que se emplea en la mezcla de gases como gas de relleno.

El presente estudio tiene como finalidad estudiar el efecto de dos mezclas de gases (80% O₂+20% CO₂ y 70% O₂+30%CO₂) sobre la vida útil de dos tipos de cortes comerciales de carne de ternera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se partió de 50 bandejas de “filete” y 50 bandejas de “carne para guisar” de ternera, procedentes de la misma industria cárnica y envasadas en dos tipos de atmósfera modificada (80% O₂+20% CO₂ y 70% O₂+30%CO₂). Las muestras se mantuvieron almacenadas a refrigeración durante 3, 6, 7 y 8 días. Para cada punto de muestreo, y con el objeto de evaluar la vida comercial de estos productos, se realizó el recuento de aerobios psicrófilos (recuento en placa, basado en la ISO 4833:2003), enterobacterias (recuento en placa, ISO 21528-2:2004), *Escherichia coli* (recuento Tempo®, basado en NMP) y presencia/ausencia de *Salmonella* (MiniVidas, Técnica ELFA). Estas determinaciones también se llevaron a cabo a día cero considerando este punto como “muestras control”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los recuentos obtenidos para aerobios psicrófilos y enterobacterias de las muestras de carne de ternera (filete y carne para guisar), envasadas bajo diferentes atmósferas (80% O₂+20%CO₂ y 70%O₂+30%CO₂), a lo largo del almacenamiento aparecen recogidos en la Figura 1.

Al comparar entre estrategias de envasado, se pudo comprobar que las muestras envasadas con mayor concentración de CO₂ (70%O₂+30%CO₂) mostraron, en general y a lo largo de todo el período de almacenamiento, recuentos más bajos, tanto de aerobios psicrófilos como de enterobacterias, para los

dos cortes comerciales, constatando el efecto bacteriostático que presenta el CO₂ en el interior del envase. Estos resultados concuerdan con los de Kizilirmak y col. (2011) y García y col. (2011), quienes observaron que concentraciones de CO₂ superiores al 20% fueron suficientes para ralentizar el crecimiento de las bacterias responsables del deterioro de la carne fresca de ternera.

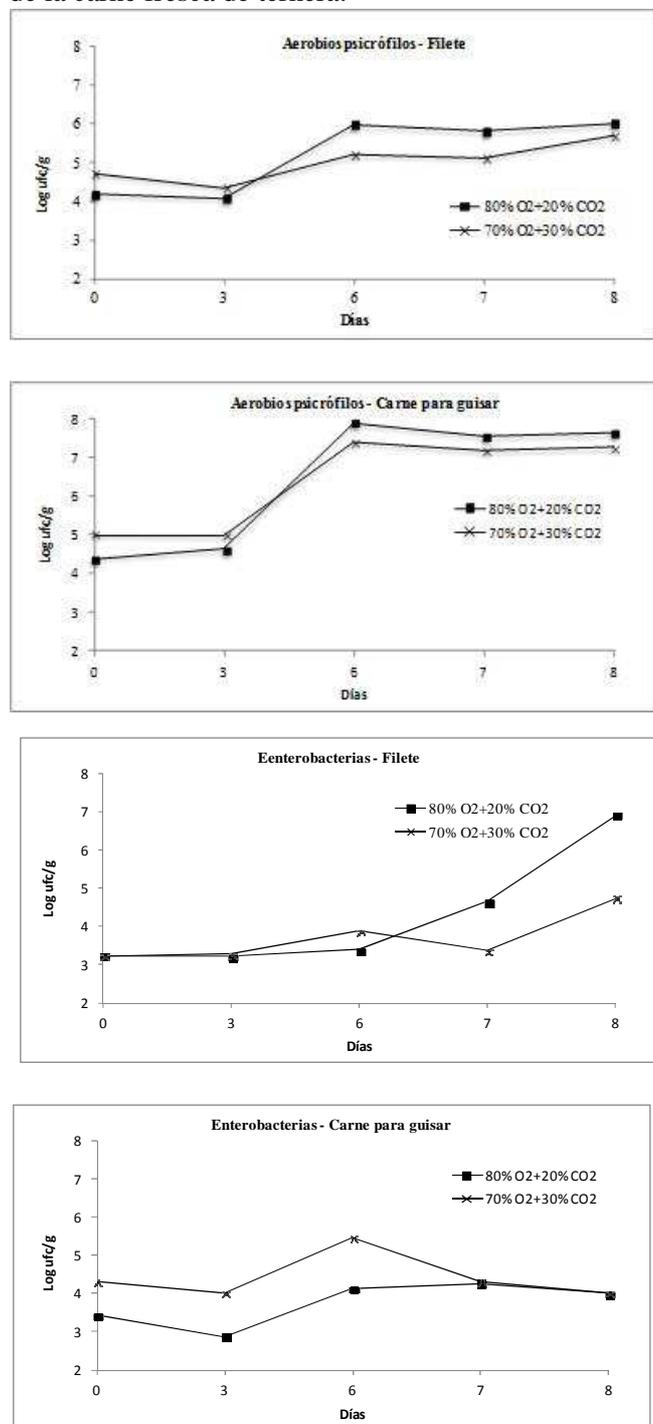


Figura 1: Evolución, a lo largo del almacenamiento en refrigeración, de los recuentos de aerobios psicrófilos y enterobacterias procedentes de las muestras de ternera (filete y carne para guisar) envasadas en diferentes atmósferas modificadas.

Para todas las muestras analizadas, las determinaciones de *E. coli* y de *Salmonella* estuvieron dentro de los valores aconsejados por el CENAN (Centro Nacional de Alimentación y Nutrición del Ministerio de Sanidad y Consumo) (1982) para carnes frescas, refrigeradas y congeladas (*E. coli* máximo 10 ufc/g y *Salmonella/Shigella* ausencia en 25 g).

Teniendo en cuenta los dos cortes comerciales estudiados, se evidenció que la mayor manipulación necesaria para obtener carne para guisar (corte manual) se traduce en un mayor recuento de aerobios psicrófilos y enterobacterias, con la consecuente reducción del periodo de vida comercial.

Al no existir criterios microbiológicos legalmente establecidos para carnes frescas y refrigeradas que nos permitan establecer un periodo de vida comercial, basado en los recuentos de los grupos microbianos considerados como indicadores de calidad industrial, CENAN establece unos valores de referencia para algunos de estos grupos, por encima de los cuales la carne no se considera apta para el consumo humano. Basándonos en estas premisas y con los resultados obtenidos de este estudio, podríamos establecer una vida útil de 7-8 días, para el caso del corte comercial “filete”, y de 3 días para el corte comercial “carne para guisar” en las dos atmósferas ensayadas.

BIBLIOGRAFÍA

García, G., Bermúdez, R., Pena, A., García-Fontán, C. 2011, Efecto de la estrategia de envasado sobre la vida útil de carne de vacuno. Alimentación, Equipos y Tecnología, 258: 39-43.

McMillin, K.W. 2008, Where is MPA going?. A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. Meat Sci., 80: 43-65.

O’Grady, M.N., Monahan, F.J., Burke, R.M., Allen, P. 2000, The effect of oxygen level and exogenous α -tocopherol on the oxidative stability of minced beef in modified atmosphere packs. Meat Sci., 55: 39-45.

Love, J.D., Pearson, A.M. 1971, Lipid oxidation in meat and meat products-A review. JAOCS, 547-549.

Kizilirmak, O., Irkin, R., Degirmencioglu, M., Degirmencioglu, A. 2011, The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. Meat Sci., 88: 221-226.

ISO (International Organization for Standardization). ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal methods for the enumeration of microorganisms—Colony- count technique at 30 degrees. 3rd ed. Ginebra. Suiza

ISO (International Organization for Standardization). 2003, ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae—Part II: Colony- count method. 3rd ed. Ginebra. Suiza.

CENAN. 1982, Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.

Vida útil de platos preparados a base de carne envasados en atmósfera protectora enriquecida en CO₂

Sonia Español¹, Verónica Alonso² y José Antonio Beltrán²

¹ Departamento de Calidad e I+D+i, Colectividades y Restaurantes de Aragón y Rioja, S,L (CORES), Zaragoza, España
calidad@cores-sl.com

² Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España

En este estudio fueron evaluados seis platos preparados a base de carne (ternera guisada, pechuga en salsa de champiñones, pollo asado, pollo a la cerveza, hamburguesas en salsa jardinera y albóndigas en salsa jardinera) envasados en diferentes atmósferas protectoras [M1:60%/40% (N₂/CO₂), M2: 60%/40% (N₂/CO₂)+CO₂ sólido] y fueron comparadas con muestras idénticas de cada uno de los platos envasados con aire (Control). Los lotes de cada uno de los platos del estudio fueron almacenados en refrigeración (3°C) durante 15 días. En ninguno de los platos analizados se obtuvieron recuentos de mohos y levaduras, así como presencia de patógenos. Los aerobios mesófilos en todos los platos preparados envasados en la atmósfera M1 fueron inferiores a 5 log UFC/g, y los recuentos de enterobacterias fueron inferiores en los envasados M1 y M2 en comparación con el Control. La mayoría de los platos envasados con la atmósfera M1 alcanzaron el día 10-11 del almacenamiento valores de apreciación global por encima del límite de aceptación (3); sin embargo, únicamente los platos de pollo asado y albóndigas a la jardinera fueron valorados todavía positivamente el día 14 de almacenamiento. Por tanto, este estudio muestra que el uso de atmósferas enriquecidas en CO₂ ejerce un claro efecto bacteriostático, pero concentraciones elevadas de este gas (70%) provoca efectos sensoriales negativos. En cambio, concentraciones de 40% de CO₂ mantienen un equilibrio entre la seguridad y la aceptabilidad sensorial de los platos preparados analizados.

INTRODUCCIÓN

Prolongar la vida útil de los platos preparados refrigerados, manteniendo la máxima calidad del producto, y preservar las características organolépticas de la comida recién hecha es un reto de todas las empresas del sector de la restauración colectiva.

Muchos autores han estudiado la capacidad de las atmósferas modificadas para extender la vida útil de diferentes alimentos, por ejemplo pavo cocinado (Juneja y col., 1996) o pollo (Young y col., 1989).

La eliminación de O₂ del envase y la introducción de diferentes concentraciones de CO₂ y N₂, junto con una adecuada refrigeración, inhibe el crecimiento de microorganismos aerobios, bacterias proteolíticas, mohos y levaduras, prolongando la vida útil de los productos perecederos bajo refrigeración de manera significativa (Parry, 1993).

MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron evaluados seis platos preparados a base de carne (ternera guisada, pechuga en salsa de champiñones, pollo asado, pollo a la cerveza, hamburguesas en salsa jardinera y albóndigas en salsa jardinera) envasados en diferentes atmósferas protectoras [M1:60%/40% (N₂/CO₂), M2: 60%/40% (N₂/CO₂)+CO₂ sólido] y fueron comparadas con muestras idénticas de cada uno de los platos envasados con aire (Control). Los lotes de cada uno de los platos del estudio fueron almacenados en refrigeración (3°C) durante 15 días.

Análisis Físico-químicos (gases en el espacio de cabeza, pH y medida de la oxidación lipídica). Para la medición de gases se utilizó un medidor (Oxibaby, Witt-Gasetechnic O₂/CO₂, Witten, Alemania), para la medición del pH un pHmetro (Crison, Basic 20, Barcelona, España) y para la medida de oxidación lipídica se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Pfalzgraf *et al.*, 1995).

Análisis microbiológicos. Para los recuentos de microorganismos se empleó el método de recuento en placa. Aerobios mesófilos totales: Plate Count Agar (PCA), 24-48h/37°C±1°C. Enterobacterias: Agar violeta cristal-rojo neutro-bilis-glucosa (VRBD), 24-48h/37°C±1°C. Bacterias ácido-lácticas (BAL): Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), 3 días/37°C±1°C. Mohos y levaduras: Agar Sabouraud Dextrosa, 7 días/25°C±1°C. Psicrótrofos aeróbicos totales: Plate Count Agar (PCA) en aerobiosis, 10 días/4°C±1°C. Psicrótrofos anaeróbicos totales: Agar Trypticosa Soja (TSA) en anaerobiosis, 10 días/4°C±1°C. También se realizó la investigación de la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. (Agar XLD y Verde Brillante) y *Listeria monocytogenes* (ALOA).

Análisis sensorial. El panel fue constituido por seis catadores entrenados (ISO 8586-1, 1993) que evaluaron los siguientes descriptores sensoriales durante todo el periodo de refrigeración: aspecto, olor, sabor, firmeza, jugosidad y apreciación global, con una escala del 1 al 5.

Análisis estadístico. Todos los datos fueron analizados mediante el modelo lineal general (GLM) del paquete estadístico IBM SPSS versión 19 (IBM SPSS, 2011) con

los efectos principales: tipo de atmósfera y tiempo en refrigeración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los envasados con aporte de CO₂ se produjo un descenso notable de la concentración del CO₂ en los primeros siete días del almacenamiento y una ligera acidificación del medio, como resultado de la producción de ácido carbónico (Dixon y Kell, 1989) y del posible crecimiento de bacterias acidificadoras. Respecto a la oxidación lipídica, los platos preparados a base de carnes picadas obtuvieron valores mayores que los de las carnes en filetes. Este hecho puede deberse a que el simple troceado o picado de las carnes favorece la oxidación lipídica, dado que la integridad celular se rompe favoreciendo el contacto entre los componentes prooxidantes y los componentes lipídicos (Erikson, 1998).

Por otro lado, en ninguno de los platos analizados se obtuvieron recuentos de mohos y levaduras, así como presencia de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*. Los aerobios mesófilos en todos los platos preparados envasados en la atmósfera M1 fueron inferiores a 5 log UFC/g, límite establecido por el RD.3484/2000, y los recuentos de enterobacterias fueron inferiores en los envasados M1 y M2 en comparación con el Control.

Los platos preparados de carne pueden sufrir deterioro por acción de las bacterias ácido-lácticas (Borch *et al.*, 1996), siendo los platos de albóndigas a la jardinera, pollo a la cerveza y pollo asado, donde se detectaron en los días finales del almacenamiento. Los recuentos de éstos fueron inferiores a 2 log UFC/g en las atmósferas con aporte de CO₂ en comparación con el envasado Control. Tanto los recuentos de aerobios como de anaerobios psicrótrofos presentaron valores similares a los de los mesófilos. Se ha observado que una concentración de 20-30% de CO₂ es suficiente para prevenir el crecimiento de bacterias aerobias durante el almacenamiento (Sorheim *et al.*, 2004), pero incrementando el nivel de CO₂ aumenta su eficacia.

El análisis sensorial es crucial para poder concluir un estudio de vida útil, ya que aunque un alimento sea aceptable microbiológicamente puede no estarlo sensorialmente. Por ello, numerosos autores como Armstrong *et al.*, (2007) o Jang y Lee, (2005) basaron la vida útil de platos a base de carne (cerdo en salsa de tomate, carne cocida y otros platos de carnes en salsa), tanto en criterios microbiológicos como sensoriales.

El envasado Control y el envasado M2 presentaron rápidamente signos de deterioro y la mayoría de los platos fueron rechazados el día 7. En cambio, el envasado M1 fue el que mejor mantuvo las características sensoriales originales de los platos

preparados durante más tiempo. La totalidad de los platos envasados con la atmósfera M1 alcanzaron los días 10-11 de almacenamiento valores de apreciación global por encima del límite de aceptación (3); sin embargo, únicamente los platos de pollo asado y albóndigas a la jardinera fueron valorados todavía positivamente el día 14 de almacenamiento.

En conclusión, este estudio muestra que el uso de atmósferas enriquecidas en CO₂ ejerce un claro efecto bacteriostático, pero concentraciones elevadas de este gas (70%) provocan efectos sensoriales negativos. En cambio, una concentración del 40% de CO₂ mantiene un equilibrio entre la seguridad y la aceptabilidad sensorial de los platos preparados analizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, G. A., McIlveen, H. 2000. Effects of prolonged storage on the sensory quality and consumer acceptance of sous vide meat-based recipe dishes. *Food Quality and Preference*, 1, 377–385.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 103–120.
- Dixon, N. M., Kell, B. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 109–136.
- Erikson, M. 1998. *Lipid Oxidation of Muscle Foods en Food Lipids*. Editorial Marcel Dekker Inc.
- Jang, J. D., Lee, D. S. 2005. Development of a sous vide packaging process for Korean seasoned beef. *Food Control*, 16(3), 285–291.
- ISO 8586-1. 1993. Sensory analysis methodology: General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors: International
- Juneja, V.K., Marmer, B.S. Call, J.E. 1996. Influence of modified atmosphere packaging on growth of *Clostridium perfringens* in cooked turkey. *J. Food Saf.* 16, 141-150.
- Parry, R.T. 1993. Introducción. In R.T Parry (Ed.) *Principles and application of modified atmosphere packaging of food* (pp. 1-17). *Glasgow: Blackie Academic and Professional*.
- Pfalzgraf, A., Frigg, M. Steinhart, H. 1995. α -Tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1339-1342.
- 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.
- Sorheim, O, Ofstad, R., Lea, P. 2004. Effect of carbon dioxide on yield, texture and microstructure of cooked ground beef. *Meat Sci.*, 67, 231-236.
- Young, H., MacFie, H.J.H. Light, N. 1989. Effect of packaging and storage on the sensory quality of cooked chicken menu items served from chilled vending machines. *J. Sci. Food Agric.* 48, 323-338.

Seguridad y calidad sensorial de platos preparados a base de pescado

Sonia Español¹, Verónica Alonso² y José Antonio Beltrán²

¹ Departamento de Calidad e I+D+i, Colectividades y Restaurantes de Aragón y Rioja, S,L (CORES), Zaragoza, España
calidad@cores-sl.com

² Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España

El envasado en atmósfera protectora (EAP) fue combinado con el método de Cook & Chill (cocinar y enfriar) para prolongar la vida útil de platos preparados a base de pescado. En este estudio fueron evaluados dos platos preparados a base de pescado (merluza a la vasca y tilapia con ajetes y gambas) envasados en diferentes atmósferas protectoras [M1:60%/40% (N₂/CO₂), M2: 60%/40% (N₂/CO₂)+CO₂ sólido] para el plato de merluza y [M1:60%/40% (N₂/CO₂)] para el plato de tilapia. Todos los envasados fueron comparados con muestras idénticas de cada uno de los platos envasados con aire (Control). Los lotes de cada uno de los platos del estudio fueron almacenados en refrigeración (3°C) durante 15 días. En ninguno de los platos analizados se obtuvieron recuentos de enterobacterias, mohos y levaduras, así como presencia de patógenos. Los aerobios mesófilos en ambos platos preparados envasados con las atmósferas M1 y M2 fueron inferiores a 5 log UFC/g el día 15 de almacenamiento. El envasado M1 para los dos platos a base de pescado fue el que mejor mantuvo las apreciaciones sensoriales originales en los dos platos preparados durante más tiempo, alcanzando el día 11 valores de apreciación global todavía por encima del límite (>3). En cambio, el envasado M2, aunque mantuvo controlados los microorganismos hasta el final del almacenamiento, por el aporte alto de CO₂, presentó una oxidación lipídica superior a la de la atmósfera M1 debido al efecto prooxidante del CO₂, y además obtuvo valoraciones sensoriales negativas. Por tanto, este estudio mostró que el envasado M1 (60%N₂/40%CO₂) mantuvo de manera más segura y aceptable los platos a base de pescado, en comparación los demás envasados.

INTRODUCCIÓN

El pescado es uno de los alimentos más perecederos y su tejido muscular sufre un deterioro más rápido que los músculos de los mamíferos. Este deterioro está determinado por su composición (proteínas, lípidos, agua, hidratos de carbono y minerales) y por la degradación enzimática y microbiana que se produce en él (Jay, 2009; Masniyom, 2011; Nickelson y col., 2001).

El uso de atmósferas modificadas o protectoras presenta numerosas ventajas, entre ellas un aumento sustancial de la vida comercial del producto. Estudios como los de Chen y col. (2007) y Fagan y col. (2004) muestran como los envasados bajo atmósferas modificadas con alto contenido en CO₂ en diferentes clases de pescados crudos y/o cocinados prolongan la vida útil de estos alimentos de manera considerable.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron evaluados dos platos preparados a base de pescado (merluza a la vasca y tilapia con ajetes y gambas) envasados en diferentes atmósferas protectoras [M1:60%/40% (N₂/CO₂), M2: 60%/40% (N₂/CO₂)+CO₂ sólido] para el plato de merluza y [M1:60%/40% (N₂/CO₂)] para el plato de tilapia. Estos envasados fueron comparados con muestras idénticas de cada uno de los platos envasados con aire (Control). Los lotes de cada uno de los platos del estudio fueron almacenados en refrigeración (3°C) durante 15 días.

Análisis físico-químicos (gases en el espacio de cabeza, pH y medida de la oxidación lipídica). Para la medición de gases se utilizó un medidor (Oxibaby, Witt-Gasetechnic O₂/CO₂, Witten, Alemania), para la medición del pH un pHmetro (Crison, Basic 20, Barcelona, España) y para la medida de oxidación lipídica se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Pfalzgraf y col., 1995).

Análisis microbiológicos. Para los recuentos de microorganismos se empleó el método de recuento en placa. Aerobios mesófilos totales: Plate Count Agar (PCA), 24-48h/37°C±1°C. Enterobacterias: Agar violeta cristal-rojo neutro-bilis-glucosa (VRBD), 24-48h/37°C±1°C. Bacterias ácido-lácticas (BAL), Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), 3 días/37°C±1°C. Mohos y levaduras: Agar Sabouraud Dextrosa, 7 días/25°C±1°C. Psicrótrofos aeróbicos totales: Plate Count Agar (PCA) en aerobiosis, 10 días/4°C±1°C. Psicrótrofos anaeróbicos totales: Agar Trypticase Soja (TSA) en anaerobiosis, 10 días/4°C±1°C. También se realizó la investigación de la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. (Agar XLD y Verde Brillante) y *Listeria monocytogenes* (ALOA).

Análisis sensorial. El panel fue constituido por seis catadores entrenados (ISO 8586-1, 1993) que evaluaron los siguientes descriptores sensoriales durante todo el periodo de refrigeración: aspecto, olor, sabor, firmeza, jugosidad y apreciación global, con una escala del 1 al 5.

Análisis estadístico. Todos los datos fueron analizados mediante el modelo lineal general (GLM) del paquete estadístico IBM SPSS versión 19 (IBM SPSS, 2011) con

los efectos principales: tipo de atmósfera y tiempo en refrigeración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los primeros siete días del almacenamiento la concentración de CO₂, del envasado M1 y M2 para ambos platos, descendió notablemente y generó una ligera acidificación del medio como resultado de la producción de ácido carbónico (Dixon y Kell, 1989).

Dada la cantidad de grasa intramuscular de la merluza 1,82% y la tilapia 2,26% (Izquierdo y col., 1999), los valores de oxidación lipídica fueron bajos, entre 0,16 y 0,27 mg malonaldehído (MDA)/kg, para el envasado M1. En cambio, el envasado M2 obtuvo valores superiores, dado su efecto prooxidante, pero inferiores a los del envasado Control que alcanzó valores de entre 0,4-0,5 mg MDA/kg.

Por otro lado, en ninguno de los platos analizados se obtuvieron recuentos de enterobacterias, mohos y levaduras así como presencia de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*. Los aerobios mesófilos en todos los platos preparados, envasados en la atmósfera M1 y M2, fueron inferiores a 5 log UFC/g, límite establecido por el RD.3484/2000, en comparación con el Control que superó el límite de aceptación en el plato de tilapia con ajetes el día 14. Respecto a los microorganismos psicrótrofos, tanto aerobios como anaerobios, únicamente se detectaron para el plato de tilapia con ajetes y gambas y presentaron recuentos a partir del día 11.

Cabe destacar que el día 7 se produjo, en los dos platos, la generación de olores y sabores a oxidado e incluso a picante en el envasado Control. El plato de merluza envasado en M2 mostró una pérdida de firmeza y jugosidad notable los días 7 y 11 y, además, se generaron olores, sabores y colores característicos del enranciamiento, resultados acordes con Dalgaard y col. (1993), lo que hizo que fuera rechazado por el panel. Por otro lado, el envasado M1 para los dos platos a base de pescado presentó durante todo el periodo de refrigeración características sensoriales valoradas muy por encima del resto de los métodos de envasado, manteniendo las apreciaciones sensoriales originales durante más tiempo y alcanzando el día 11 valores de apreciación global por encima del límite (>3). El plato a base de merluza envasado con la atmósfera M1 fue descartado para su valoración sensorial el día 14 por su mal aspecto y olor. En cambio, el plato a base de tilapia aún fue valorado de manera positiva el día 14.

El análisis sensorial es crucial para poder concluir un estudio de vida útil, ya que aunque un alimento sea aceptable microbiológicamente puede no estarlo sensorialmente.

En conclusión, este estudio muestra que el uso de atmósferas enriquecidas con un 40% de CO₂ ejerce un claro efecto bacteriostático, preservando de manera positiva las características sensoriales originales y generando, por tanto, un equilibrio perfecto entre seguridad y aceptabilidad sensorial de los platos preparados analizados durante 11 a 14 días. En cambio, no es así para condiciones de envasado con concentraciones más elevadas de este gas (70%) que aunque preserva del crecimiento microbiano, provoca efectos sensoriales negativos.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen, Gong. and Xiong, Youling L. 2008. Shelf-stability enhancement of precooked red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) tails by modified CO₂/O₂/N₂ gas packaging. *LWT* 41, 1431–1436.
- Dalgaard, P., Gram, L., Huss, H.H. 1993. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 283–294.
- Dixon, N. M., & Kell, B. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, 109–136.
- Fagan, J.D., Gormley, T.R., Mhuircheartaigh, M.M. Uí. 2004. Effect of modified atmosphere packaging with freeze-chilling on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 205–214.
- ISO 8586-1. 1993. Sensory analysis methodology: General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors: International.
- Izquierdo, P., Torres, G., Gonzalez, E., Barboza-Martinez, Y., Márquez, E., Allara, M., 1999.
- Jay, J. M. 1992. Microbiological Food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 177-190.
- Masniyom, P. 2011. Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33, 181-192.
- Nickelson, R., McCarthy, S. y Finne, G. 2001. Fish, crustaceans, and precooked seafoods. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Downes, F. P. e Ito, K. 497-505. 4ª ed. American Public Health Association. Washington (EE.UU).
- Pfalzgraf, A., Frigg, M., Steinhart, H. 1995. α -Tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 1339-1342.
- 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.

Inactivación de microorganismos patógenos por Plasma Atmosférico no Térmico: efecto de la velocidad del flujo y naturaleza del gas

Tamara Calvo¹, Avelino Alvarez-Ordóñez², Montserrat González¹, Miguel Prieto¹ y Mercedes López¹

¹ Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León, España, mmlopf@unileon.es

² Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Ireland

INTRODUCCIÓN

El Plasma Atmosférico no Térmico (PANT) se genera por excitación de gases tras la aplicación de suficiente energía, mediante descargas eléctricas a presión atmosférica y a temperatura ambiente. Está constituido básicamente por moléculas en estado o no de excitación, átomos, iones positivos y negativos, radicales libres, electrones y radiación ultravioleta que al interactuar con los microorganismos provoca su inactivación. Su efectividad está determinada por diversos factores relacionados con los microorganismos y las características de los alimentos, así como por las condiciones de procesado.

Por ello, la implementación de la tecnología PANT como alternativa segura y eficaz a los métodos convencionales de conservación utilizados por la industria alimentaria requiere la realización de estudios orientados a conocer la cinética de inactivación de microorganismos, tanto patógenos como alterantes, con el fin de optimizar los tratamientos.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la resistencia de *Salmonella enterica* serovares Typhimurium (CECT 443) y Enteritidis (CECT 4300), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Listeria innocua* (CECT 910), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) y *Escherichia coli* (CECT 348) a plasmas generados en diferentes condiciones, empleando dos gases (aire y nitrógeno) y tres velocidades de flujo (5, 10 y 15 l/min).

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento. El inóculo experimental de cada microorganismo se preparó incubando una colonia, previamente aislada, en BHI a 37°C durante 24 horas, condiciones que permitían obtener poblaciones celulares en fase de crecimiento estacionario.

Determinaciones de resistencia al plasma atmosférico no térmico. Los tratamientos por plasma fueron realizados utilizando el equipo CP121 Plasma Demonstrator, OMVE BV, previamente descrito por Fernández y col. (2012). Se sembraron filtros Whatman de policarbonato (0,2 µm de poro, 25 mm de diámetro; Fisher Scientific) con alícuotas adecuadas de los cultivos microbianos para alcanzar una carga bacteriana de aproximadamente 3×10^5 ufc/filtro, dejándolos secar durante 15 minutos en una cabina de flujo laminar. Tras exponer los filtros inoculados durante

tiempos predeterminados a plasmas de aire y nitrógeno a las diferentes velocidades de flujo estudiadas, los microorganismos supervivientes se recuperaron por agitación de los filtros en tubos estériles con 10 ml de agua de peptona, sembrándose diluciones adecuadas en BHIA. El recuento de ufc se realizó tras la incubación a 37°C durante 48 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, utilizando un control, que consistió en un filtro inoculado no sometido a la acción del plasma. Las curvas de supervivencia se modelizaron aplicando la función matemática basada en la distribución de Weibull: $\log N_t/N_0 = -(t/\delta)^p$ (N_t y N_0 : densidad de población (ufc /filtro) en tiempo t y tiempo 0; t : tiempo de tratamiento; δ y p : parámetros de escala y forma), empleando el programa informático GraphPad Prism versión 4.00 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra, a modo de ejemplo, una de las gráficas de supervivencia obtenidas para cada uno de los microorganismos investigados en las diferentes condiciones estudiadas. Como se puede observar, en la mayor parte de los casos, la cinética de inactivación microbiana por PANT no siguió la tradicional cinética de primer orden, presentando las curvas dos perfiles diferenciados: cóncavo para *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (con valores p comprendidos entre 0,27 y 0,60; 0,37 y 0,90; 0,70 y 0,88; 0,58 y 0,93, respectivamente) y convexo para *E. coli* O157:H7 (p : 0,98- 1,57) y *E. coli* (p : 1,04-1,51). La efectividad del PANT en la inactivación microbiana dependió del tipo de gas y de la velocidad del flujo. En la mayoría de los casos, un incremento del flujo de 5 a 15 l/min, independientemente del gas, tuvo un efecto significativo en la pérdida de viabilidad microbiana. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores. Noriega y col. (2011) encontraron que los tiempos de reducción decimal de *L. innocua* descendían de 21,8 a 13,9 minutos cuando el flujo de oxígeno se incrementaba de 25 a 100 ml/min. Niemira y Sites (2008) observaron un mayor efecto letal sobre *S. Stanley* y *E. coli* con un flujo de 40 l/min que con uno de 10 l/min. El efecto beneficioso de este parámetro en la pérdida de viabilidad microbiana ha sido atribuido a un aumento en la proporción de las especies reactivas producidas en la generación del plasma (Deng y col., 2006).

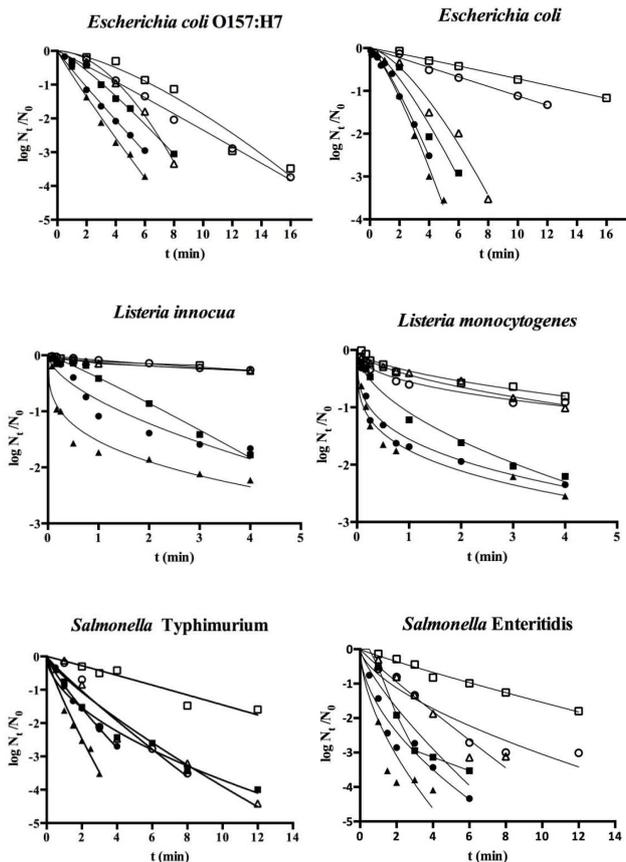


Figura 4. Curvas de supervivencia obtenidas para *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. Typhimurium*, y *S. Enteritidis*, al aplicar PANT generado con aire a velocidades de flujo de 5 (■), 10 (●) y 15 l/min (▲) o con nitrógeno a 5 (□), 10 (○) y 15 l/min (△).

Todas las bacterias mostraron mayor sensibilidad al plasma cuando el tratamiento fue realizado empleando aire como gas de trabajo. Se ha comprobado en diversas ocasiones que la incorporación de oxígeno a plasmas de argón, helio o nitrógeno mejoraba significativamente el efecto bactericida sobre *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *Micrococcus luteus*, *S. Enteritidis* (Marsili y col., 2002; Kim y col., 2011; Noriega y col., 2011; Niemira, 2012), que se ha atribuido a un incremento de las especies reactivas de oxígeno, como el ozono, el oxígeno atómico, los radicales hidroxilo y el oxígeno metaestable (Hähnel y col., 2010) al ejercer un potente efecto oxidativo sobre los ácidos grasos, proteínas y ADN, comprometiendo la viabilidad microbiana (Laroussi y Leipold, 2004).

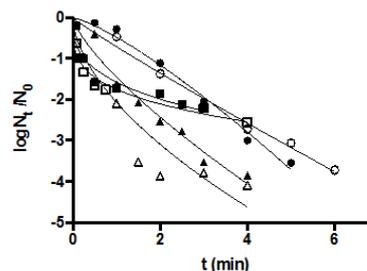


Figura 5. Curvas de supervivencia obtenidas para *L. monocytogenes* (□), *L. innocua* (■), *S. Typhimurium* (▲), *S. Enteritidis* (△), *E. coli* (●) y *E. coli* O157:H7 (○) al aplicar plasma generado a partir de aire a una velocidad de flujo de 15 l/min.

En la Figura 2 se muestran, a efectos comparativos, las gráficas de supervivencia obtenidas para todos los microorganismos estudiados en las condiciones de tratamiento más efectivas (aire, 15 l/min). Un tratamiento de 4 minutos consiguió reducir las poblaciones de *Salmonella* en 4 ciclos logarítmicos, mientras que las de *Listeria* y de *Escherichia* en tan sólo 2,5 ciclos logarítmicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Deng, X.T., Shi, J.J., Kong, M.G. 2006, Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. *IEEE Transactions on Plasma Science* 34:1310-1316.
- Fernández, A., Shearer, N., Wilson, D.R., Thompson, A. 2012, Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.*, 152:175-180.
- Hähnel, M., von Woedtke, T., Weltmann, K. 2010, Influence of the Air Humidity on the Reduction of *Bacillus* Spores in a defined environment at atmospheric pressure using a dielectric barrier surface discharge. *Plasma Process. Polym.*, 7:244-249.
- Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W. 2011, Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiol.*, 28:9-13.
- Laroussi, M., Leipold, F., 2004, Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int. J. Mass Spectrom.*, 233:81-86.
- Marsili, L., Espie, S., Anderson, J. G., MacGregor, S. J., 2002, Plasma inactivation of food-related microorganisms in liquids. *Radiat. Phys. Chem.*, 65:507-513.
- Niemira, B.A., 2012, Cold plasma reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on almonds using ambient pressure gases. *J. Food Sci.*, 77(3):171-175.
- Niemira, B. A., Sites, J., 2008, Cold plasma inactivates *Salmonella Stanley* and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on golden delicious apples. *J. Food Prot.*, 71:1357-1365.
- Noriega, E., Shama, G., Laca, A., Díaz, M., Kong, M. G., 2011, Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. *Food Microbiol.*, 28 (7):1293-1300.

Estudio de resistencia de diferentes esporos bacterianos a tratamientos de alta presión en combinación con temperatura

Miriam Chiquirrín, Sergio J. Ramos y Raquel Virto

Área de I+D+i, Nuevas Tecnologías de conservación, Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA).
Ctra. NA-134, Km. 53, 31570 San Adrián, Navarra, mchiquirrin@cna.es

Los tratamientos de Alta Presión a temperatura ambiente (HPP) son una tecnología eficaz para la pasteurización de determinados alimentos, pero este procesado no permite obtener productos estables a temperatura ambiente (Patterson y col., 2005). Para solventar esta limitación se ha combinado las HPP con el tratamiento térmico, denominándolo esterilización térmica por alta presión (HPTS). El objetivo principal fue cuantificar la influencia del pH, a_w y composición nutricional de los alimentos sobre la eficacia letal de los tratamientos combinados HPTS y definir la eficacia de los mismos en matrices alimentarias reales. Con este fin se seleccionaron diferentes especies de cepas bacterianas productoras de esporos, se inocularon en tampón citrato-fosfato de diferente pH y a_w , aplicándose 600 y 800 MPa a temperatura ambiente (20 °C) y a 80°C durante 0 a 10 minutos. Los microorganismos que mostraron mayor resistencia a los tratamientos fueron inoculados en un cultivo mixto y a su vez inoculados en diferentes alimentos. A continuación, fueron sometidos a tratamientos de 800 MPa a 80 y 90 °C durante 10 minutos. Los microorganismos que mostraron más resistencia a los tratamientos aplicados fueron: *B. stearothermophilus*, *Alicyclobacillus* DSMZ 2498, *C. sporogenes* y *B. amyloliquefaciens*. En estos microorganismos el tratamiento de 800 MPa a 80 °C durante 10 min consiguió entre 3-5 log de reducción en función del pH del medio de tratamiento. En el resto de especies estudiadas los niveles de inactivación fueron >6 log. La tecnología HPTS podría ser una alternativa prometedora para la inactivación de esporos bacterianos resistentes y la obtención de productos estables a temperatura ambiente.

INTRODUCCIÓN

La tecnología de Alta Presión (HPP) ha demostrado ser una tecnología eficaz para la pasteurización de determinados alimentos. Sin embargo, no permite obtener productos estables a temperatura ambiente debido a su incapacidad para inactivar esporos bacterianos (Patterson, 2005). La esterilización térmica por alta presión (HPTS) supone una oportunidad para los fabricantes de alimentos de obtener productos de baja acidez estables a temperatura ambiente con mejores características sensoriales (Sevenich y col., 2013). El objetivo principal de este estudio fue cuantificar la influencia de los principales factores intrínsecos de los alimentos (pH, a_w y composición nutricional) sobre la eficacia letal de los tratamientos HPTS y definir la eficacia de los mismos sobre diferente esporos bacterianos en matrices alimentarias reales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de las cepas y medios de cultivo. Se seleccionaron 8 cepas esporuladas con interés desde el punto de vista de la tecnología de los alimentos y de seguridad alimentaria. Siete cepas fueron obtenidas de la colección española de cultivos tipo (*Bacillus cereus* CECT 193, *Bacillus coagulans* CECT 12T, *Bacillus subtilis* CECT 38, *Bacillus licheniformis* CECT 20T, *Bacillus stearothermophilus* CECT 4517, *Clostridium sporogenes* CECT 553, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 493 y *Alicyclobacillus acidoterrestis* CECT 7094 y 5137) y una

cepa de la colección alemana *Alicyclobacillus acidoterrestis* (DSMZ 2498). Las suspensiones de esporos se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Margosch y col., 2006. En el caso de los *Bacillus* se usó ST1, excepto en *B. stearothermophilus* que se usó TSA. Para *Clostridium* se usó RCM y para *Alicyclobacillus* YSG, a las temperaturas óptimas de crecimiento de cada microorganismo. A continuación, se recuperaron los esporos bacterianos y se resuspendieron en un tampón a pH 6,4. Las suspensiones se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Preparación de muestras

-Inoculación de las suspensiones de esporos en tampón citrato-fosfato. Una vez preparadas las suspensiones de trabajo, éstas fueron inoculadas en tampón citrato-fosfato de diferente pH (7,0 y 4,0) y a_w 0,99.

-Inoculación de un cultivo mixto en diferentes alimentos. Con los esporos más resistentes se preparó un cultivo mixto ($\sim 10^9$ UFC/ml) que se inoculó en diferentes alimentos: zumo de naranja, salsa de tomate, gazpacho, crema de verduras, caldo de verduras, caldo de pollo, bifritas, leche, nata y salsa pesto.

Tratamientos de HPP y HPTS. Se llevaron a cabo tratamientos de 600 y 800 MPa a 20 y 80°C durante 0 a 10 min sobre las muestras tampón y de 800 MPa a 80 y 90 °C durante 10 min en alimentos reales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tratamientos aplicados en las muestras de tampón citrato-fosfato

Tratamientos de HPP

Los tratamientos HPP (600 y 800 MPa a temperatura ambiente (20 °C, 10 minutos) únicamente

consiguieron niveles de reducción de cómo máximo 2 log en todas las especies esporuladas, independientemente de la intensidad y tiempo de tratamiento.

Tratamientos HPTS

En los tratamientos HPTS, a mayor presión y mayor temperatura los niveles de inactivación fueron superiores. La inactivación conseguida fue mayor a pH ácido en todos los esporos estudiados, independientemente de la intensidad y tiempo de tratamiento. Las Tablas 1 y 2 muestran los microorganismos que mostraron más resistencia y los resultados más relevantes de los tratamientos de HPTS. En el resto de especies estudiadas los niveles de inactivación fueron >6 log.

Tabla 1: Tratamiento de 800 MPa/10 minutos a 80°C en tampón citrato-fosfato a pH=4.

MICROORGANISMOS	Nivel de inoculación Log (UFC/ml)	Ciclos de inactivación log (N _t /N ₀)
<i>B.stearothermophilus</i>	7,18	-6,18
<i>Alycyclobacillus</i> CECT 2498	7,90	-6,60
<i>C. sporogenes</i>	9,85	-7,01
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7,00	-6,00

Tabla 2: Tratamiento de 800 MPa/10 minutos a 80°C en tampón citrato-fosfato a pH=7.

MICROORGANISMOS	Nivel de inoculación Log (UFC/ml)	Ciclos de inactivación log (N _t /N ₀)
<i>B.stearothermophilus</i>	7,18	-6,18
<i>Alycyclobacillus</i> CECT 2498	7,90	-6,00
<i>C. sporogenes</i>	9,85	-4,00
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7,00	-5,81

Tratamientos aplicados en las muestras de alimentos (cultivo mixto)

En este apartado se evaluó la influencia de la composición del medio en la resistencia a los tratamientos HPTS aplicados.

El tratamiento a 800 MPa y 80 °C durante 10 minutos consiguió alcanzar los niveles perseguidos de inactivación (> 5 log) en los alimentos de pH ácido. En el caso de la nata no se observó, como algunos artículos indican (Cheftel y col., 1995), un efecto protector de la grasa obteniéndose niveles de inactivación similares que en un alimento del mismo pH y menor contenido graso como la leche (4 log). Por el contrario, en el caso de la salsa pesto, con a_w más baja (0,95), los niveles de inactivación fueron menores con respecto a los obtenidos en un producto de pH similar (pH 4,3) y mayor a_w (0,98) (p. ej. salsa de tomate), obteniéndose 4,3 y 5,8 log de inactivación respectivamente.

Tabla 3: Tratamiento de 800 MPa/10 minutos a 80°C en diferentes alimentos inoculados con cultivo mixto (~10⁹ UFC/ml)

ALIMENTOS	pH y a _w	Log (N _t /N ₀)
Zumo de Naranja	3,72-0,988	-6,48
Salsa de tomate	4,25-0,983	-5,64
Gazpacho	3,99-0,987	-5,05
Crema de Verduras	5,08-0,986	-4,95
Caldo de verduras	6,1-0,989	-4,74
Caldo de pollo	5,18-0,988	-5,16
Bifrutas	3,59-0,984	-5,60
Leche	6,64-0,986	-5,19
Nata	6,56-0,984	-4,75
Salsa Pesto standard	4,48-0,955	-4,30

Tabla 4: Tratamiento de 800 MPa/10 minutos a 90°C en diferentes alimentos inoculados con cultivo mixto (~10⁹ UFC/ml)

ALIMENTOS	pH y a _w	Log (N _t /N ₀)
Zumo de Naranja	3,72-0,988	-8,00
Salsa de tomate	4,25-0,983	-8,00
Gazpacho	3,99-0,987	-8,00
Crema de Verduras	5,08-0,986	-8,00
Caldo de verduras	6,1-0,989	-7,40
Caldo de pollo	5,18-0,988	-7,15
Bifrutas	3,59-0,984	-8,00
Leche	6,64-0,986	-8,00
Nata	6,56-0,984	-8,00
Salsa Pesto standard	4,48-0,955	-7,40

El aumento de la temperatura hasta 90°C permitió cumplir con el nivel de inactivación establecido en alimentos ácidos y no ácidos, puesto que en todos los casos se obtuvieron recuentos inferiores al límite de detección (< 10 UFC/mL.).

Los resultados de este estudio demuestran que la tecnología HPTS podría ser una alternativa prometedora para la inactivación de esporos bacterianos resistentes y la obtención de productos estables a temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Patterson M.F. 2005, Microbiology of pressure-treated foods. J. Appl. Microbiol., 98:1400-1409.
- Sevenich R., Bark, F., Crews C., Anderson, W., Riddellova, K., Hradecky, J., Moravcova, E., Reineke K., Knorr D. 2013, Effect of high pressure thermal sterilization on the formation of food processing contaminants. Int. J. Food Eng., 20:42-50.
- Cheftel J.C. 1995, Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. Food Sci. Technol. Int., 1:75-90.

Bioconservación de filete de pescado *Oreochromis niloticus* “Tilapia del Nilo” mediante el tratamiento combinado de Nisina y Ácido láctico

Juan Carlos Ramos Gorbeña, Gloria Varillas Moreno, Diana Zevallos Laor, David Enrique Reyes, Karen Lau Alarcon

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Perú, carlos.ramosg@urp.pe

La nisina es una alternativa para la bioconservación de alimentos, lo cual ofrece la posibilidad de utilizarse en la inhibición del crecimiento de bacterias indicadoras de inocuidad. Por lo cual en este trabajo la combinación de Nisina más Ácido láctico presenta mejores resultados reduciendo el número de microorganismos indicadores de la inocuidad. Mediante este trabajo de investigación se buscó obtener la concentración óptima para los diferentes tratamientos de Nisina, Ácido láctico y la combinación de Ácido láctico más Nisina en filete de pescado *Oreochromis niloticus* “Tilapia del Nilo” en distintas concentraciones. Evaluamos la reducción del número de Mesófilos Aerobios Totales (MAT), Coliformes Totales (CT) y *Escherichia coli* (EC) como principales indicadores de inocuidad alimentaria utilizando la metodología de la AOAC Internacional para el recuento de microorganismos en Láminas Petrifilm 3M. Los resultados muestran que el tratamiento del control, ácido láctico, nisina y combinación de ambos en concentración de 0,5% a las 24 horas para Coliformes Totales, (CT) fueron 6×10^4 , 1×10^3 , 8×10^4 y 2×10^2 UFC/mL respectivamente; para Mesófilos Aerobios Totales (MAT) fueron 3×10^5 , 3×10^4 , 1×10^4 y 2×10^3 UFC/mL respectivamente y para *Escherichia coli* (EC) fueron 3×10^2 , Ausencia, 3×10^2 y Ausencia UFC/mL respectivamente. En la presente investigación se determinó la reducción de los microorganismos indicadores de la inocuidad utilizando Nisina, Ácido láctico y Ácido láctico más Nisina como una alternativa de barrera para garantizar la inocuidad alimentaria.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas y los productos de su metabolismo han sido consumidos, desde tiempos prehistóricos, a través de los alimentos fermentados. Esta circunstancia, unida al hecho de que sólo muy raramente se les ha asociado a procesos patológicos (Gasser, 1994), ha contribuido a su designación como bacterias “seguras” o denominadas GRAS (Generally Recognized As Safe).

Dentro de las bacteriocinas destaca la Nisina, polipéptido que presenta actividad de bioconservador natural para los alimentos con una alta eficiencia y no presenta toxicidad. Es eficaz contra una amplia gama de bacterias grampositivas, particularmente contra las que producen esporas resistentes al calor. Inhibe ciertas cepas de patógenos en los alimentos, como *Clostridium sp.*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearothermophilus* entre otros; no tiene ningún efecto contra bacterias gramnegativas, levaduras ni mohos. Es utilizada en numerosos procesos térmicos en alimentos, aplicaciones para enlatados, queso fresco, huevo líquido, leche pasteurizada y saborizada, bebidas, quesos procesados, otros derivados lácteos, productos fermentados, productos cárnicos, sopas instantáneas, alimentos de origen vegetal, etc., además de incrementar de manera significativa el tiempo de vida del producto.

La nisina está autorizada como bioconservante alimentario en la Unión Europea por la Directiva 95/2/(CE) sobre aditivos alimentarios diferentes a los colorantes y los edulcorantes.

La bioconservación que produce la nisina en diferentes productos alimenticios nos ha llevado a utilizarla en un producto hidrobiológico como es el caso del filete de pescado, donde los indicadores de higiene han sido tomados como parámetros referenciales para medir su efectividad como una buena barrera de protección que asegure su inocuidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio Piloto de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, y contaron con las siguientes etapas:

Recolección y almacenamiento de las muestras. Las muestras de filete de pescado fueron adquiridas del Terminal Pesquero de Ventanilla Lima (Perú), colocadas en bolsas de polipropileno y transportadas en caja refrigerada a 4°C hasta el laboratorio para su análisis respectivo.

Procesamiento de las muestras. Las muestras de filete de pescado fueron distribuidas en recipientes individuales que contenían concentraciones diferentes de nisina al 0.5%, 1% y 1.5% respectivamente, tres recipientes para cada concentración de nisina donde se realizó los recuentos bacterianos a las 24 horas de sembradas en las placas Petrifilm 3M correspondiente para el recuento de Coliformes Totales, *E. coli* y Aerobios Mesófilos Totales e

incubadas a 35°C ± 1°C para su posterior lectura, del mismo modo para las concentraciones diferentes de ácido láctico al 0.5%, 1% y 1.5% respectivamente, tres recipientes para cada concentración de ácido láctico donde se realizó los recuentos bacterianos a las 24 horas en las placas Petrifilm 3M correspondiente para el recuento Coliformes Totales, *E. coli* y Aerobios Mesófilos Totales e incubadas a 35°C ± 1°C para su posterior lectura, y para el tratamiento de la combinación de nisina más ácido láctico se procedió con el mismo criterio de distribución en recipientes diferentes para cada concentración 0.5%, 1% y 1.5% donde se realizó los recuentos bacterianos a las 24 horas en las placas Petrifilm 3M correspondiente para recuento de Coliformes Totales, *E. coli* y Aerobios Mesófilos Totales e incubadas a 35°C ± 1°C para su posterior lectura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el tratamiento del control, ácido láctico, nisina y combinación de ambos en concentración de 0,5% a las 24 horas para Coliformes Totales, (CT) fueron 6x10⁴, 1x10³, 8x10⁴ y 2x10² UFC/mL respectivamente; para Mesófilos Aerobios Totales (MAT) fueron 3x10⁵, 3x10⁴, 1x10⁴ y 2x10³ UFC/mL respectivamente y para *Escherichia coli* (EC) fueron 3x10², Ausencia, 3x10² y Ausencia UFC/mL respectivamente. (Tabla 1).

Tabla 1:

MO	TRATAMIENTOS 24 horas			
	TTC	TTAL 0,5%	TTN 0,5%	TTAL+N 0,5%
CT	6x10 ⁴	1x10 ³	8x10 ⁴	2x10 ²
MAT	3X10 ⁵	3X10 ⁴	1X10 ⁴	2X10 ³
EC	3X10 ²	Ausencia	3x10 ²	Ausencia

MO: Microorganismos
 TTC: tratamiento Control
 TTAL: Tratamiento Acido Láctico
 TTN: Tratamiento Nisina
 TTAL+N: Tratamiento Acido Láctico + Nisina
 MAT: Mesofilos Aerobio Totales
 CT: Coliformes Totales
 EC: *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos para el recuento de CT con TTAL y TTAL+N expresan una reducción en comparación con el TTC y TTN; luego, el recuento de MAT se puede apreciar que los resultados demuestran una reducción progresiva con los diferentes tratamientos, siendo el más efectivo el TTAL+N, donde la sinergia de ambos compuestos, ácido láctico y nisina, permiten eliminar a bacterias grampositivas y gramnegativas y así mismo, para el recuento de EC son tan efectivos el TTAL y TTAL+N manifestando su ausencia durante los recuentos. (Figura 1).

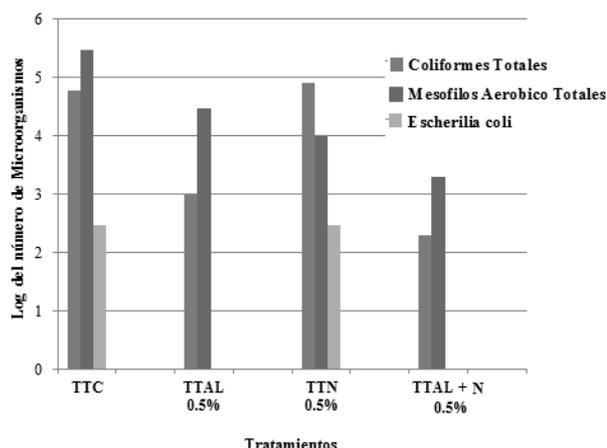
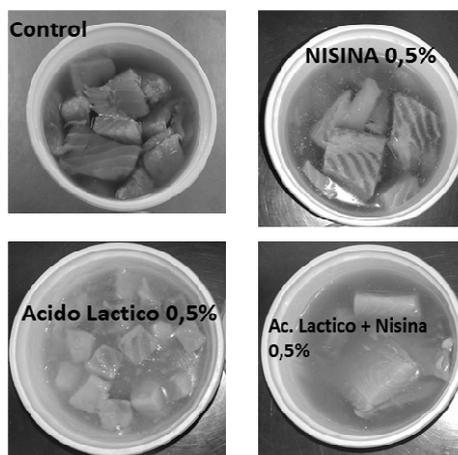


Figura 1: Recuento de Coliformes Totales, Mesofilos Aerobios Totales y *E. coli*.

Finalmente los tratamientos aplicados TTAL, TTN Y TTAL+N sobre los filetes de pescados ejercían modificaciones organolépticas, siendo el TTN el que no modificaba las características propias del filete estudiado, pero el recuento de microorganismos no evidenciaba reducción comparado con el TTAL+N donde las modificaciones organolépticas son mínimas en comparación con el TTC y TTN, pero la reducción de microorganismos es evidentemente efectiva. (Fotografía 1, 2, 3, 4)



BIBLIOGRAFÍA

Caplice E., Fitzgerald, F. 1999, Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food Microbiol. 50:131-149.
 Daeschel, M. 1989, Antibacterial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43:164-167.
 Deegan, L., Cotter D., Hill C., Ross, P. 2006, Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16:1058-1071.

Cinéticas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en queso curado de oveja en diferentes condiciones de almacenamiento

David Rodríguez Lázaro^{1,2}, Marta Hernández¹, Patricia González García¹, Antonio Valero³

¹ Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Valladolid, España. rodlazda@gmail.com

² Área de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos, España

³ Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, España

El queso curado de oveja producido en Castilla y León representa un queso tradicional madurado durante 3-6 meses. *Listeria monocytogenes* puede representar un problema de salud para consumidores susceptibles. El objetivo de este estudio fue la evaluación de la supervivencia de este patógeno en queso curado de oveja en diferentes condiciones. Se adaptaron modelos logarítmicos con hombro tipo Weibull a los datos obtenidos para estimar los parámetros cinéticos. Se empleó la relación de Arrhenius para predecir el impacto de la temperatura en el comportamiento de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento a 4, 12 y 22°C. Además, se evaluó el crecimiento de las bacterias ácido lácticas como un grupo representativo de la microbiota indígena de este tipo de queso. Los resultados obtenidos indican que el tiempo para la erradicación (tiempo cuando se observa la total ausencia de *Listeria monocytogenes* en las muestras analizadas) fue de 114, 104, y 77 días para quesos almacenados a 4, 12 y 22°C, respectivamente. La población de bacterias ácido lácticas mostró un incremento paulatino a 12 y 22°C durante todo el período de almacenamiento, pero sin embargo, éste sólo fue de 1 log UFC/g durante las primeras 2 semanas independientemente de la temperatura al que el queso fuese almacenado. El modelo logarítmico con hombro mostró una buena adaptación a los resultados. Por otro lado, la relación de Arrhenius pudo explicar la dependencia de la temperatura en el comportamiento de *Listeria monocytogenes*. Este estudio ha demostrado que el almacenamiento a temperatura ambiente puede preservar las propiedades de calidad del producto así como su seguridad respecto a *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la supervivencia de *L. monocytogenes* en queso de leche cruda de oveja curado en diferentes temperaturas de almacenamiento. Se construyeron modelos de supervivencia no lineales a partir de los datos observados con el fin de los parámetros cinéticos y predecir el el impacto de la temperatura sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento. Además, se estudio el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) como un grupo representativo de la microbiota indígena.

MATERIAL Y MÉTODOS

Queso. Este tipo de queso contiene una alta concentración de grasa (aproximadamente 37%) y más de 24% de proteína. La vida útil de las porciones comerciales de este tipo de productos oscila entre 1 y 3 meses.

Cepas bacterianas. Se utilizaron 3 cepas en este estudio: dos aisladas de quesos curados de leche cruda de oveja por el ITACyL y una cepa de una granja de ovejas en Irlanda.

Contaminación artificial de las muestras de queso y almacenamiento. Las muestras de 25 g se inocularon con 100 µl de PBS que contenía 10⁴ UFC/g de *L. monocytogenes* en 10 áreas diferentes de la superficie, permitiendo secarse, se envasó a vacío y se almacenaron a tres temperaturas diferentes (4, 12 y 22 °C).

Análisis microbiológico. Los estudios microbiológicos sobre la presencia y la enumeración de *L. monocytogenes* se llevaron a siguiendo las normas ISO 11290-1e ISO 11290-2, respectivamente. Para las condiciones de conservación se definió el "tiempo de erradicación", como el tiempo en que todas las muestras dieron negativo empleando la ISO 11290-1. En paralelo se realizó la enumeración de las bacterias ácido lácticas (BAL) empelando la norma ISO 15214.

Procesado de los datos y desarrollo del modelo

Modelos primarios

Se seleccionó el modelo primario de Baranyi para el ajuste a los datos observados de crecimiento de BAL en las muestras de queso analizadas. Se calcularon los parámetros cinéticos fase de latencia (lag, d) y tasa máxima de crecimiento (μ_{max} , d⁻¹). Para el desarrollo del modelo de inactivación se evaluaron dos tipos de ecuaciones:

i) Modelo log-lineal con hombro (Geeraerd y col., 2005) que contempla una fase de adaptación inicial antes de que suceda la inactivación:

$$N = N_0 \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \frac{e^{k_{max} \cdot Sl} \cdot Sl}{1 + (e^{k_{max} \cdot Sl} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}} \quad \text{ec. 1}$$

donde N es la concentración microbiana (UFC/g) a un determinado valor de tiempo t (d), N_0 es la concentración inicial (UFC/g), k_{max} es la tasa máxima de inactivación (d⁻¹), y Sl es la duración de la fase hombro (d).

ii) Modelo Weibull:

$$\log_{10} N(t) = \log_{10} N_0 - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad \text{ec. 2}$$

donde δ es el tiempo necesario para la primera reducción decimal (d) y p es un parámetro de forma.

Para el ajuste de los modelos de inactivación a los datos observados, se utilizó el complemento para Excel GINaFit v1.6.

Modelos secundarios

Para el cálculo de la inactivación a las diferentes temperaturas de almacenamiento, se utilizó la relación entre el parámetro de escala del modelo Weibull (α) y la temperatura a través del uso de la ecuación de Arrhenius:

$$\alpha_T = \alpha_{T_{ref}} \cdot e^{\frac{Ea \cdot (T_{ref}-T)}{Rg \cdot T_{ref} \cdot T}} \quad \text{ec.3}$$

donde α_T es el valor α a la temperatura T (°K), $\alpha_{T_{ref}}$ es el valor α a la temperatura constante de referencia, T_{ref} , Ea es la energía de activación (J/ mol), y R_g es la constante universal de los gases, 8.314 J/(mol·K). La temperatura de referencia utilizada fue de 283.15 °K.

Si se considera como variable dependiente el ratio de reducción; $N(t)/N_0$, el modelo desarrollado permite conocer la reducción a otras temperaturas intermedias de almacenamiento. Si se combinan las ecuaciones 2 y 3 se obtiene (Angelidis y col., 2013):

$$\log \frac{N_t}{N_0} = - \left(\frac{t}{\alpha_{T_{ref}} \cdot e^{\frac{Ea \cdot (T_{ref}-T)}{Rg \cdot T_{ref} \cdot T}}} \right)^\beta \quad \text{ec.4}$$

Se siguió un procedimiento de regresión no lineal en R v2.15.3 para la obtención de los parámetros cinéticos.

Finalmente se estableció una relación lineal entre el parámetro β y la temperatura

$$\beta = -(a \cdot T) + b \quad \text{ec.5}$$

Análisis estadístico. Los valores del coeficiente de correlación (R^2) y el error cuadrático medio (MSE) se utilizaron para evaluar la bondad de ajuste de los modelos. Paralelamente se realizaron análisis de varianza mediante el software Statistica v10, considerando un nivel de confianza del 95%. Para evaluar y comparar los modelos ajustados entre sí se utilizó el criterio de información de Akaike corregido (AIC_C). Finalmente se utilizó el test F de Fischer para determinar el grado de aceptabilidad del ajuste de los modelos ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento a 4, 12 y 22 ° C

Se observó un patrón no lineal de supervivencia que se desvía de las cinéticas lineales tradicionales (Figura 1). Las curvas de supervivencia se caracterizaron por la presencia de una región de hombro seguido de una caída lineal más pronunciada a temperaturas más altas. Los parámetros cinéticos estimados tanto para el modelo log-lineal con hombro como para el modelo Weibull log- se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

°C)	Log linear shoulder			Weibull		
	SI (d)	$k_{max}(d^{-1})$	N_0 (logCFU/g)	δ	p	N_0 (logCFU/g)
4	59.19±2.36	0.16±0.01	4.08±0.06	73.07±1.45	3.30±0.17	4.15±0.04
12	50.47±3.60	0.15±0.01	3.95±0.09	65.07±2.36	3.03±0.26	4.01±0.07
22	36.27±3.86	0.20±0.03	3.85±0.13	45.25±3.22	2.65±0.39	3.97±0.13

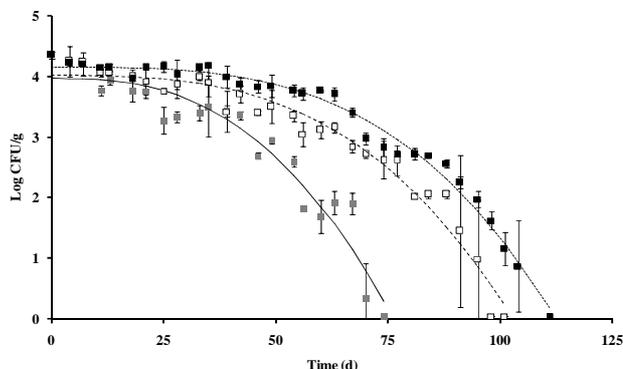


Figura 1. Estimación del modelo de Weibull para (log CFU/g ±SD) en queso curado de oveja a 4 (■), 12(□) y 22°C (○). Se muestran los modelos ajustados para 4 (•••), 12(- - -) y 22°C (—).

La adecuación del modelo primario ajustado fue evaluada mediante la prueba F-test. La bondad de ajuste fue satisfactorio en el caso del modelo de Weibull a las tres temperaturas de almacenamiento probados, mientras que para el modelo log-lineal con hombro falló para 22 ° C.

El tiempo para la erradicación fue de 114, 104, y 77 días para las muestras de queso almacenadas a 4, 12 y 22 ° C, respectivamente. La población de *L. monocytogenes* permaneció relativamente estable durante al menos 6 semanas, independientemente de la temperatura de almacenamiento: (reducciones de 0,99, 1 y 0,95 log UFC/g después de 42, 54 y 67 días a 22 12 y 4 ° C, respectivamente) (Figura 1). Después de 6 semanas de almacenamiento, la población comenzó a comportarse de manera diferente. A 22 ° C, se observó una reducción de 1.76 log UFC/g en el día 54, y después la disminución fue rápida: reducción de 2,45 log UFC/g en el día 67, y de 4,02 log UFC/g en el día 70 y sólo únicamente presencia en el día 74. Sin embargo, la reducción fue más lenta en muestras almacenadas a 4 y 12 ° C. A 12 ° C, se observó una reducción de 1,74 log UFC/g después de 77 días de almacenamiento, de 2,90 log UFC/g en el día 91, y únicamente la presencia de *L. monocytogenes* en el día 98. Finalmente a 4 ° C, la reducción fue aún más lenta: reducción de 2,10 log UFC/g después de 91 días de almacenamiento, y de 3,19 log UFC/g en el día 101, y únicamente su presencia en el día 111.

Agradecimientos. Proyecto BASELINE, dentro del VII Programa Marco Europeo de Investigación. Proyecto RTA RTA2011-079-C02-01

Efecto de la pasteurización del buey de mar (*Cancer pagurus*) en el seno de un campo ultrasónico

Santiago Condon-Abanto¹, Federico Lian², C. Arroyo, N. Brunton, P. Whyte y J.G. Lyng

¹School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Ireland. Santiago.condon-abanto@ucdconnect.ie

Europa es una gran consumidora de marisco siendo el buey de mar (*Cancer pagurus*) uno de los productos más apreciados. Los derivados del buey de mar procesados, refrigerados y de larga vida útil (REPFED) son considerados los de mayor proyección a medio plazo. Esta investigación estudia la posibilidad de prolongar la vida útil de los productos y/o acortar los tiempos de procesamiento mediante la aplicación de los tratamientos térmicos en el seno de un campo ultrasónico. Los resultados obtenidos demuestran que un mismo tiempo de tratamiento permitiría prolongar un 30% aproximadamente la vida útil del producto, o reducir aproximadamente 4 veces el tiempo de procesamiento.

INTRODUCCIÓN

Los mariscos son muy consumidos en los países europeos y, entre ellos, el buey de mar (*Cancer pagurus*) es uno de los más apreciados. Aunque hasta hace unos pocos años el buey de mar se comercializaba vivo, la tendencia actual es producir derivados procesados, refrigerados y de larga vida útil (REPFED), considerándose estos los de mayor proyección a medio plazo.

Irlanda, con unas capturas de en torno a las 11.000 toneladas anuales de buey de mar, es el segundo mayor productor europeo de este tipo de productos, por lo que la industria irlandesa está muy interesada en mejorar sus actuales procesos productivos.

El tratamiento térmico que la FDA (Food and drug administration) (FDA 2011) recomienda para el buey de mar REPFED es una pasteurización con una eficacia letal equivalente a 70 °C durante 2 minutos en el centro térmico del producto, asumiendo un valor z de 7,5 °C. Desafortunadamente la forma y composición del caparazón del buey de mar dificulta mucho la penetración de calor, lo que alarga el proceso y confiere una vida útil relativamente corta.

Nuestra hipótesis de trabajo es que al aplicar el tratamiento térmico en el seno de un campo ultrasónico conseguiría aumentar la eficacia bactericida del tratamiento.

El objetivo de esta investigación ha sido comparar la vida útil a distintas temperaturas de almacenamiento de buey de mar pasteurizado por el procedimiento tradicional con el procesado por calor en el seno de un campo ultrasónico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aplicación de los tratamientos térmicos. Los tratamientos térmicos se aplicaron sumergiendo los cangrejos, previamente eutanasiados, en un baño termostático (Guyson KS MK3 525) que tiene instalados en su base inferior 18 transductores ultrasónicos del tipo M300.

Preparación y almacenamiento de las muestras. Los cangrejos se trataron con/sin ultrasonidos a una temperatura de régimen de 75 °C, durante 45 min. Tras los tratamientos se abrió el caparazón en condiciones asépticas, se colocaron muestras de 5 g en bolsas y se envasaron a vacío (Webo C10H modelo 0210DC681; Irlanda). Las bolsas se incubaron a 4, 7 y 10 °C hasta su uso.

Análisis microbiológico de las muestras. Periódicamente se extrajeron muestras de las estufas de refrigeración y, tras la apertura aséptica de las bolsas, se procedió a la evaluación de la carga microbiana. Los 5 g de muestra se diluyeron en 45 mL de "Maxium Recovery Diluent" (MRD, Oxoid UK) y se homogeneizaron en un stomacher (Mod. 400, Seward laboratory system, UK) durante 2 min a 300rpm. Tras diluir las muestras en MRD se sembraron por homogenización en masa en agar Lyngby e incubaron a 30° durante 24-48 horas. Los resultados se expresaron como logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (logUFC/gr).

Modelización de las curvas de crecimiento. Para la modelización matemática de las curvas de crecimientos, se utilizó la ecuación de Gompertz modificada por Zwietering (1990).

$$\text{Log } N = A + C \times e^{-[2.71 \times (Rg/C) \times (t_{lag} - t) + 1]}$$

donde N es el recuento en el tiempo t , A la contaminación inicial, C los ciclos de crecimiento máximos, Rg la velocidad máxima de duplicación, y t_{lag} la duración de la fase de latencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo los bueyes de mar fueron sometidos a un tratamiento térmico equivalente al recomendado por la FDA, en presencia y ausencia de un campo ultrasónico.

Para calcular los tiempos de procesamiento se elaboró la curva de penetración de calor de los crustáceos y posteriormente se ajustó con la ecuación de Ball y Olson. A partir de las ecuaciones obtenidas se estableció un tiempo de permanencia de 45 minutos a la temperatura de pasteurización (75 °C). Este tiempo

de tratamiento garantizó que el centro térmico del producto recibiera el valor $F_{70}^{7.5} = 2$ min recomendado por la FDA.

Tras la realización de los correspondientes recuentos se modelizaron las curvas de crecimiento, para cada condición de tratamiento (con/sin ultrasonidos) y temperatura de almacenamiento, con el modelo de Gompertz modificado. La tabla 1 muestra los parámetros de la ecuación obtenidos con el modelo. También se incluye el valor R^2 para ilustrar la bondad de los ajustes.

Tabla 1: Parámetros de crecimiento de la flora de buey de mar tratado en distintas condiciones y almacenado a diferentes temperaturas.

Tª	4°C	7°C	10°C	4°C	7°C	10°C
US	Si	Si	Si	NO	NO	NO
A	0.9563	0.9496	0.9528	0.9540	0.8969	0.9450
C	7.0000	7.0000	6.7880	7.3624	6.7865	7.0000
Rg	0.37	0.8296	0.8000	0.50	0.7336	0.8824
tlag	12.0000	6.0476	4.4141	7.8452	2.0309	2.4781
R²	0.8656	0.9218	0.8320	0.9825	0.9067	0.9882

Como se observa en la tabla, tanto los recuentos iniciales como los ciclos máximos de aumento de la población son similares, tanto en los tratados como en los no tratados con ultrasonidos, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Al comparar las velocidades máximas de duplicación se observa que son muy similares en los almacenados a 7 y 10 °C, mientras que a 4 °C se reduce a la mitad. También la duración de las fases de latencia a 7 y 10 °C es semejante, mientras que a 4°C es mucho mayor.

Por lo que respecta a los efectos del campo ultrasónico, la tabla 1 demuestra que su aplicación apenas influye en la velocidad de duplicación, cualquiera que sea la temperatura de almacenamiento, mientras que determina en gran medida la duración de la fase de latencia.

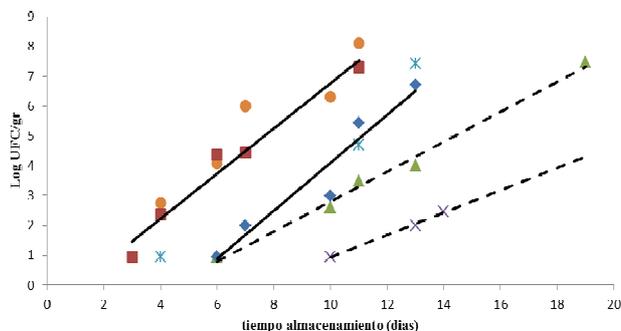


Figura 1: Tramo lineal de las curvas de crecimiento de aerobios mesófilos totales de las muestras tratadas con/sin ultrasonido, almacenadas a diferentes temperaturas: (●)10°C/US; (■)7°C/US; (◆)10°C/sinUS; (★)7°C/sinUS; (▲)4°C/US; (×)4°C/sinUS

Por otro lado, la figura 1 muestra el tramo de crecimiento exponencial de los aerobios mesófilos aislados en los crustáceos procesados en las dos condiciones y almacenados a diferentes temperaturas, e ilustra las afirmaciones anteriores y sus rectas de regresión permiten calcular con facilidad la vida útil del producto en las condiciones ensayadas.

Para establecer la vida útil del producto se optó por seguir las recomendaciones internacionales para la carne de cangrejo cocinada y refrigerada (ICMSF, 1986): un recuento máximo de aerobios mesófilos inferior a 6 ciclos logarítmicos.

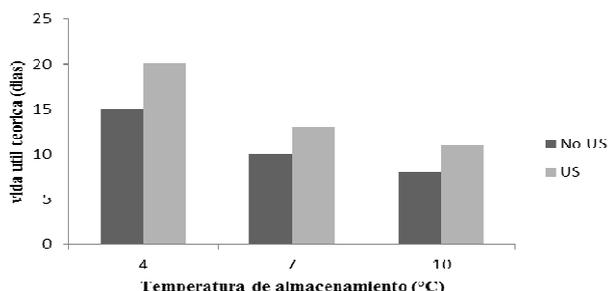


Figura 2: Vida útil estimada para bueyes de mar pasteurizados en el seno de un campo ultrasónico (gris claro) y en una cuba tradicional sin US (gris oscuro).

Los tiempos de vida útil estimados se resumen en la figura 2. Como se observa, la aplicación de un campo ultrasónico aumenta la vida útil del producto un 30 % aproximadamente, a todas las temperaturas de almacenamiento.

Nuestra investigación permite concluir que la pasteurización de los bueyes de mar en el seno de un campo ultrasónico podría constituir una alternativa ventajosa para el procesamiento de este crustáceo al observarse un aumento en la vida útil. Queda por estudiar cual es el posible mecanismo de acción.

BIBLIOGRAFÍA

M.H Zwietering, I Jongenberger, F.M Roubouts, Kvan't Riet. 1990, Modelling of bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol., 56, pp. 1875–1881.

FDA (2011). "Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, fourth ed. Technical Report. U.S .Department of Health and Human Services."

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).(1986). Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto Press (2nd ed.). Toronto: Blackwell Sscientific Publications.

Efecto del Dimetil dicarbonato en la resistencia de *Escherichia coli* a un tratamiento combinado de luz ultravioleta y calor en zumo de manzana

Maria Gouma, Elisa Gayán, Ignacio Álvarez, Santiago Condón

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, scondon@unizar.es

En esta investigación, se trató un zumo de manzana comercial, inoculado con *E. coli* con luz ultravioleta, calor (55 °C) y dimetil dicarbonato (25, 50 y 75 mg/L), tanto por separado como en combinación, con el fin de diseñar un proceso combinado con efectos letales sinérgicos. La eficacia bactericida de cada uno de los tratamientos por separado fue de 1,22, 2,91 y 0,06 ciclos logarítmicos de inactivación con luz UV, calor y DMDC (75 mg/L), respectivamente. Por el contrario, todas las combinaciones investigadas mostraron un efecto letal sinérgico. Fue posible garantizar más de 5 ciclos logarítmicos de inactivación tras 2,2, 2,7 y 3,6 min cuando se combinaron luz UV, calor (55 °C) y DMDC en concentraciones de 75, 50 y 25 mg/L, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli O157:H7 ha sido relacionado en diferentes ocasiones con toxiinfecciones producidas por el consumo de zumo de manzana, motivo por el que se ha recomendado la pasteurización térmica de los zumos para garantizar al menos 5 ciclos logarítmicos de inactivación de las especies patógenas vehiculadas por el producto (FDA, 2001). Sin embargo, los efectos adversos del calor sobre la calidad nutricional y sensorial de los zumos han impulsado la búsqueda de tecnologías no térmicas para su procesado. Entre estas tecnologías no térmicas destaca la luz ultravioleta. Desafortunadamente, la eficacia bactericida de la luz UV disminuye mucho con la turbidez y el coeficiente de absorción, lo que limita su utilización en la industria alimentaria. Para paliar el problema se ha sugerido la posibilidad de diseñar procesos combinados que potencien la eficacia bactericida de la radiación ultravioleta. De los datos publicados puede deducirse que la eficacia de los tratamientos UV podría aumentarse aplicando simultáneamente algunos agentes antimicrobianos.

El dimetil dicarbonato (DMDC) es un antimicrobiano de amplio espectro que se utiliza principalmente para inhibir el deterioro causado por el desarrollo de levaduras, sobre las que resulta ser muy activo, sin dejar residuos tóxicos. Aunque sus efectos contra las levaduras en las bebidas alcohólicas está bien documentado, apenas hay datos sobre su eficacia bactericida en los zumos de frutas, y no existe ninguno sobre sus efectos en combinación con la luz ultravioleta.

El objetivo de este estudio fue diseñar un proceso combinado de luz UV, temperaturas moderadas y DMDC capaz de garantizar 5 cinco ciclos logarítmicos de inactivación de *Escherichia coli* en zumo de manzana.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se realizaron con *Escherichia coli* CECT 4201 debido a que trabajos previos demostraron que era la cepa más resistente a la luz UV de entre las investigadas (Gayán y col., 2011). Las suspensiones de trabajo se obtuvieron en caldo triptona soja (Biolife, Italia) enriquecido con un 0,6% de extracto de levadura (Biolife), incubando durante 24 horas a 35 °C. Como medio de tratamiento, se utilizó zumo de manzana comercial esterilizado (Pascual, España). El zumo presentaba un pH de 3,6, un coeficiente de absorción de 24,9 cm⁻¹ y una turbidez de 2,4 NTU. La solución de dimetil dicarbonato (DMDC) fue suministrada por Merk (≥99%; Merck, Darmstadt, Alemania). El DMDC se añadió al zumo de manzana hasta alcanzar unas concentraciones de 25, 50 y 75 mg/L.

Los tratamientos de UV se llevaron a cabo en un equipo diseñado en nuestro laboratorio, previamente descrito por Gayán y col. (2011). En esencia, el equipo consistía en ocho reactores de flujo anular conectados en serie. Cada reactor tubular de vidrio contenía una lámpara de UV (8W) enfundada en un tubo de cuarzo. El “gap” del espacio anular, por el que se hacía circular el zumo, era de 2 mm. Los reactores se hallaban montados en un baño de 90 L de capacidad, cuya temperatura se regulaba con ayuda de un baño termostático auxiliar.

Antes de cada experimento, el zumo de manzana se inoculaba con 10⁶ UFC/ml de *E. coli* y se le añadía la concentración correspondiente de DMDC. Posteriormente, se agitaba el zumo vigorosamente y se bombeaba, con ayuda de una bomba peristáltica (Ismatec, Alemania), a un caudal de 8,5 L/h. Una vez estabilizado el caudal, se tomaban muestras a la salida de cada reactor. Tras las correspondientes diluciones, las muestras se sembraban en agar triptona soja (Biolife) enriquecido con un 0,6% de extracto de levadura (Biolife), y se incubaban a 35 °C durante 24 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios previos demostraron el efecto sinérgico de los tratamientos combinados de UV y calor en la

inactivación de *E. coli* en zumo de manzana (Gayán y col., 2012). Estos estudios indicaron que la temperatura óptima de la combinación era próxima a los 55 °C. En esta investigación, se estudió el efecto de las combinaciones de distintas concentraciones de DMDC con 55 °C, de distintas concentraciones de DMDC con UV a temperatura ambiente, y de distintas concentraciones del antimicrobiano con el proceso combinado de UV y calor (UV-H) en las condiciones óptimas.

Como se observa en la figura 1, la eficacia bactericida del DMDC a una concentración de 75 mg/L, del calor a 55 °C o la luz UV, actuando por separado, produjeron 0,06, 2,91 y 1,22 ciclos logarítmicos de inactivación de la población de *E. coli*, tras el máximo tiempo de tratamiento investigado (3,58 minutos). La inactivación producida por la luz UV aumentó al combinarse con calor, corroborando investigaciones previas, y al combinarse con DMDC a una concentración de 75 mg/L. También la combinación de DMDC y calor potenció el efecto letal del tratamiento y, sobre todo, cuando se aplicaron las tres estrategias simultáneamente. Hay que destacar la ausencia de hombro en las gráficas de supervivencia obtenidas cuando se adicionó DMDC, a diferencia de lo observado en procesos combinados de luz UV y calor con este microorganismo (Figura 1).

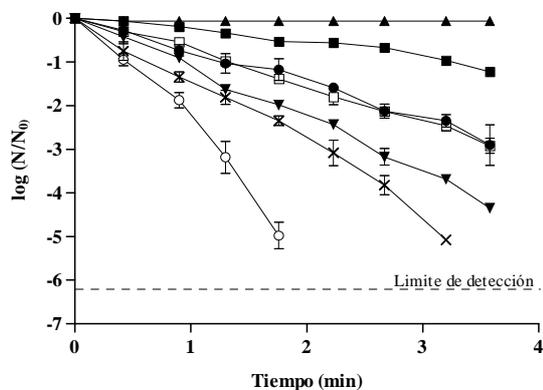


Figura 1: Curvas de supervivencia de *E. coli* CECT 4201 tratado por DMDC (75 mg/L) (▲), calor (55°C) (●), UV (■), 55°C+75 mg/L DMDC (▼), UV+55°C (×), UV+75 mg/L DMDC (□), UV+54°C+75mg/L DMDC (○).

La Tabla 1 ilustra el efecto de las combinaciones con distintas concentraciones de DMDC. La tabla incluye el máximo número de ciclos logarítmicos de inactivación obtenidos con distintos tiempos de procesado para todos los tratamientos aplicados. Los niveles de inactivación conseguidos con cada tratamiento aplicado de forma individual, incluso durante el máximo tiempo de tratamiento posible (3,58 min) fueron limitados, alcanzándose en el mejor de los casos casi 3 log₁₀ con el tratamiento térmico.

La adición de DMDC aumentó sinérgicamente el efecto letal del calor, siendo el efecto tanto mayor cuanto mayor fue la concentración de desinfectante añadido. La adición de 75 mg/ml de DMDC permitió reducir la población de *E. coli* 4,4 ciclos logarítmicos tras un tratamiento de 3,6 minutos a 55°C. Cuando se añadió la misma concentración de DMDC y se aplicó la radiación UV, el nivel final de inactivación llegó a los 2,9 ciclos logarítmicos. En ambos procesos combinados, el efecto bactericida aumentó con la concentración de DMDC. En cualquier caso, el máximo efecto bactericida se consiguió al combinar los tres agentes bactericidas: la aplicación de radiación ultravioleta y calor a un zumo con 50 mg/L de DMDC permitió garantizar más de 5 ciclos logarítmicos de inactivación con un tiempo de tratamiento inferior a 3 minutos.

Tabla 1: Ciclos logarítmicos de inactivación de *E. coli* CECT 4201 suspendido en zumo de manzana y tratado con distintas tecnologías durante diferentes tiempos.

TRATAMIENTO	Número máximo de ciclos logarítmicos de inactivación	Tiempo de tratamiento (min)
UV	1,22	3,58
CALOR (55°C)	2,91	3,58
DMDC (75 mg/L)	0,06	3,58
CALOR + 25 mg/L	3,21	3,58
CALOR + 50 mg/L	3,75	3,58
CALOR + 75 mg/L	4,35	3,58
UV + CALOR	5,08	3,20
UV + 25 mg/L	1,63	3,58
UV + 50 mg/L	2,31	3,58
UV + 75 mg/L	2,92	3,58
UV+ CALOR + 25 mg/L	>6	3,58
UV+ CALOR + 50 mg/L	>6	2,67
UV+ CALOR + 75 mg/L	>6	2,23

De nuestra investigación puede concluirse que el DMDC es un compuesto que sensibiliza a las bacterias a un tratamiento UV-H, lo que abre la posibilidad de utilizar las radiaciones ultravioleta para la pasteurización de los zumos incluso con elevados coeficientes de absorción.

BIBLIOGRAFÍA

- Food and Drug Administration (2001). Hazard analysis and critical control point procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice. Federal registre 66: 6137-6202.
- Gayán, E., Monfort, S., Álvarez, I., Condón, S. (2011). UV-C inactivation of *E. coli* at different temperatures, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 4:531-541.
- Gayán, E., Serrano M.J., Monfort, S., Álvarez, I., Condón, S. (2012). Pasteurization of apple juice contaminated with *E. coli* by a combined UV-mild temperature treatment. Food and Bioprocess Technology, DOI 10.1007/s11947-012-0937-z.

Agradecimientos. Investigación financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20), el Fondo Social Europeo y MENR de Grecia (2007-2013).

Inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 mediante la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje de mili y microsegundos

Santiago Condón-Abanto, Elisa Luengo, Jorge Tremín, Javier Raso e Ignacio Álvarez

¹ *Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, nacho.alvarez@unizar.es*

En este trabajo se ha investigado por primera vez el efecto de la anchura del pulso en el rango de mili y microsegundos en la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 en un tampón de pH 3,5 al aplicar tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) a distintas temperaturas (desde los 20 hasta los 40°C). Ello ha requerido la utilización de dos equipos distintos aplicando pulsos de mili y microsegundos de distintas intensidades del campo eléctrico (de 4 a 10 kV/cm en el caso de los milisegundos y de 15 a 25 kV/cm para los microsegundos) y energía específica. Los resultados han mostrado que la inactivación incrementó con la intensidad del campo eléctrico, la temperatura y la energía aplicada tanto cuando se utilizaron pulsos de mili y microsegundos. De los tres factores investigados, la temperatura fue la que más influyó sobre todo cuando se aplicaron pulsos de milisegundos, estando condicionado dicho efecto a la intensidad y la energía aplicadas. Cuando se compararon tratamientos de la misma energía específica, los tratamientos de microsegundos fueron más eficaces letalmente que los de milisegundos a temperaturas inferiores a los 27°C, mientras que a temperaturas superiores, los milisegundos produjeron un mayor nivel de inactivación. Estos resultados suponen una novedad ya que hasta la fecha se había comprobado, pero únicamente a temperatura ambiente, que era preferible aplicar tratamientos cortos y de alta intensidad del campo para producir una mayor inactivación microbiana.

INTRODUCCIÓN

De forma general, la utilización de los PEAV como sistema de inactivación de microorganismos con el objetivo de pasteurizar alimentos líquidos, principalmente zumos, consiste en la aplicación de pulsos de anchura del orden de microsegundos y de intensidades por encima de los 10 kV/cm. Existen datos en la literatura que muestran que tratamientos con una anchura de pulso corta y una alta intensidad son más efectivos letalmente que tratamientos que administran pulsos de mayor anchura y menor intensidad de campo. Sin embargo, estos estudios se han realizado en el rango de microsegundos y campos por encima de los 10 kV/cm y a temperatura ambiente no existiendo datos comparables cuando se utilizan pulsos en el rango de milisegundos y menores intensidades de campo incluyendo además como variable la temperatura del medio de tratamiento.

Es por ello que el objetivo de esta investigación es comparar la letalidad de tratamientos PEAV equivalentes aplicados con pulsos de onda cuadrada de distintas intensidades y anchuras de pulso a distintas temperaturas del medio de tratamiento. Estos resultados permitirán determinar la eficiencia energética y letal de tratamientos comparables utilizando una metodología similar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa de *E. coli* O157:H7 aislada por el Dr. Chapman (Chapman et al., 1993). Se cultivó en TSB+YE a 35°C/24 h y, tras los tratamientos, se recuperó en TSA+YE a 35°C/24 h.

Tratamientos PEAV. Se utilizó el equipo de la empresa Scandinova (modulador PG, Scandinova, Uppsala, Suecia) para aplicar pulsos de μ s de onda cuadrada de 3 μ s de duración y de 15 a 25 kV/cm (0,7 a 2 kJ/kg/pulso) a una frecuencia de 0,5 Hz. En el caso de los tratamientos con ms, se utilizó un equipo (Coustets y col., 2013) que aplica pulsos cuadrados de 1 ms y campos de 4 a 10 kV/cm (2,6 a 16 kJ/kg/pulso) a una frecuencia de 0,2 Hz.

Para cada tratamiento, 0,5 mL de suspensión microbiana, resuspendida en el tampón McIlvaine de pH 3,5 y conductividad eléctrica de 1 mS/cm, a una concentración de 10⁸ UFC/mL se introducía en una cámara de electrodos paralelos termostatados de 2,01 cm² separados 0,25 mm que permitía aplicar tratamientos a temperaturas de 20 a 40°C en condiciones casi isotérmicas (Saldaña y col. 2010).

Diseño experimental y análisis de los resultados. Se realizó un diseño experimental de composición central y los resultados se analizaron mediante regresión múltiple para evaluar la influencia ($p < 0,05$) de la temperatura, el campo eléctrico y la energía específica en la eficacia letal de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los datos de inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenidos tras la aplicación de tratamientos PEAV con pulsos de μ s y ms a diferentes campos, energías y temperaturas en combinaciones establecidas en base al diseño experimental. De forma general, en ambos casos, la inactivación incrementó con la intensidad del campo eléctrico, la temperatura y la energía aplicada.

A partir de estos datos y con el fin de describir con más precisión el efecto de cada uno de los parámetros

investigados (temperatura $-T-$, campo eléctrico $-E-$ y energía específica $-W-$), se llevó a cabo una regresión múltiple permitiendo obtener las siguientes ecuaciones matemáticas para el tratamiento con μs (1) y ms (2):

(1) $\text{Log}_{10} S(t) = 3,86 - 0,266*T + 0,0048*T^2 + 0,00088*T*E + 0,00012*T^2*W$
 $R^2=0,958, R^2_{\text{ajustado}}=0,943; \text{ECM}=0,134$

(2) $\text{Log}_{10} S(t) = 1,96 - 0,108*T - 0,374*E - 0,018*W + 0,023*T*E + 0,00085*T*W + 0,0015*E*W$
 $R^2=0,955, R^2_{\text{ajustado}}=0,935; \text{ECM}=0,406$

Tabla 1: Datos de inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenidos en tampón de pH 3,5 tras la aplicación de tratamientos PEAV con pulsos de μs y ms de distinto campo, energía y temperatura.

MICROSEGUNDOS				MILISEGUNDOS			
T (°C)	C (kV/cm)	E (kJ/kg)	I (Log ₁₀)	T (°C)	C (kV/cm)	E (kJ/kg)	I (Log ₁₀)
20	15	67,5	0,8	20	4	24,0	0,2
20	15	6,8	0,9	20	4	1500,0	0,0
20	20	66,0	0,9	20	7	735,0	0,1
20	25	187,5	1,3	20	10	24,0	0,8
20	25	18,8	1,0	20	10	1500,0	2,2
30	15	37,1	0,8	30	4	762,0	0,2
30	20	120,0	1,0	30	7	24,0	0,9
30	20	66,0	1,0	30	7	735,0	3,1
30	20	66,0	1,0	30	7	735,0	2,7
30	20	12,0	0,9	30	7	1500,0	3,3
30	25	103,1	1,0	30	10	762,0	4,7
40	15	67,5	1,8	40	4	24,0	0,0
40	15	6,8	1,3	40	4	1500,0	1,6
40	20	66,0	2,0	40	7	735,0	3,1
40	25	187,5	2,8	40	10	24,0	3,2
40	25	18,8	1,8	40	10	1500,0	4,2

De los tres factores, la temperatura fue el factor que más influyó en la eficacia letal del proceso independientemente de la anchura de pulso aplicado, si bien su efecto fue muy dependiente del campo eléctrico aplicado sobre todo cuando se aplicaron ms .

A partir de las ecuaciones, se ha podido comparar la eficacia letal de los tratamientos aplicados con ambos tipos de pulsos. La Figura 1 muestra la letalidad de los tratamientos aplicados con ms y μs a 20 y 40°C. Para un mismo nivel energético, a 20°C, los μs fueron más eficaces letalmente que los ms ; mientras que a 40°C, los ms serían de elección.

La Figura 2 muestra con detalle el efecto de la temperatura en la inactivación por PEAV. Se observa que el efecto de la temperatura es mucho más marcado al aplicar pulsos de ms que de μs . Por otro lado, 27°C es la temperatura en la que se produce un cambio de efecto letal de los pulsos: hasta aproximadamente los 27°C los pulsos de μs resultarían más eficaces letalmente, mientras que a temperaturas superiores, serían los ms los más adecuados.

En conclusión, la aplicación de tratamientos PEAV con pulsos de ms produjo una eficacia letal mayor que en el caso de los μs para un mismo nivel energético cuando la temperatura del medio era superior a los 27°C. A menores temperaturas, se ha confirmado que

tratamientos de mayor intensidad y menor duración son más eficaces letalmente que los de baja intensidad y larga duración. En cualquier caso, se hace necesario realizar más estudios para confirmar los resultados ya que se ha descrito que pulsos de anchura superior a 20 μs producen reacciones de electrolisis (Ho y Mittal, 2000) que podrían afectar a la letalidad de los tratamientos.

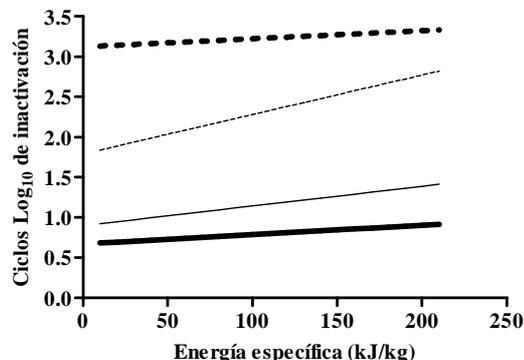


Figura 1: Ciclos logarítmicos de inactivación de *E. coli* O157:H7 obtenidos aplicando tratamientos de ms (—) de 10 kV/cm y μs (-) de 25 kV/cm de distinta energía y a temperaturas de 20° (líneas continuas) y 40°C (líneas discontinuas).

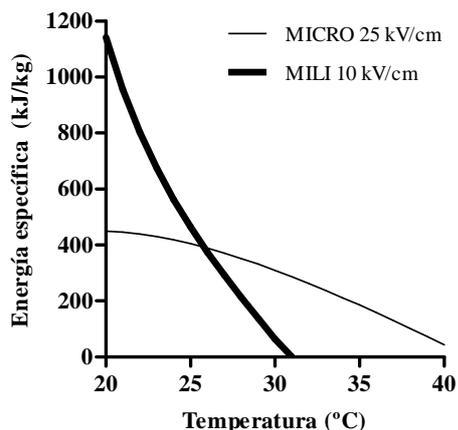


Figura 2: Condiciones (temperatura y energía) necesarias para inactivar 2 ciclos log_{10} de *E. coli* O157:H7 aplicando pulsos de μs a 25 kV/cm y de ms a 10 kV/cm.

BIBLIOGRAFÍA

Chapman, Siddons, Wright, Norman, Fox, Crick. 1993. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *E. coli* O157 infections in man. *Epidem Infect* 111, 439-447.
 Coustets, Al-Karablieh, Thomsen, Teissié. 2013. Flow Process for Electroextraction of Total Proteins from Microalgae. *J Memb Biol.* 246, 10, 751-760.
 Ho, Mittal. 2000. High voltage pulsed electrical field for liquid food pasteurization. *Food Rev. Int.* 16, 395-434.
 Saldaña, Puértolas, Álvarez, Meneses, Knorr, Raso. 2010. Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *J Food Eng.* 100, 349-356.

Agradecimientos. Investigación financiada por el Gobierno de Aragón (Grupo de Investigación Consolidado A20) y el Fondo Social Europeo.

Presencia de especies reactivas del oxígeno y permeabilización de la membrana en células de *Escherichia coli* tratadas con ozono

María Marcén, Santiago Condón y Pilar Mañas

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, marcen@unizar.es

El gas ozono presenta un uso incipiente en la industria alimentaria. En la literatura científica existe diversidad de opiniones acerca de su modo de acción sobre las células bacteriana. En este trabajo se estudia la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la permeabilización de la membrana citoplasmática en células de *Escherichia coli* tratadas con ozono, a través de la tinción con fluorocromos específicos y citometría de flujo. Los resultados mostraron el aumento progresivo de ROS en las células, especialmente del radical superóxido, a lo largo del tiempo de exposición al ozono, hasta alcanzar un máximo tras 2,5 minutos. La permeabilización de la membrana citoplasmática, evaluada mediante la captación de yoduro de propidio, fue imperceptible hasta los 2,5 minutos de tratamiento, momento en el que más del 70% de las células habían sido inactivadas.

INTRODUCCIÓN

El gas ozono está encontrando aplicaciones en la industria alimentaria con diversos fines, como la higienización de superficies de frutas y vegetales, e incluso de zumos (Miller y col., 2013), gracias a su capacidad para inactivar diversos microorganismos. El ozono presenta además interés como agente modelo para el estudio del estrés oxidativo en los microorganismos. La inactivación microbiana se atribuye a su gran poder oxidante debido en parte a los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilo (OH^{\bullet}), entre otros, en los que se descompone (Patil y col., 2010).

Son numerosos los autores que han estudiado el efecto del ozono a nivel celular, pero, actualmente no se conoce con precisión cuáles son sus dianas celulares preferentes. Hay autores que afirman que la muerte celular por ozono es debida sobre todo a un daño en la superficie celular (Zhang y col., 2011) y, en contraposición, otros autores proponen que el ozono permea a través de las membranas actuando a nivel intracelular produciendo oxidación de las proteínas, daño en el DNA y disminuyendo la actividad enzimática (Patil y col., 2010). En este trabajo se ha empleado ozono como agente modelo para el estudio del estrés oxidativo en *E. coli*, con el objetivo de explorar su modo de acción y las dianas celulares sobre las que actúa.

MATERIAL Y MÉTODOS

El microorganismo utilizado fue *E. coli* BW 25113, que se mantuvo en criovial a $-80^{\circ}C$, a partir del cual se sembró una placa de TSA-EL por agotamiento en estría (24 h- $37^{\circ}C$). A partir de una colonia aislada se realizó el precultivo en 10 ml de TSB-EL (12 h- $37^{\circ}C$). Posteriormente se procedió a inocular un frasco de vidrio con 50 ml de TSB-EL para conseguir aproximadamente una concentración inicial de 10^6 ufc/ml. Este frasco se incubó en agitación a 130 rpm, a

$37^{\circ}C$ hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, tras 24 h de incubación, aproximadamente.

Tratamiento con ozono. Se empleó un ozonizador con una corriente alterna de 220 V, una frecuencia de 50 Hz y un flujo de ozono de 300-500 mg/h (TIANMA- Ozone Generator, China), cuyo difusor se introdujo en un volumen de medio de tratamiento (PBS) de 200 ml, termostataado a $25^{\circ}C$ en un baño. Se inoculó la suspensión microbiana (10^6 ufc/ml) y se realizaron extracciones de 0,1 ml del medio de tratamiento a tiempos predeterminados (0-5 minutos). Posteriormente se realizaron las diluciones decimales necesarias y se sembraron 0,1 ml en placa por homogeneización en masa en TSA-EL. Estas placas se incubaron 24 h a $37^{\circ}C$ para su posterior recuento.

Determinación de la presencia de especies reactivas del oxígeno. Se estudió la presencia de ROS durante el tratamiento con ozono mediante la tinción de las células, a tiempos predeterminados, con diferentes fluorocromos: H_2DCFDA (2',7'- dicloro-dihidro-fluoresceína-diacetato), que permite la detección de ROS en general, principalmente H_2O_2 y radicales hidroxilo; y dihidroetidio (DHE) que detecta radicales superóxido (Gomes y col., 2005). Además, se realizó la tinción de las células con yoduro de propidio para estudiar la presencia de daño en la membrana citoplasmática debido al tratamiento. Una vez teñidas y lavadas, las muestras se introdujeron en el citómetro de flujo (Guava easyCyte, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y se procesaron los datos mediante el Software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), obteniéndose los histogramas (nivel de fluorescencia frente a número de eventos) y los diagramas de puntos (fluorescencia frente a *forward scatter*) recogiendo 5000 eventos en cada experimento. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado y las gráficas muestran resultados representativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra la fluorescencia en el máximo del pico del histograma para las células de *E. coli* tratadas con ozono durante diferentes tiempos, y teñidas con H_2DCFDA (Fig 1A) y con DHE (Fig 1B).

Se produjo tinción con los dos colorantes empleados, por lo que durante el tratamiento con ozono aparecen ROS generales (H_2O_2 y OH^\bullet) y radicales superóxido. La fluorescencia alcanzaba un máximo a los 2,5-4 minutos de tratamiento, y posteriormente disminuía.

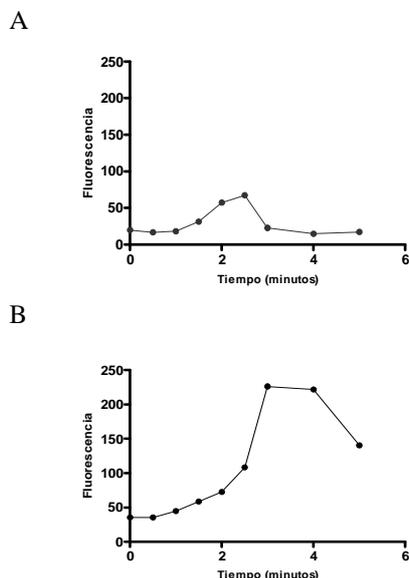


Figura 1. Presencia de ROS generales (A) y de radicales superóxido (B) en *E. coli* a lo largo del tratamiento con ozono.

En la Figura 2 se muestra el porcentaje de células fluorescentes tras la tinción con H_2DCFDA (Figura 2A) y con DHE (Fig 2B). En los dos casos se han incluido también las células fluorescentes teñidas con yoduro de propidio, es decir, con la membrana citoplasmática permeabilizada. Las gráficas indican que, además de la presencia de ROS en el interior celular, la exposición al ozono provocaba la permeabilización celular. Ambos fenómenos no se produjeron de manera simultánea. El aumento de la permeabilización celular ocurría de manera posterior (a partir de 2,5 minutos), y de forma paralela a la pérdida de tinción de ROS y superóxido. Este fenómeno podría deberse a la salida de material intracelular tras tiempos de tratamiento prolongados, por la permeabilización celular, o, en el caso del colorante H_2DCFDA , también a la pérdida de la actividad enzimática esterasa, imprescindible para la aparición de fluorescencia. Estos resultados también podrían indicar que el aumento de ROS/superóxido podría ser una de las causas de generación de daños en la membrana.

La Figura 3 muestra la relación entre la permeabilización celular y la inactivación de *E. coli* en el tratamiento con ozono. La permeabilización comenzó a producirse tras la inactivación de más de un 70% de las células, lo que parece indicar que el daño en la membrana se produciría posteriormente a

la inactivación celular, al menos en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio. Serán necesarias más investigaciones para establecer si la presencia de ROS/superóxido y la permeabilización celular son fenómenos relacionados entre sí.

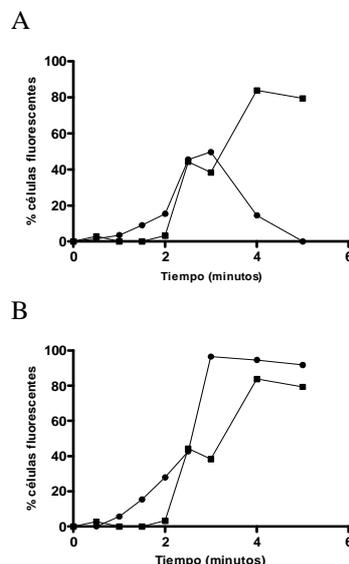


Figura 2. Comparación de la permeabilización (■) frente a la presencia de ROS (●) (A) y de radicales superóxido (●) (B) a lo largo del tratamiento con ozono.

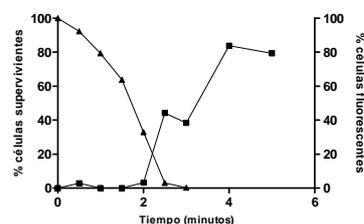


Figura 3. Relación entre la permeabilización (■) y la inactivación celular (▲) de *E. coli* durante el tratamiento con ozono.

BIBLIOGRAFÍA

- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L. 2005, Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Bioph. Meth.* 65(2), 45-80.
 Miller, F.A., Silva, C.L.M.; Brandao T.R.S.. 2013, A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. *Food Eng Rev* 5:77-106.
 Patil, S., Valdramidis, V.P., Karatzas, K.A.G., Cullen, P.J., Bourke, P. 2010, Assessing the microbial oxidative stress mechanism of ozone treatment through the responses of *E. coli* mutants. *J. Appl. Microbiol.* 111: 136-144.
 Zhang, Y.Q., Wu, Q.P., Zhang, J.M., Yang, X.H. 2011. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 111:1006-1015.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) a través del proyecto AGL 2012-33522 "Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas en la conservación de los alimentos".

RESUMEN TESIS DOCTORAL
PREMIO OXOID

Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los supervivientes a diferentes procesos de conservación de alimentos

Juan S. Aguirre

Director: Gonzalo García de Fernando Minguillón

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

A la industria alimentaria se le están exigiendo productos seguros, nutritivos, apetecibles y, últimamente, de uso cómodo y rápido. Aunar todos esos calificativos en un solo alimento es, muchas veces, ardua tarea.

Un tratamiento conservante intenso, que ofrezca buenas perspectivas sanitarias, suele conllevar una pérdida de valor nutritivo y unas características sensoriales poco atractivas. El manejo de los alimentos para transformarlos en productos listos para el consumo implica la asunción de ciertos riesgos microbiológicos, mayores siempre que los asumidos en los productos exentos de manipulación. ¿Cómo responder ante el incremento de riesgos y peligros que se ciernen sobre los “nuevos alimentos”? Una de las respuestas que ha ganado correligionarios, justificadamente, es la microbiología predictiva. Se trata de una herramienta de gran utilidad, a disposición de cualquier entidad interesada en los alimentos, capaz de predecir mediante modelos matemáticos el comportamiento microbiano bajo ciertas condiciones. La mayoría de los modelos generados hasta el momento predicen valores estáticos. Por ejemplo, considérese un valor D de 1 minuto. Si el producto contiene 10^3 microorganismos por gramo, un envase de 1 Kg que haya pasado por un tratamiento $6D$, contendrá 1 célula. Hasta aquí la predicción de un modelo clásico. Ahora pensemos en una producción industrial, de miles de envases de 1 Kg por hora. ¿Quién puede creerse que en todos ellos habrá un único microorganismo superviviente? ¿No es más creíble que en unos no quedará ningún viable, en muchos habrá 1, en otros 2, 3 y quizás en los menos, 5 u 8? Estos modelos estáticos, que han demostrado su eficacia durante décadas a base de tratamientos sobredimensionados para salvaguardar la calidad microbiológica de los alimentos, predicen una media, sin considerar la variabilidad, la dispersión de datos. Por otra parte, los muchos modelos de crecimiento microbiano desarrollados hasta la fecha predicen con suficiente precisión la tasa de crecimiento pero han fracasado en la predicción de la fase de latencia. Es obvio que esta fase del crecimiento microbiano es un factor crítico a la hora de estimar la vida útil de muchos productos y si quiere ajustarse a la realidad la fecha de consumo preferente, sin asumir pérdidas

económicas al acortarla, ni asumiendo riesgos derivados de la incertidumbre, hay que mejorar los modelos que la predicen.

A partir de estos antecedentes se propuso como objetivo general de esta Tesis Doctoral el estudio, desde un punto de vista matemático, de la variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los supervivientes a tratamientos conservantes, con la finalidad de entender mejor la eficacia de los procesos de conservación de los productos alimenticios y contribuir con datos que, quizás, permitan mejorar la precisión de los modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano.

Se ha trabajado con cinco microorganismos relevantes en la microbiología de los alimentos: *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria innocua*. Se realizó un estudio previo de los parámetros cinéticos de inactivación mediante un tratamiento convencional (calor) y uno relativamente emergente (ionización con electrones acelerados) en sistemas modelos y alimentos.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo se estudió la variabilidad del número de supervivientes aplicando diferentes tratamientos para lograr distintos grados de reducción decimal (desde 0 hasta 7 ciclos) utilizando un gran número de muestras, al menos 75.

Por otra parte, para el estudio de la variabilidad de la fase de latencia de los supervivientes a los tratamientos conservantes antes mencionados, los viables se diluyeron hasta obtener alícuotas que debían contener una sola célula. Tales muestras se incubaron a diferentes temperaturas de refrigeración y de abuso térmico para finalmente estimar su fase de latencia.

Los resultados obtenidos se han plasmado en seis artículos ya publicados:

- Aguirre, J.S., Pin C., Rodríguez, M.R, García de Fernando G.D. (2009). Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. **Appl. Environ. Microbiol**, **75**, (22): 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Monís, A., García de Fernando, G.D. (2014). Improvement in the lag phase estimation of individual cells that have survived mild heat treatment. **Int. J. Food Sci. Technol.**, **43**: 884-894.

doi:10.1111/ijfs.12382.

- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R, García de Fernando, G.D. (2011). Effects of electron beam irradiation on variability of the number of survivors and on duration of lag phase of four food-borne organisms. **Int. J. Food Microbiol.**, **149**: 236-246.
- Aguirre, J., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. (2012). A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. **Int. J. Food Microbiol.**, **153**: 444–452. doi. 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.012.
- Aguirre, J., Bravo, M.C., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. (2012). The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. **Advances in Microbiology**, **2**: 146-161.
- Aguirre, J., Gonzalez, A., Özçelik, N., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D. (2012). Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. **Int. J. Food Microbiol.**, **164**: 60-69.

A continuación se resumen los resultados más relevantes obtenidos en la tesis y descritos en estos artículos.

Variabilidad de la inactivación microbiana

Se ha comprobado que la inactivación microbiana, tanto mediante electrones acelerados como por tratamientos térmicos, está sujeta a cierta variabilidad, que, afortunadamente, puede cuantificarse. Cuanto más intensos son los tratamientos conservantes, menor es el número de microorganismos que permanecen viables, pero más variable es su número. La figura 1 es un ejemplo de esto. En ella se describe la inactivación de *Listeria innocua* en TSB a 54°C. Ha de considerarse que cada punto de la recta central es la media (*m*) de unas 75 determinaciones. Las barras por encima y debajo de cada punto representan $m \pm 1,96$ veces la desviación estándar (*Sd*) de la distribución de los datos, por lo que el área encerrada entre las rectas de regresión resultantes y mostradas en la figura 1:

$$y = m + 1,96 Sd \quad (1)$$

$$y = m - 1,96 Sd \quad (2)$$

contienen el 95 % de los datos que se han obtenido y que pudieran obtenerse si se repitiera el experimento. Como puede observarse en la figura 1, conforme más intenso fue el tratamiento térmico mayor resultó la *Sd* de la nube de puntos obtenida. La figura 2 muestra el efecto de la intensidad del tratamiento térmico conservante en términos de ciclos logarítmicos de inactivación logrados en la variabilidad (*Sd*) del número de supervivientes.

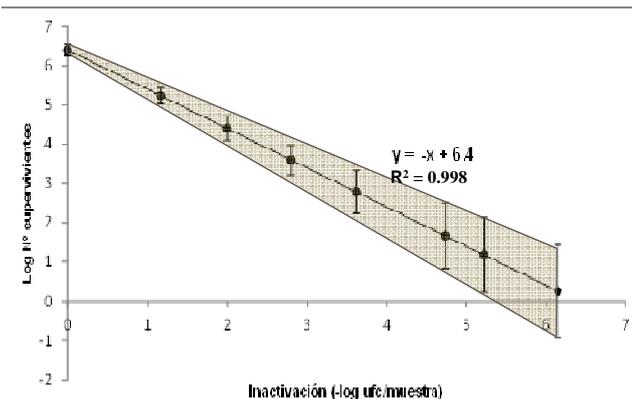


Figura 1. Inactivación de *Listeria innocua* en TSB a 54°C. Se muestran las medias del número de supervivientes y esas medias $\pm 1,96*Sd$, lo que indica que entre los extremos de las barras se incluyen el 95 % de los datos. Cada punto de la recta cuya ecuación es $y = -x + 6,4$ es media de 75 ó más determinaciones.

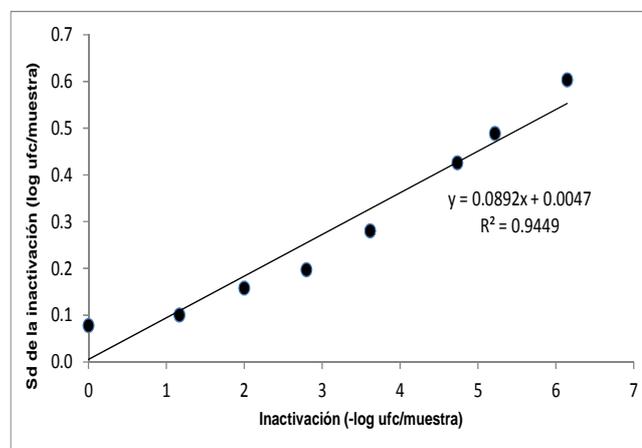


Figura 2. Efecto de la inactivación en el grado de variabilidad de la inactivación en términos de la desviación estándar de los datos de la figura 1.

¿Cómo considerar en la práctica esta variabilidad? Permítasenos un ejemplo para explicarlo. Sean envases de 1 Kg con una carga microbiana de $6,4*10^6$ ufc/envase; supóngase que el valor *D* de esos microorganismos a una determinada temperatura sea 1 minuto y que los envases se tratan a esa temperatura durante un tiempo *t* de 6,1 minutos, lográndose una inactivación equivalente a 6,1*D*. De acuerdo con la clásica ecuación:

$$D = t / (\log N_0 - \log N_t) \quad (3)$$

en la que *N*₀ es la carga inicial y *N*_{*t*} la el número de células viables tras la aplicación del tratamiento térmico durante un tiempo *t*, y despejando *N*_{*t*}, queda:

$$\log N_t = \log N_0 - t/D \quad (4)$$

La sustitución de los datos del ejemplo en la ecuación, dice que *N*_{*t*} será 2 ufc/envase. Pero esta cifra, en realidad, se corresponde con el valor medio del número de supervivientes, que coincide con un valor de la recta de regresión mostrada en la figura 1. Ahora bien, puede considerarse la variabilidad del número de

supervivientes que se muestra en la propia figura 1 y calcular la *Sd* predicha por la ecuación de la figura 2:

$$Sd = 0.0892x + 0.0047 \quad (5)$$

siendo *x* el grado de inactivación alcanzado (6.1 ciclos logarítmicos), la *Sd* de la distribución será 0.545 log(ufc/muestra). En este caso, considerando que todos los envases de un lote contienen la misma carga inicial ($2,5 \cdot 10^6$ ufc) y admitiendo que la inactivación microbiana en un momento determinado sigue una distribución normal, puede calcularse la distribución de frecuencias del número de supervivientes con ayuda de la siguiente ecuación:

$$f(x) = \frac{1}{\delta\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\delta}\right)^2} \quad (6)$$

donde $f(x)$ es la frecuencia que corresponderá al valor *x* (en nuestro caso un logaritmo del número de supervivientes), μ es el logaritmo de la media del número de supervivientes y δ es la *Sd*. Siguiendo con el ejemplo, la distribución de frecuencias resultante se muestra en la figura 3. Esta figura se obtiene asignando valores a *x* desde un mínimo hasta un máximo (en este caso -4 y +4, que en términos de viables significaría desde 10^{-4} ufc/envase hasta 10^4 ufc/envase) y sustituyendo en la ecuación (6). Dada la simetría de la distribución normal, un somero análisis de esa figura nos hace ver que la mitad de la distribución queda a la izquierda de la media y la otra mitad a la derecha; es decir, siendo la media del número de supervivientes de 2 células viables por envase, la mitad de los envases del lote contendrán menos de 2 ufc/envase y la otra mitad 2 ó más ufc/envase. Si el FSO (objetivo de seguridad alimentaria) fuese que los envases contuvieran 2 ufc/envase como máximo, es evidente que el tratamiento aplicado sería claramente insuficiente. En realidad, el FSO debería concretar el porcentaje de muestras que contendría una determinada carga. Así, siguiendo con el ejemplo, el FSO podría ser que como máximo, el 1 % los envases contuviera 2 ó más células viables. Para conseguirlo, el tratamiento a aplicar sería de 7.8*D*, con una media de supervivientes por envase de 0.04 y una *Sd* de la distribución predicha de 0.700. Todas estas cifras pueden obtenerse a partir del modelo diseñado en esta tesis con *Listeria innocua* y validado en alimentos, que permite predecir el porcentaje de muestras de un lote que contendrán una determinada carga microbiana.

La figura 4 muestra la distribución que resultaría del tal tratamiento. Apréciase que al incrementar la intensidad del tratamiento microbicida, el número de supervivientes es menor –obviamente– pero la variabilidad ha aumentado y la distribución de frecuencias se ha achatado y ensanchado notoriamente

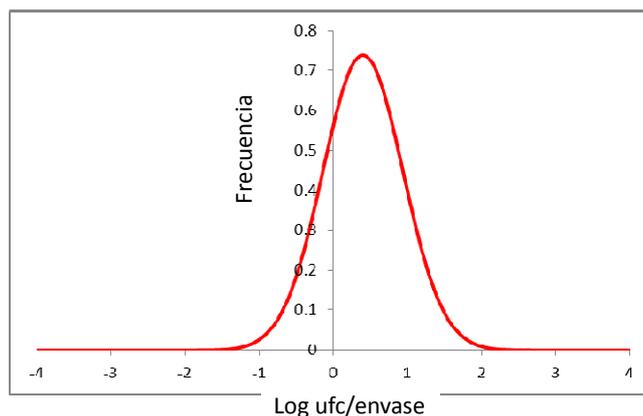


Figura 3. Distribución de frecuencias del número de supervivientes con una media de 2 ufc/envase ($\log_{10} 2 = 0,3010$) y una *Sd* de 0,545.

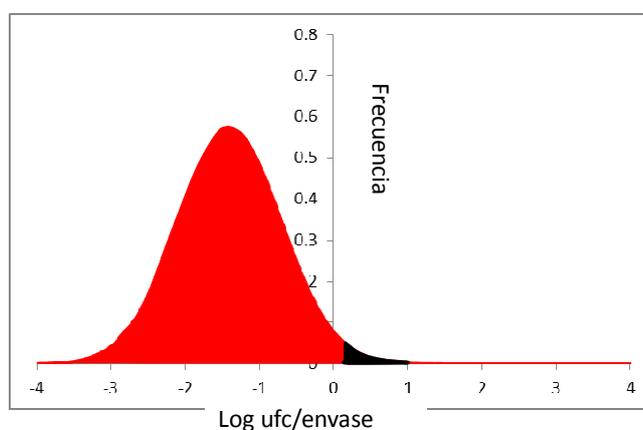


Figura 4. Distribución de frecuencias del número de supervivientes para que el 1 % los envases contuviera 2 ó más células viables. Zona más oscura de la gráfica.

Este hecho adquiere toda su relevancia si se considera un patógeno y un proceso que persigue su total inactivación. Debe considerarse la variabilidad inherente al proceso conservante para aplicar un tratamiento que minimice el riesgo microbiológico hasta donde el tecnólogo quiera y no hasta donde el azar pueda determinar caprichosamente. Además, y por supuesto, esta variabilidad debe considerarse en cualquier análisis de peligros y puntos críticos de control y aplicarse en la evaluación cuantitativa de riesgos microbianos. Pasarla por alto sería una negligencia.

Variabilidad de la fase de latencia

Como era de esperar, los tratamientos conservantes afectan a la fase de latencia y la hacen más variable. Cuanto más intenso es el tratamiento aplicado, más prolongada e inconstante es la fase de latencia. No obstante debe tenerse en cuenta que son muchos los factores que influyen en este periodo de adaptación celular, previo a la multiplicación, desde el tamaño del inóculo hasta la temperatura pasando por cualquier factor que pueda comprometer o afectar al estado

fisiológico de los microorganismos. La figura 5 muestra el efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor e irradiación en la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes a tales tratamientos y que después crecen en TSB a 16°C (*L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens*) o 18°C (*E. faecalis*). Cada dato es media de en torno a 70 muestras y la figura 6 muestra el efecto de la intensidad de los mismos tratamientos en la variabilidad (*Sd*) de la fase de latencia de los microorganismos en las mismas condiciones.

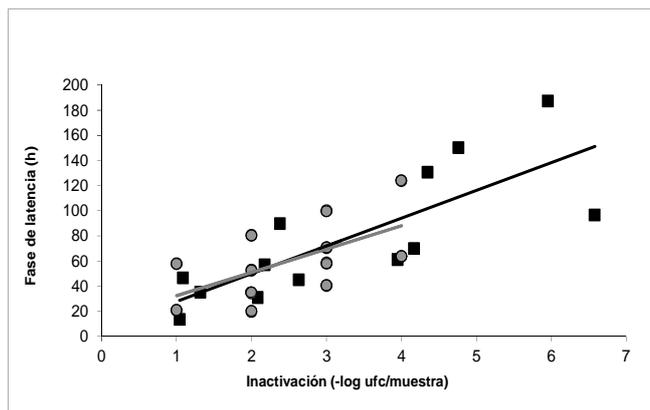


Figura 5. Efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor (○) e irradiación (□) en la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes a tales tratamientos y que después crecen en TSB a 16°C (*L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens*) o 18°C (*E. faecalis*). Cada dato es media de en torno a 70 muestras. Se muestran las rectas de regresión que relacionan la fase de latencia de los supervivientes con el grado de inactivación térmica (recta negra) y por irradiación con electrones acelerados (gris).

Ya se ha mencionado antes que la carga inicial afecta a la fase de latencia de la población. Cuando una población contiene miles o incluso cientos de células, su fase de latencia es bastante reproducible, pero cuando solo una o unas pocas bacterias forman la población, su fase de latencia es muy variable (Pin y Baranyi, 2006). En esta tesis se ha pretendido ahondar en este asunto y se analizó el efecto del tamaño del inóculo en la fase de latencia de micropoblaciones, formadas por un número de células diverso, desde una hasta un par de centenas aproximadamente, y en su variabilidad. Se corroboró experimentalmente lo postulado por Pin y Baranyi (2006), ya que estos autores predijeron matemáticamente que la fase de latencia sería más prolongada y más variable cuanto menor fuera la carga inicial, ya que cuantas más células forman el inóculo, más probable será que una, al menos, sea de fase de latencia corta y ésta arrastraría, en su crecimiento, a la población, acortando la fase de latencia de la población en su conjunto.

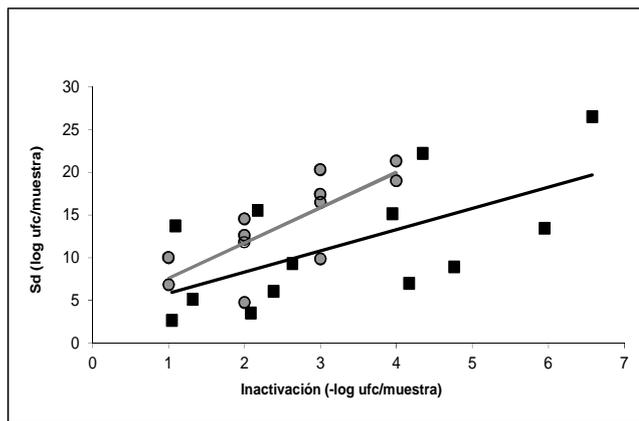


Figura 6. Efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor (○) e irradiación (□) en la variabilidad (*Sd*) de la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes a tales tratamientos y que después crecen en TSB a 16°C (*L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens*) o 18°C (*E. faecalis*). Se muestran las rectas de regresión que relacionan la desviación estándar de las fases de latencia de los supervivientes con el grado de inactivación térmica (recta negra) y por irradiación con electrones acelerados (gris).

A partir de los datos recabados en esta tesis se diseñó un modelo, basándose en que la fase de latencia sigue una distribución gamma, cuya función es:

$$f(x) = \frac{\lambda e^{-\lambda x} (\lambda x)^{\kappa-1}}{\Gamma(\kappa)} \tag{7}$$

donde *x* es la fase de latencia; *f(x)*, su frecuencia relativa; λ , la tasa de la distribución; κ , la forma de la distribución; *e*, la base de los logaritmos naturales; and $\Gamma(\kappa)$, la función gamma de la forma, que puede calcularse fácilmente en el programa Excel de Microsoft. La tasa (λ) y la forma (κ) son parámetros que caracterizan la distribución y que se calculan a partir de la media y la varianza:

$$\lambda = \frac{\text{media}}{\text{varianza}} \tag{8}$$

$$k = \lambda * \text{media} \tag{9}$$

El modelo desarrollado permite predecir la distribución de frecuencias de las fases de latencia de micropoblaciones, considerando el número de microorganismos viables que forman la carga inicial y el tratamiento al que han sobrevivido esas células. Las figuras 7 y 8 son ejemplos de las predicciones del modelo.

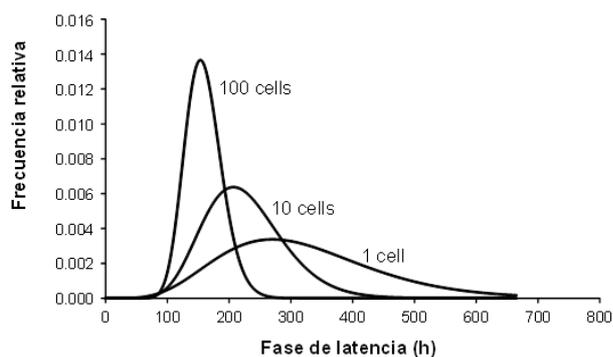


Figura 7. Distribuciones de frecuencias de las fases de latencia de diferentes inóculos de *Listeria innocua* supervivientes a un tratamiento microbicida que reduce la carga en 6,1 ciclos y se almacenan a 7°C. Las distribuciones son predicciones del modelo desarrollado en la tesis doctoral.

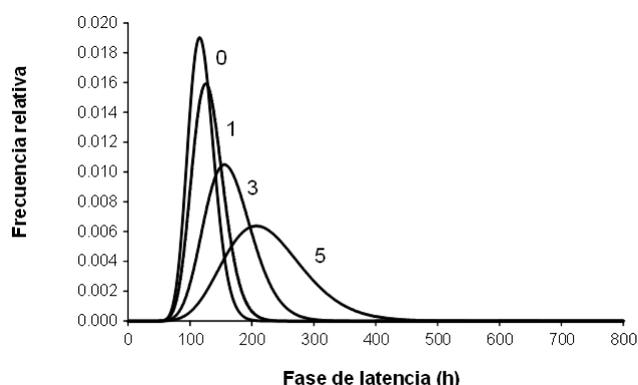


Figura 8. Distribuciones de frecuencias de las fases de latencia de 10 células de *Listeria innocua* supervivientes a tratamientos microbicidas (se indica el número de ciclos logarítmicos de inactivación para cada caso) a 4°C. Las distribuciones son predicciones del modelo desarrollado en la tesis doctoral.

Si se analiza cualquiera de las distribuciones mostradas en las figuras 7 y 8 se observa que la fase de latencia de una población dista mucho de ser una constante como muchos modelos, que no consideran la variabilidad, predicen. Se aprecia nítidamente que cuanto menor es el inóculo, la fase de latencia es más variable y más probable es que sea larga. Lo mismo cabe decir de las células que han sobrevivido a tratamientos estresantes. Cuánto más intenso haya sido tal tratamiento, más variable será la fase de latencia de las células supervivientes y más probable que ésta sea prolongada.

Se comprende, entonces, la necesidad de disponer de un buen modelo que la prediga, considerando siempre su variabilidad, sobre todo cuando la carga inicial es escasa, del orden de unidades o hasta centenas de viables, y en unas condiciones alejadas de las óptimas de crecimiento (ambos condicionantes son típicos de muchos alimentos), ya que, entonces, la fase de latencia -y su variabilidad- puede ser el factor más importante para determinar la vida útil del

alimento. Tal modelo se ha desarrollado en el contexto de esta Tesis con *Listeria innocua*, y permite predecir, por una parte, la distribución de frecuencias del número de supervivientes a un tratamiento conservante mediante irradiación o tratamientos térmicos, y, por otra, predice la distribución de frecuencias de las fases de latencia de las células que hayan logrado sobrevivir, en función de la temperatura de almacenamiento, el número de células viables y el tratamiento al que han sobrevivido.

Al autor de esta Tesis y a su director no les caben dudas. Un buen modelado del comportamiento microbiano, tanto de la inactivación como del crecimiento, debe contemplar la variabilidad inherente a los organismos vivos. La inclusión de la variable “variabilidad” en tales modelos mejorará sus predicciones y su aplicación redundará en unas mayores garantías sanitarias de los alimentos.

Desgraciadamente, los datos y los modelos desarrollados en esta tesis no pueden aplicarse directamente a ningún alimento ni a ningún microorganismo que no sean los aquí analizados. Pero los datos que se ofrecen han de despertar el interés de la industria y sería encomiable que a partir de estas aportaciones desarrollaran sus propios modelos, analizando los microorganismos más resistentes en cada caso y estudiando su comportamiento en las condiciones en que se traten (tratamientos conservantes) y almacenen. De esta manera podrá llevarse a cabo un análisis cuantitativo de los riesgos microbianos que se acerque mucho a la realidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Pin, C. & Baranyi, J. 2006. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2163–2169.

**PREMIO ESPECIAL DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS 2014 PARA INVESTIGADORES JÓVENES DEL GRUPO
DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA SEM**

Tecnologías emergentes de conservación: ¿nos olvidamos del calor?

Ignacio Álvarez

Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España, nacho.alvarez@unizar.es



Ignacio Álvarez Lanzasote se licenció en Veterinaria, por la especialidad Bromatología, Sanidad y Tecnología de los Alimentos, en la Universidad de Zaragoza (España) en 1997; obteniendo el título de grado tras la defensa de un trabajo de un investigación sobre la conservación de los alimentos por ultrasonidos bajo presión y calor. Tras un año de estancia en la Universidad Técnica de Berlín y tres en la de Zaragoza, en los que estudió la conservación de alimentos por pulsos eléctricos de alto voltaje, obtuvo el primer título de doctor europeo expedido en el área de Tecnología de los Alimentos en la Universidad de Zaragoza. Realizó una estancia postdoctoral, como becario Fulbright en el Eastern Regional Research Center del Departamento de Agricultura de los EE.UU, donde trabajó en la conservación de alimentos por irradiación. Desde su regreso, forma parte del grupo de investigación de excelencia de Aragón “Nuevas tecnologías de conservación e

higienización de los alimentos”, donde ha centrado su investigación en la microbiología predictiva así como en la aplicación de diversas tecnologías como los pulsos eléctricos de alto voltaje, los ultrasonidos y la luz ultravioleta para la higienización de alimentos y/o la mejora de la extracción de componentes intracelulares.

En la actualidad, es autor de más de 65 artículos científicos, ha dirigido 6 tesis doctorales, imparte docencia como Profesor Titular de Universidad en el Grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, y, desde 2011, es el profesor coordinador de la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza. Ha recibido varios premios entre los que destacan el Premio a la Investigación 2013 del Instituto de Estudios del Huevo, el Premio BSH a la Innovación en la Empresa VII Edición y, como el editor de la revista digital CTAMagazine (www.catedu.es/ctamagazine), el de Innovación Docente por la Cátedra del Banco Santander en el año 2010.

ÍNDICE DE AUTORES

AUTOR	PÁGINA	AUTOR	PÁGINA
Abadias, M.	75, 189	Bindels, L.B.	122
Abriouel, H.	124, 236, 238	Bolton, D.	211
Aguilar, A.	293	Boque Oliva, C.	115
Aguirre, J.S.	221, 289, 321	Bordetas, A.	273
Alegre, I.	75	Bordons, A.	135, 144, 158
Alfa, A.	54	Bover-Cid, S.	256
Alonso, C.A.	195	Bravo Vázquez, M.V.	176
Alonso, V.	301, 303	Brunton, N.	211, 213, 313
Alonso-Calleja, C.	56, 103, 244, 246	Buzón-Durán, L.	56
Alonso-Hernando, A.	244, 246		
Álvarez Suárez, M.E.	89	Cabaneiro, M.	174
Álvarez, I.	191, 269, 273, 315, 317, 331	Cabeza, M.C.	287
Álvarez-Ordóñez, A.	227, 258, 305	Cabezas, L.	154
Andrade, M.J.	54, 101, 178	Cachaldora, A.	52, 299
Anguera, M.	189	Callejón, S.	126
Araque, I.	144, 158	Calvo Torras, M.A.	205, 207
Arboleya, S.	119	Calvo, T.	305
Arnau, J.	221	Cambero, M.I.	287
Arosemena, L.	205, 207	Camino García, M. del	87
Arqués, J.L.	203	Campo, R. del	61
Arroyo, C.	213, 313	Cani, P.D.	122
Arrubla, P.	130	Capita, R.	56, 103, 244, 246
Artieda, J.	38	Cárdenas, C.	46
Asensio, M.A.	63, 230, 295	Casado Muñoz, M.C.	236, 238
Ávila, M.	283	Chiquirrín, M.	307
Aznar, R.	32, 46, 91	Chueca, B.	234
		Cobo Molinos, A.	124, 238, 291
Balsalobre, C.	232	Cocconcelli, P.S.	46
Bañon, S.	297	Colás, P.	75, 189
Barreiro, A.	174	Coll Jordá, D.	176
Bartolomé, B.	77, 79	Condón, S.	109, 111, 215, 217, 219, 250, 269, 271, 315, 319
Bayarri, S.	171	Condón-Abanto, A.	113, 115
Belletti, N.	256	Condón-Abanto, S.	191, 213, 313, 317
Beltran, G.	140, 148, 156	Córdoba, J.J.	34, 54, 101
Beltrán, J.A.	301, 303	Corujo Fernández, A.	36
Benavent-Gil, Y.	150, 240	Cruz-Pio, L.E.	240
Benomar, N.	124, 236, 238	Cueva, C.	79, 138
Berbegal, C.	150		
Bermúdez, E.	101, 178	D'Arrigo, M.	97
Bernaldez, V.	34, 54	de Vos, W.M.	122
Berned Sabater, M.	113, 115	Delgado, D.	283
Bertó, R.	209	Delgado, J.	178, 230

Delgado, S.	40, 128	García-Fontán, M.C.	52, 299
Delzenne, N.M.	122	García-Gonzalo, D.	107, 234, 248
Dewulf, E.M.	122	García-Lafuente, A.	97
Díaz García, J.	36, 99	García-López, M.L.	279
Díaz, G.	46	García Pardo, G.	113, 115
Díez-Leturia, M.	95	García Robles, I.	176
Domínguez-Gasca, N.	193	Garde, S.	283
Doyle, S.	230	Garde-Cerdán, T.	197
		Garijo, P.	197
Elizaquível, P.	46	Garrido, M.	160
Elorduy Goyeneche, J.	176	Garrido, V.	95
Enrique Reyes, D.	309	Garrido-Bailón, E.	52
Errazti, N.	38	Garriga, M.	256
Español, A.	169	Gaya, P.	283
Español, S.	301, 303	Gayán, E.	315
Espina, L.	107, 248	Gil-Sánchez, I.	79
Esteban, M.D.	277, 281	Girmé, G.	205, 207
Esteban Fernández, A.	77	Gómez-Alonso, S.	146
Esteve-Zarzoso, B.	140, 148, 152	Gómez-Torres, N.	283
Ezquerria, J.	48, 105	González, B.	140, 148, 156
		González, C.	160
Fagan, J.	211	González, D.	71
Fernández, B.	52	González, L.	93
Fernández, D.	93	González-Arenzana, L.	197
Fernández, M.	221, 289	González de Llano, D.	77
Fernández, P.S.	255	González Fandos, E.	165
Fernández-Fuentes, M.A.	83	González García, P.	260, 311
Fernández-González, M.	146	González González, P.	36, 99
Fernández-León, M.F.	97	González-Vicente, A.	279
Fernández Márquez, M.L.	199, 201	Gouma, M.	191, 269, 315
Fernández- Salguero, J.	154	Gragera, D.	295
Ferrer, S.	50, 126, 142, 150, 240, 293	Grande Burgos, M.J.	199, 201, 291
Flórez, A.B.	40, 128	Gratacós-Cubarsí, M.	221
Fonoll Tassier, I.	115	Guadamuro, L.	40
Franquès, J.	158	Guàrdia, M.D.	297
		Gueimonde, M.	119, 122
Gadea, R.	83	Guerrero-Ramos, E.	246
Galán, J.	25	Guillamón, E.	97
Gálvez, A.	83, 124, 199, 201, 236, 238, 291	Guirado, P.	232
García, A.	295	Gutiérrez, A.R.	197
García, G.	52, 299		
García, S.	185	Heras, J.M.	142
García-Cela, E.	81	Hernández, M.	260, 311
García de Fernando, G.	221, 289	Herrera Arias, F.	73

Hidalgo Pestaña, M.	124, 238, 291	Mahillon, J.	122
Hidalgo-Sanz, S.	195	Manso, S.	285
Hierro, E.	221, 289	Mañas, P.	109, 250, 319
Hill, C.	227, 258	Marcén, M.	250, 319
Hospital, X.F.	221, 289	Margalef, M.M.	144
Huertas, J.P.	258	Margolles, A.	119
Hurtado, A.	297	Marín, S.	81
		Marín Garrido, A.	201
Igrejas, G.	103	Martín-Álvarez, P.J.	77
Illescas, V.	46	Martín-Cabrejas, I.	85, 203
Izidoro, I.	140, 148	Martínez, M.P.	48
Izquierdo Cañas, P.M.	146	Martínez, N.	119
		Martínez, P.	105
Jáuregui Arbizu, B.	67	Martínez Cañamero, M.	124, 238, 291
Jímenez-López, C.	193	Martínez-Olarte, R.	195
Jofré, A.	256, 297	Martínez-Onandi, N.	275
		Mas, A.	140, 148, 152, 156, 242
Krieger, S.	142	Maté, J.	267
		Mateo Gallego, L.	113
Ladero, V.	128	Mateo-Vivaracho, L.	97
Lafarga, M.A.	48, 105	Mayo, B.	40, 128
Lahoz, R.	111, 215, 217, 219	Meade, J.	211
Langa, S.	203	Medina, A.	34
Latorre-Moratalla, M.L.	256	Medina, M.	85, 203
Lau Alarcon, K.	309	Mena Morales, A.	146
Lavilla Lerma, L.	236, 238	Menéndez, R.A.	87
Lian, F.	213, 313	Meneses, N.	188
Llanos Palop, M. de los	154	Miguel, R.	34
López, D.	29, 248	Milvaques, A.	209
López, M.	227, 305	Molina-González, D.	103
López, P.	140, 148	Montiel, R.	85, 203
López, R.	197	Moreno, A.	130
López Aguayo, M.C.	199, 201	Moreno, L.	32
López-Alfaro, I.	197	Moreno-Arribas, M.V.	77, 79, 138
López Fernández, M.	265	Moreno Montoya, B.	38, 176
Lorenzo, F.	209	Mourelle, M.	174
Lozano, M.	97	Muñoz, A.	193
Lucas, R.	199, 201, 291	Muñoz-González, C.	138
Lucio, O.	142		
Luengo, E.	273, 317	Nácher-Vázquez, M.	46
Luis, A.	107	Navajas-Benito, E.V.	195
Lyng, J.	211, 213, 313	Navarro, M.	48, 105
		Nerín, C.	285
Madrid, C.	232	Neyrinck, A.M.	122
Magan, N.	34		

Núñez, F.	230, 295	Reguant, C.	144, 158
Núñez, M.	275	Rendueles, E.	87
Ojer-Usoz, E.	71	Reyes, O.	46
Olarte, C.	195	Reyes-Gavilán, C.G. de los	119, 122
Oliveira, M.	75, 189	Riesco-Peláez, F.	56, 244
Ordóñez, J.A.	287	Rivas-Cañedo, A.	275
Oria Easo, C.	38, 176	Rodríguez, A.	34, 54
Orihuel, E.	209	Rodríguez, L.	283
Ortega, E.	83, 291	Rodríguez, M.	54, 178
Otero, A.	279	Rodríguez, R.	38
Owens, R.A.	230	Rodríguez-Calleja, J.M.	279
Pablo Busto, B. de	176	Rodríguez Lázaro, D.	260, 311
Padilla, B.	148	Rodríguez-Navarro, A.B.	193
Pagán, R.	107, 234, 248	Romero, D.	225
Palahí, B.	158	Romero, P.	65, 183
Palop, A.	255, 258, 267, 277, 281	Ros, J.M.	297
Pardo, I.	50, 126, 142, 150, 240, 293	Ros-Chumillas, M.	277, 281
Paytubi, S.	232	Ruas-Madiedo, P.	119
Pedrós, S.	211	Ruiz, C.	105
Peirotén, A.	203	Ruiz, L.	119
Pérez, A.	46	Ruiz, V.	111, 215, 217, 219
Pérez, A.	105	Sainz, F.	242
Pérez, L.	207	Saiz, A.M.J.	130
Pérez, R.	291	Salazar, J.A.	174
Pérez Pulido, R.	83, 201	Salazar, N.	119, 122
Periago, P.M.	255, 267	Sampayo Iglesias, M.	99
Peromingo, B.	101, 178	Sánchez, B.	119
Picón, A.	101, 295	Sánchez, C.	91
Picon, A.A.	275	Sánchez, G.	32, 91
Picouet, P.	297	Sánchez-Montero, L.	101, 178
Poeta, P.	103	Sánchez Valenzuela, A.	236
Polo, L.	293	Sanchis, J.	42, 44
Poveda, J.M.	154	Sanchís, V.	81
Pozo-Bayón, M.A.	138	Sanjurjo, A.	174
Prado Marrón, N.	36, 99	Santamaría, P.	197
Prieto, I.	124, 291	Santos Buelga, J.A.	73, 89
Prieto, M.	227, 305	Santos, V.	50
Ramos, A.J.	81	Sanz, J.J.	87
Ramos, S.J.	271, 307	Sanz, S.	195, 197
Ramos Gorbeña, J.C.	309	Segarra, A.B.	124
Raso, J.	191, 273, 317	Sendra, R.	126
		Serrano, M.J.	109, 250
		Seseña, S.	154

Sierra, V.	36	Uribarri Atutxa, J.	176
Somalo, S.	195		
Spinosa, J.	46	Valero, A.	260, 311
Suárez, E.	40	Varillas Moreno, G.	309
		Vázquez, J.	156
Tabar, T.	95	Velasco, R.	287
Tapiol Oliva, J.	113, 115	Vera, R.	205
Thissen, J.P.	122	Viñas, I.	75, 189
Toledo del Árbol, J.	199, 201	Virto, R.	130, 160, 271, 307
Torija, M.J.	156, 242	Vitas, A.I.	71, 95
Tornadijo, M.E.	93		
Torres, C.	195	Wacher, C.	46
Traver, I.	140	Wang, C.	152
Tremín, J.	317	Whyte, P.	211, 213, 313
Uribarren, P.	38	Zevallos Laor, D.	309



Universidad
Zaragoza

1542



Consejo General de
Colegios Veterinarios



HIGIA PECORIS SALUS POPULI
Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios
de la provincia de Zaragoza



Colegio Oficial de
Veterinarios de Huesca



COLEGIO OFICIAL
DE MÉDICOS
DE ZARAGOZA



INIA
Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria



UNIÓN EUROPEA
FONDO
EUROPEO DE
DESARROLLO
REGIONAL
"Una manera de hacer Europa"

AC2013-00043-00-00



CNTA®



INSTITUCIÓN
FERNANDO
EL CATÓLICO



¡Pasión por la creatividad!



Instrulab
Instrumentación
Microbiología
Reactivos y Kits Analíticos
Material de Laboratorio



ESTABLISHED 1960



pronadisa
Micro & Molecular Biology

renfe